(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) **1-0047845**

(51)[2020.01] **C12N 15/113**; A61K 48/00; A61P 31/00 (13) **B**

(21) 1-2020-03065 (22) 29/11/2018
(86) PCT/CN2018/118303 29/11/2018 (87) WO 2019/105437 06/06/2019
(30) 201711249333.8 01/12/2017 CN; 201711482970.X 29/12/2017 CN
(45) 25/06/2025 447 (43) 25/11/2020 392A
(73) SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD. (CN)
No. 168 Yuanfeng Road, Yushan Town, Kunshan Suzhou, Jiangsu 215300, China
(72) ZHANG, Hongyan (SE); GAO, Shan (CN); KANG, Daiwu (SE).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) SIARN, THỂ LIÊN HỢP SIARN, DƯỢC PHẨM CHỨA SIARN VÀ BỘ KIT CHỨA THỂ LIÊN HỢP SIARN

(21) 1-2020-03065

(57) Sáng chế đề cập đến siARN để ức chế sự biểu hiện của gen virut viêm gan B, và dược phẩm và thể liên hợp chứa siARN. Mỗi nucleotit trong siARN độc lập là nucleotit biến đổi. SiARN chứa chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa. Chuỗi có nghĩa của siARN chứa trình tự nucleotit 1 có chiều dài giống nhau và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 155, và chuỗi đối nghĩa của siARN chứa trình tự nucleotit 2 có chiều dài giống nhau và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 156.

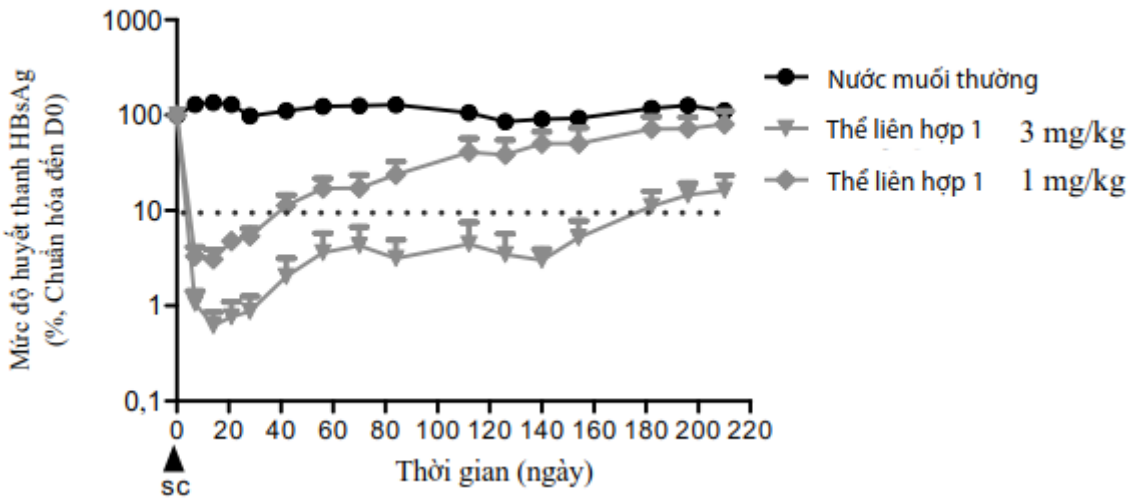


Fig. 26

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến siARN để ức chế sự biểu hiện của gen virut viêm gan B, và dược phẩm và thể liên hợp chứa siARN.

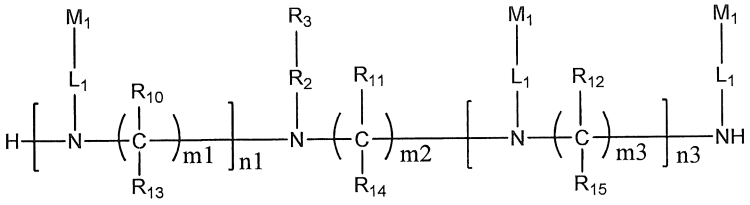
Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh viêm gan siêu vi B (còn được gọi là bệnh viêm gan typ B hoặc viêm gan B) là nhóm bệnh truyền nhiễm, là mối đe dọa nghiêm trọng đối với thế giới, đặc biệt là Trung Quốc. Hiện tại, các interferon và chất tương tự nucleosit là hai loại thuốc chính được công nhận trên toàn cầu để phòng ngừa/điều trị viêm gan B; tuy nhiên, các thuốc này có nhiều nhược điểm khác nhau (ví dụ, dễ phát triển tình trạng kháng thuốc sau khi sử dụng hoặc có tác dụng hạn chế). Ví dụ, interferon dễ gây ra các phản ứng bất lợi; và các chất tương tự nucleosit có các vấn đề về khả năng kháng thuốc và tái phát bệnh sau khi ngừng thuốc. Do đó, nếu sự biểu hiện gen của virut có thể bị bất hoạt ở cấp độ gen để phong bế sự sản sinh và sao chép của HBV, từ đó làm giảm cơ bản quá trình chuyển hóa của virut và lây nhiễm sang tế bào gan, thì đầy chắc chắn sẽ là phương pháp lý tưởng nhất để điều trị viêm gan B. ARN can thiệp kích thước nhỏ (siARN) có thể ức chế hoặc phong bế sự biểu hiện của bất kỳ gen đích cần quan tâm, ví dụ, gen khởi phát bệnh như bệnh ung thư, theo cách đặc hiệu trình tự dựa trên cơ chế can thiệp ARN (ARNi), nhờ đó đạt được mục đích điều trị bệnh.

Sự biến đổi được ổn định hóa của siARN và hệ thống phân phối của nó là hai công nghệ then chốt trong sự phát triển thuốc ARN nhỏ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến liên hợp siARN có cấu trúc như được thể hiện bằng công thức (1):



Công thức (1),

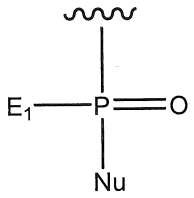
trong đó,

n1 là số nguyên từ 1-3, và n3 là số nguyên từ 0-4;

mỗi m1, m2, và m3 độc lập là số nguyên từ 2-10;

mỗi R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} độc lập là H hoặc được chọn từ nhóm bao gồm C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} haloalkyl và C_1-C_{10} alkoxy;

R_3 là nhóm có cấu trúc như được thể hiện bằng công thức A59:



(A59),

trong đó E_1 là OH, SH hoặc BH_2; và

Nu là siARN.

Mỗi nucleotit trong siARN độc lập là nucleotit biến đổi hoặc không biến đổi. SiARN chứa chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa, trong đó chuỗi có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit 1, và chuỗi đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit 2; trình tự nucleotit 1 và trình tự nucleotit 2 bổ sung đảo ít nhất một phần để tạo thành vùng chuỗi kép; trình tự nucleotit 1 có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:155; và trình tự nucleotit 2 có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156:

5'- CCUUGAGGCAUACUUCAAZ -3' (SEQ ID NO: 155);

5'- Z'UUGAAGUAUGCCUCAAGG -3' (SEQ ID NO: 156);

trong đó,

Z là A; Z' là U;

trình tự nucleotit 1 chứa nucleotit Z_A tại vị trí tương ứng với Z;

trình tự nucleotit 2 chứa nucleotit Z'_B tại vị trí tương ứng với Z'; nucleotit Z'_B là nucleotit thứ nhất từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa;

R_2 là alkylen mạch thẳng có chiều dài từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon được thay thế tùy ý bằng bất kỳ một hoặc nhiều nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, $S(O)_2$, C_2-C_{10} alkeylen, C_2-C_{10} alkynylen, C_6-C_{10} arylen, C_3-C_{18} heteroxyclylen, và C_5-C_{10} heteroarylen, và trong đó R_2 tùy ý được thế bằng bất kỳ một hoặc nhiều nhóm bao gồm: C_1-C_{10} alkyl, C_6-C_{10} aryl, C_5-C_{10} heteroaryl, C_1-C_{10} haloalkyl, -OC_1-C_{10} alkyl, -OC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-OH, -OC_1-C_{10} haloalkyl, -SC_1-C_{10} alkyl, -SC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-SH, -SC_1-C_{10} haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH_2, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2, -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -NH(C_1-C_{10} alkyl), xyano, nitro, -CO_2H, -C(O)OC_1-C_{10} alkyl, -CON(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -CONH(C_1-C_{10} alkyl), -$CONH_2$, -NHC(O)(C_1-C_{10} alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C_1-C_{10} alkyl, -C(O)C_1-C_{10} alkylphenyl, -C(O)C_1-C_{10} haloalkyl, -OC(O)C_1-C_{10} alkyl, -SO_2(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2(phenyl), -SO_2(C_1-C_{10} haloalkyl), -SO_2NH_2, -SO_2NH(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2NH(phenyl), -NHSO_2(C_1-C_{10} alkyl), -NHSO_2(phenyl), và -NHSO_2(C_1-C_{10} haloalkyl);

mỗi L_1 độc lập là alkylen mạch thẳng có chiều dài từ 1 đến 70 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon được thay thế tùy ý bằng bất kỳ một hoặc nhiều nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, $S(O)_2$, C_2-C_{10} alkeylen, C_2-C_{10} alkynylen, C_6-C_{10} arylen, C_3-C_{18} heteroxyclylen, và C_5-C_{10} heteroarylen, và trong đó L_1 được thế tùy ý bằng bất kỳ một hoặc nhiều nhóm bao gồm: C_1-C_{10} alkyl, C_6-C_{10} aryl, C_5-C_{10} heteroaryl, C_1-C_{10} haloalkyl, -OC_1-C_{10} alkyl, -OC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-OH, -OC_1-C_{10} haloalkyl, -SC_1-C_{10} alkyl, -SC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-SH, -SC_1-C_{10} haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH_2, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2, -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -NH(C_1-C_{10} alkyl), xyano, nitro, -CO_2H, -C(O)OC_1-C_{10} alkyl,

-CON(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -CONH(C_1-C_{10} alkyl), -$CONH_2$, -NHC(O)(C_1-C_{10} alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C_1-C_{10} alkyl, -C(O)C_1-C_{10} alkylphenyl, -C(O)C_1-C_{10} haloalkyl, -OC(O)C_1-C_{10} alkyl, -SO_2(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2(phenyl), -SO_2(C_1-C_{10} haloalkyl), -SO_2NH_2, -SO_2NH(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2NH(phenyl), -NHSO_2(C_1-C_{10} alkyl), -NHSO_2(phenyl), và -NHSO_2(C_1-C_{10} haloalkyl);

là vị trí mà nhóm được liên kết với phần còn lại của phân tử;

M_1 là nhóm gắn đích.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế thể liên hợp, bao gồm monome nucleosit liên kết liên tục theo hướng 3' đến 5' theo loại nucleotit và trình tự của chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa của siARN tương ứng, trong điều kiện tổng hợp pha rắn phosphoramidit, trong đó sự liên kết của mỗi monome nucleosit bao gồm bốn bước phản ứng khử bảo vệ, liên kết, gắn mũ, và oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa; phân lập chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa của siARN; và bắt cặp; trong đó, mỗi nucleotit trong siARN độc lập là nucleotit biến đổi hoặc không biến đổi; siARN chứa chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa, trong đó chuỗi có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit 1, và chuỗi đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit 2; trình tự nucleotit 1 và trình tự nucleotit 2 bổ sung đảo ít nhất một phần để tạo thành vùng chuỗi kép; trình tự nucleotit 1 có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:155; và trình tự nucleotit 2 có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156:

5'- CCUUGAGGCAUACUUCAAZ -3' (SEQ ID NO: 155);

5'- Z'UUGAAGUAUGCCUCAAGG -3' (SEQ ID NO: 156);

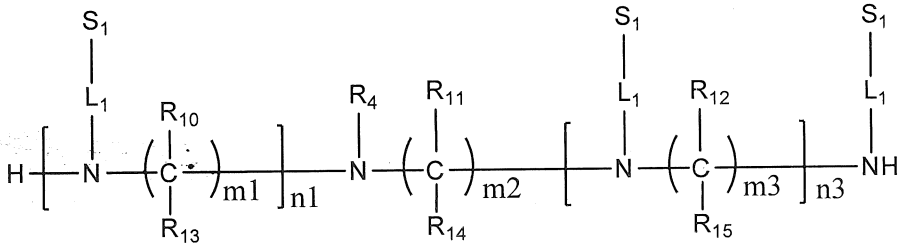
trong đó,

Z là A; Z' là U;

trình tự nucleotit 1 chứa nucleotit Z_A tại vị trí tương ứng với Z;

trình tự nucleotit 2 chứa nucleotit Z'_B tại vị trí tương ứng với Z'; nucleotit Z'_B là nucleotit thứ nhất từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa;

Ngoài ra, phương pháp còn bao gồm việc cho tiếp xúc hợp chất được thể hiện bằng công thức (321) với monome nucleosit hoặc trình tự nucleotit được liên kết với giá đỡ pha rắn trong điều kiện phản ứng liên kết với sự có mặt của chất liên kết, nhờ đó liên kết hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) với trình tự nucleotit bằng phản ứng liên kết. Sau đây, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) cũng được gọi là phân tử liên hợp.



Công thức (321)

trong đó,

R_4 là gốc có khả năng liên kết với siARN được đại diện bởi Nu; theo một số phương án, R_4 là gốc có khả năng liên kết với siARN được đại diện bởi Nu thông qua liên kết đồng hóa trị; theo một số phương án, R_4 là gốc bao gồm bất kỳ nhóm chức có thể được liên hợp với siARN được đại diện bởi Nu thông qua liên kết phosphodieste bằng phản ứng;

mỗi S_1 độc lập là một nhóm trong M_1 được tạo thành bằng cách thế toàn bộ hydroxyl hoạt tính bằng nhóm được đại diện bởi công thức YCOO-, trong đó mỗi Y độc lập được chọn từ nhóm bao gồm metyl, triflometyl, diflometyl, monoflometyl, triclometyl, diclometyl, monoclometyl, etyl, n-propyl, isopropyl, phenyl, halophenyl, và alkylphenyl;

các định nghĩa và tùy chọn của n1, n3, m1, m2, m3, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, L_1, và M_1 lần lượt như được mô tả bên trên.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến siARN có khả năng ức chế sự biểu hiện của gen virut viêm gan B (HBV), siARN bao gồm chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa, cả hai chuỗi bao gồm nucleotit biến đổi có flo và nucleotit biến đổi không có flo; trong đó, chuỗi có nghĩa chứa đoạn trình tự nucleotit I; chuỗi đối nghĩa chứa đoạn trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II bổ sung đảo ít nhất một phần để tạo thành vùng chuỗi kép; trong đó, trình tự nucleotit I chứa trình tự nucleotit A, có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:155; và trình tự nucleotit II chứa trình tự nucleotit B, có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156:

5'- CCUUGAGGCAUACUUCAAZ -3' (SEQ ID NO: 155);

5'- Z'UUGAAGUAUGCCUCAAGG -3' (SEQ ID NO: 156);

trong đó,

Z là A; Z' là U;

trình tự nucleotit A chứa nucleotit Z_A tại vị trí tương ứng với Z;

trình tự nucleotit B chứa nucleotit Z'_B tại vị trí tương ứng với Z'; nucleotit Z'_B là nucleotit thứ nhất từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa; và

nucleotit biến đổi có flo được đặt trong trình tự nucleotit A và B;

theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 là nucleotit biến đổi có flo; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 là nucleotit biến đổi có flo.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến dược phẩm, bao gồm siARN được bộc lộ ở đây và chất mang dược dụng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến liên hợp siARN, chứa siARN được bộc lộ ở đây và nhóm liên hợp được liên kết liên hợp với siARN; siARN chứa chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa, các chuỗi này bao gồm nucleotit biến đổi có flo và nucleotit biến đổi không có flo; trong đó, chuỗi có nghĩa chứa đoạn trình tự nucleotit I; chuỗi đối

nghĩa chứa đoạn trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II bổ sung đảo ít nhất một phần để tạo thành vùng chuỗi kép; trong đó, trình tự nucleotit I chứa trình tự nucleotit A, có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:155; và trình tự nucleotit II chứa trình tự nucleotit B, có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156:

5'- CCUUGAGGCAUACUUCAAZ -3' (SEQ ID NO: 155);

5'- Z'UUGAAGUAUGCCUCAAGG -3' (SEQ ID NO: 156);

trong đó,

Z là A; Z' là U;

trình tự nucleotit A chứa nucleotit Z_A tại vị trí tương ứng với Z;

trình tự nucleotit B chứa nucleotit Z'_B tại vị trí tương ứng với Z'; nucleotit Z'_B là nucleotit thứ nhất từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa; và

nucleotit biến đổi có flo được đặt trong trình tự nucleotit A và B;

theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 là nucleotit biến đổi có flo; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 là nucleotit biến đổi có flo.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến việc sử dụng siARN, và/hoặc dược phẩm và/hoặc liên hợp siARN theo sáng chế trong việc sản xuất thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh lý gây ra bởi việc nhiễm virut viêm gan B (HBV).

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh lý gây ra bởi việc nhiễm virut viêm gan B (HBV), bao gồm việc sử dụng lượng hữu hiệu của siARN, và/hoặc dược phẩm và/hoặc liên hợp siARN theo sáng chế cho bệnh nhân cần được điều trị.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp ức chế sự biểu hiện của gen HBV, bao gồm việc cho tiếp xúc lượng hữu hiệu của siARN biến đổi, và/hoặc dược phẩm và/hoặc liên hợp siARN theo sáng chế với tế bào viêm gan nhiễm HBV.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến bộ kit bao gồm siARN, và/hoặc dược phẩm và/hoặc liên hợp siARN theo sáng chế.

Đưa vào bằng cách viện dẫn

Tất cả các tài liệu công bố, bằng độc quyền sáng chế, và đơn đăng ký sáng chế được đề cập trong bản mô tả này được kết hợp để tham khảo đến cùng phạm vi như thể mỗi tài liệu công bố, bằng độc quyền sáng chế, hoặc đơn đăng ký sáng chế riêng lẻ được chỉ ra một cách cụ thể và riêng lẻ để được kết hợp để tham khảo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện kết quả bán định lượng của thử nghiệm độ ổn định của các thể liên hợp siARN đã thử nghiệm trong Tritosom *in vitro*.

Fig. 2 thể hiện kết quả bán định lượng của thử nghiệm độ ổn định của các thể liên hợp siARN đã thử nghiệm trong Tritosom *in vitro*.

Fig. 3 thể hiện kết quả bán định lượng của thử nghiệm độ ổn định của các thể liên hợp siARN đã thử nghiệm trong huyết tương *in vitro* ở người.

Fig. 4 thể hiện kết quả bán định lượng của thử nghiệm độ ổn định của các thể liên hợp siARN đã thử nghiệm trong huyết tương *in vitro* ở khỉ.

Fig. 5 thể hiện kết quả độ ổn định của thể liên hợp siARN được thử nghiệm trong Tritosom ở gan chuột.

Fig. 6 thể hiện kết quả độ ổn định của thể liên hợp siARN được thử nghiệm trong Lysosom ở gan người.

Fig. 7 là đường cong chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ huyết tương PK/TK đối với thể liên hợp 1 với liều lượng 10 mg/kg trong huyết tương ở chuột.

Fig. 8 là đường cong chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ mô PK/TK đối với thể liên hợp 1 với liều lượng 10 mg/kg trong gan và thận của chuột.

Fig. 9 là đường cong chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ huyết tương PK/TK đối với thể liên hợp 1 với liều lượng 50 mg/kg trong huyết tương ở chuột.

Fig. 10 là đường cong chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ mô PK/TK đối với thể liên hợp 1 với liều lượng 50 mg/kg trong gan và thận của chuột.

Fig. 11 là đường cong chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ huyết tương PK/TK đối với thể liên hợp 6 với liều lượng 10 mg/kg trong huyết tương ở chuột.

Fig. 12 là đường cong chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ mô PK/TK đối với thể liên hợp 6 với liều lượng 10 mg/kg trong gan và thận của chuột.

Fig. 13 là đường cong chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ huyết tương PK/TK đối với thể liên hợp 6 với liều lượng 50 mg/kg trong huyết tương ở chuột.

Fig. 14 là đường cong chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ mô PK/TK đối với thể liên hợp 6 với liều lượng 50 mg/kg trong gan và thận của chuột.

Fig. 15 thể hiện tác dụng ức chế của thể liên hợp 5 và 7 đối với sự biểu hiện mARN HBV ở mô hình chuột 44Bri.

Fig. 16 thể hiện tác dụng ức chế của thể liên hợp 1 và 6 đối với sự biểu hiện mARN HBV ở mô hình chuột 44Bri.

Fig. 17 thể hiện tác dụng ức chế của thể liên hợp 5 và 6 đối với sự biểu hiện mARN HBV ở mô hình chuột 44Bri.

Fig. 18 thể hiện tác dụng ức chế của thể liên hợp 5, 6, 9 và 10 đối với sự biểu hiện mARN HBV ở mô hình chuột 44Bri.

Fig. 19 thể hiện tác dụng ức chế của thể liên hợp 1, 2, 3 và 4 đối với sự biểu hiện mARN HBV ở mô hình chuột 44Bri.

Fig. 20 thể hiện tác dụng ức chế của thể liên hợp 1 đối với sự biểu hiện mARN HBV ở mô hình chuột 44Bri.

Fig. 21 thể hiện thử nghiệm phụ thuộc thời gian trên tác dụng ức chế của siARN trong các thể liên hợp siARN 1 và 6 đối với sự biểu hiện HBsAg huyết thanh trong mô hình chuột AAV-HBV.

Fig. 22 thể hiện thử nghiệm phụ thuộc thời gian trên tác dụng ức chế của siARN trong các thể liên hợp siARN 1 và 6 đối với ADN HBV trong mô hình chuột AAV-HBV.

Fig. 23 thể hiện thử nghiệm phụ thuộc thời gian trên tác dụng ức chế của thể liên hợp 6 đối với sự biểu hiện HBsAg huyết thanh ở mô hình chuột AAV-HBV nồng độ thấp.

Fig. 24 thể hiện thử nghiệm phụ thuộc thời gian trên tác dụng ức chế của thể liên hợp 5 và 6 đối với sự biểu hiện HBsAg huyết thanh trong mô hình M-Tg.

Fig. 25 thể hiện thử nghiệm phụ thuộc thời gian trên tác dụng ức chế của thể liên hợp 6 và 11 đối với sự biểu hiện HBsAg huyết thanh trong mô hình M-Tg.

Fig. 26 thể hiện thử nghiệm phụ thuộc thời gian trên tác dụng ức chế của thể liên hợp 1 đối với sự biểu hiện HBsAg huyết thanh trong mô hình sao chép 1.28.

Fig. 27 thể hiện thử nghiệm phụ thuộc thời gian trên tác dụng ức chế của thể liên hợp 1 đối với ADN HBV trong mô hình sao chép 1.28.

Fig. 28A-28D thể hiện các giá trị IC_{50} của thể liên hợp 1 khi lần lượt gắn đích GSCM, GSSM, PSCM và PSSM.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án cụ thể theo sáng chế được mô tả chi tiết bên dưới. Nên được hiểu rằng các phương án cụ thể được mô tả ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và giải thích theo sáng chế và không được dự định giới hạn sáng chế ở bất kỳ khía cạnh nào.

Định nghĩa

Trong ngữ cảnh theo sáng chế, gen HBV đề cập đến gen có trình tự ADN như được thể hiện trong số truy cập ngân hàng gen NC_003977,1.

Trong ngữ cảnh theo sáng chế, trừ khi được quy định khác, C, G, U, A, và T chỉ chế phẩm bazơ của nucleotit; d chỉ một nucleotit trên phía bên phải của chữ cái d là deoxyribonucleotit; chữ cái m chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái m là nucleotit biến đổi metoxy; f chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái f là nucleotit biến đổi có flo; s đại diện hai nucleotit liền kề với các phía của chữ cái s được

liên kết bằng liên kết phosphorothioat; P1 đại diện nucleotit liền kề với phía bên phải của P1 là nucleotit 5'-phosphat hoặc nucleotit biến đổi tương tự 5'-phosphat, đặc biệt là nucleotit biến đổi vinyl phosphat (được thể hiện là VP trong các ví dụ bên dưới), nucleotit 5'-phosphat (được thể hiện là P trong các ví dụ bên dưới) hoặc nucleotit biến đổi 5'-thiophosphat (được thể hiện là Ps trong các ví dụ bên dưới).

Trong ngữ cảnh theo sáng chế, "nucleotit biến đổi có flo" dùng để chỉ nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nucleotit có flo. "Nucleotit biến đổi không có flo" dùng để chỉ nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nucleotit bằng nhóm không chứa flo, hoặc chất tương tự nucleotit. "Chất tương tự nucleotit" dùng để chỉ nhóm có thể thay thế nucleotit trong axit nucleic, trong khi khác về mặt cấu trúc với adenin ribonucleotit, guanin ribonucleotit, xytosin ribonucleotit, uraxil ribonucleotit hoặc thymin deoxyribonucleotit, như isonucleotit, nucleotit axit nucleic có cầu nối (BNA) hoặc nucleotit axyclic. Nucleotit biến đổi metoxy dùng để chỉ nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza với nhóm metoxy.

Trong ngữ cảnh theo sáng chế, sự biểu hiện "bổ sung" và "bổ sung đảo" có thể được sử dụng thay thế cho nhau, và có ý nghĩa đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, cụ thể là, bazơ trong một chuỗi được bắt cặp bổ sung với bazơ trong chuỗi khác của phân tử axit nucleic chuỗi kép. Trong ADN, adenin bazơ purin (A) thường được bắt cặp với thymin bazơ pyrimidin (T) (hoặc uraxil (U) trong ARN); và guanin bazơ purin (G) thường được bắt cặp với xytosin bazơ pyrimidin (C). Mỗi cặp bazơ chứa purin và pyrimidin. Trong khi adenin trong một chuỗi thường được bắt cặp với thymin (hoặc uraxil) trong chuỗi khác, và guanin thường được bắt cặp với xytosin, hai chuỗi này được coi là bổ sung cho nhau; và trình tự của chuỗi có thể được suy ra từ trình tự của chuỗi bổ sung của nó. Do đó, "bắt cặp nhầm" nghĩa là trong axit nucleic chuỗi kép, bazơ ở các vị trí tương ứng không có mặt theo cách bắt cặp bổ sung.

Trong ngữ cảnh theo sáng chế, trừ khi được quy định khác, "bổ sung đảo về cơ bản" nghĩa là có không nhiều hơn 3 sự bắt cặp nhầm bazơ giữa hai trình tự nucleotit. "Gần như bổ sung đảo" nghĩa là có không nhiều hơn 1 sự bắt cặp nhầm bazơ giữa hai

trình tự nucleotit. "Bổ sung hoàn toàn" nghĩa là không có bắt cặp nhầm bazơ giữa hai trình tự nucleotit.

Trong ngữ cảnh theo sáng chế, khi trình tự nucleotit có "sự khác biệt nucleotit" với trình tự nucleotit khác, bazơ của nucleotit tại cùng vị trí được thay đổi. Ví dụ, nếu nucleotit bazơ trong trình tự thứ hai là A và nucleotit bazơ tại vị trí tương tự trong trình tự thứ nhất là U, C, G hoặc T, hai trình tự nucleotit này được coi là có sự khác biệt nucleotit tại vị trí này. Theo một số phương án, nếu nucleotit tại vị trí được thay thế bằng bazơ nucleotit hoặc chất tương tự nucleotit, cũng được coi rằng có sự khác biệt nucleotit tại vị trí.

Trong ngữ cảnh theo sáng chế, đặc biệt trong phần mô tả của phương pháp điều chế phân tử liên hợp hoặc thể liên hợp siARN theo sáng chế, trừ khi được quy định khác, "monome nucleosit" dùng để chỉ, theo loại và trình tự của nucleotit trong siARN hoặc thể liên hợp siARN được điều chế, "ARN phosphoramidit không biến đổi hoặc biến đổi được sử dụng trong tổng hợp phosphoramidit pha rắn" (ARN phosphoramidit cũng được gọi là nucleosit phosphoramidit ở các chỗ khác). Tổng hợp phosphoramidit pha rắn là phương pháp tổng hợp ARN đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Monome nucleosit được sử dụng trong sáng chế đều có thể có sẵn trên thị trường.

Trong ngữ cảnh theo sáng chế, trừ khi có quy định khác, "liên hợp" dùng để chỉ hai hoặc nhiều gốc hóa học, mỗi gốc có chức năng đặc hiệu được liên kết với nhau thông qua liên kết đồng hóa trị. Do đó, "liên hợp" dùng để chỉ hợp chất được tạo thành bằng liên kết đồng hóa trị của gốc hóa học riêng lẻ. Ngoài ra, "thể liên hợp siARN" là hợp chất được tạo thành bằng liên kết đồng hóa trị siARN và một hoặc nhiều gốc hóa học, mỗi gốc có chức năng đặc hiệu. Theo ngữ cảnh này, thể liên hợp siARN được bộc lộ ở đây đôi khi được viết tắt là "thể liên hợp". Thể liên hợp SiARN nên được hiểu theo ngữ cảnh như thuật ngữ chung của thể liên hợp siARN, thể liên hợp siARN thứ nhất hoặc thể liên hợp siARN thứ hai. Trong ngữ cảnh theo sáng chế, "phân tử liên hợp" nên được hiểu là hợp chất đặc hiệu có khả năng liên hợp với siARN thông qua các phản ứng, nhờ đó cuối cùng tạo thành thể liên hợp siARN theo sáng chế.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, dấu gạch ngang ("-") không được đặt giữa hai chữ cái hoặc ký hiệu được sử dụng để chỉ vị trí đính kèm của phần tử thế. Ví dụ, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2 được gắn qua C_1-C_{10} alkyl.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, "tùy ý" hoặc "tùy chọn" có nghĩa là sự kiện hoặc điều kiện được mô tả sau đó có thể hoặc không thể xảy ra, và phần mô tả bao gồm các trường hợp trong đó sự kiện hoặc điều kiện có thể hoặc không thể xảy ra. Ví dụ, "alkyl tùy ý được thế" bao gồm cả "alkyl" và "alkyl được thế" như được xác định bên dưới. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu, đối với bất kỳ nhóm nào có chứa một hoặc nhiều phần tử thế, các nhóm này được dự định để đưa vào bất kỳ phương pháp thế hoặc mẫu thế là không thực tế về mặt lập thể, không khả thi về mặt tổng hợp và/hoặc vốn không ổn định.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, "alkyl" dùng để chỉ mạch thẳng và mạch nhánh có số chỉ định của nguyên tử cacbon, thường là 1 đến 20 nguyên tử cacbon, ví dụ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, như 1 đến 8 hoặc 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Ví dụ, C_1-C_6 alkyl bao gồm cả alkyl mạch thẳng và mạch nhánh có 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Khi đặt tên cho gốc alkyl có số nguyên tử cacbon cụ thể, toàn bộ dạng mạch nhánh và mạch thẳng có số nguyên tử cacbon đều được bao gồm; nhờ đó, ví dụ, "butyl" có nghĩa là bao gồm n-butyl, sec-butyl, isobutyl và t-butyl; "propyl" bao gồm n-propyl và isopropyl. Alkylen là tập hợp con của alkyl, đề cập đến gốc tương tự như alkyl, nhưng có hai vị trí gắn.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, "alkenyl" dùng để chỉ nhóm alkyl mạch thẳng hoặc nhánh chưa no có ít nhất một liên kết đôi cacbon-cacbon thu được bằng cách loại bỏ tương ứng một phân tử hydro từ hai nguyên tử cacbon liền kề của alkyl gốc. Nhóm có thể là có cấu hình cis hoặc trans của liên kết đôi. Nhóm alkenyl điển hình bao gồm, nhưng không giới hạn ở, etenyl; propenyl như prop-1-en-1-yl, prop-1-en-2-yl, prop-2-en-1-yl (allyl), prop-2-en-2-yl; butenyl như but-1-en-1-yl, but-1-en-2-yl, 2-metyl-prop-1-en-1-yl, but-2-en-1-yl, but-2-en-2-yl, buta-1,3-dien-1-yl, buta-1,3-dien-2-yl; và tương tự. Theo một số phương án, nhóm alkenyl có 2 đến 20 nguyên tử cacbon, và theo các phương án khác, 2 đến 10, 2 đến 8, hoặc 2 đến 6 nguyên tử cacbon.

Alkenylen là tập hợp con của alkenyl, đề cập đến gốc tương tự như alkenyl, nhưng có hai vị trí gắn.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, "alkynyl" dùng để chỉ nhóm alkyl mạch thẳng hoặc nhánh chưa no có ít nhất một liên kết ba cacbon-cabon thu được bằng cách loại bỏ tương ứng hai phân tử hydro từ hai nguyên tử cacbon liền kề của alkyl gốc. Nhóm alkynyl điển hình bao gồm, nhưng không giới hạn ở, etynyl; propynyl như prop-1-yn-1-yl, prop-2-yn-1-yl; butynyl như but-1-yn-1-yl, but-1-yn-3-yl, but-3-yn-1-yl; và tương tự. Theo một số phương án, nhóm alkynyl có 2 đến 20 nguyên tử cacbon, và theo các phương án khác, 2 đến 10, 2 đến 8, hoặc 2 đến 6 nguyên tử cacbon. Alkynylen là tập hợp con của alkynyl, đề cập đến gốc tương tự như alkynyl, nhưng có hai vị trí gắn.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, "alkoxy" dùng để chỉ nhóm alkyl của số chỉ định của nguyên tử cacbon được gắn qua cầu oxy, như, ví dụ, metoxy, etoxy, propoxy, isopropoxy, n-butoxy, sec-butoxy, tert-butoxy, pentyloxy, 2-pentyloxy, isopentyloxy, neopentyloxy, hexyloxy, 2-hexyloxy, 3-hexyloxy, 3-metylpentyloxy, và tương tự. Nhóm alkoxy sẽ thường có 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, hoặc 1 đến 4 nguyên tử cacbon được gắn qua cầu oxy.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, "aryl" dùng để chỉ gốc có nguồn gốc từ hệ vòng hydrocacbon đơn vòng hoặc đa vòng thơm bằng cách loại bỏ nguyên tử hydro từ nguyên tử cacbon dạng vòng. Hệ vòng hydrocacbon đơn vòng hoặc đa vòng thơm chỉ chứa hydro và cacbon, bao gồm 6 đến 18 nguyên tử cacbon, trong đó ít nhất một vòng trong hệ vòng chưa no hoàn toàn, nghĩa là, nó chứa hệ điện tử $(4n+2)$ π có vòng, được chuyển vị theo học thuyết Hückel. Nhóm aryl bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phenyl, fluorenyl, naphtyl và tương tự. Arylen là tập hợp con của aryl, đề cập đến gốc tương tự như aryl, nhưng có hai vị trí gắn.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, "xycloalkyl" dùng để chỉ vòng cacbon không thơm, thường có 3 đến 7 nguyên tử cacbon dạng vòng. Vòng có thể no hoặc có một hoặc nhiều liên kết đôi cacbon-cacbon. Các ví dụ về nhóm xycloalkyl bao gồm

xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclopentenyl, xyclohexyl, và xyclohexenyl, cũng như các nhóm vòng có cầu và giữ như norbornan.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, "phần tử thế halo" hoặc "halo" dùng để chỉ floro, cloro, bromo, và iodo, và thuật ngữ "halogen" bao gồm flo, clo, brom, và iot.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, "haloalkyl" dùng để chỉ alkyl như được định nghĩa bên trên bằng số lượng cụ thể của nguyên tử cacbon được thế bằng một hoặc nhiều nguyên tử halogen, lên đến số lượng tối đa cho phép của nguyên tử halogen. Các ví dụ về haloalkyl bao gồm, nhưng không giới hạn ở, triflometyl, diflometyl, 2-floroetyl, và penta-floroetyl.

"Heteroxyclyl" dùng để chỉ gốc vòng không thơm có 3 đến 18 cạnh ổn định chứa 2 đến 12 nguyên tử cacbon và 1 đến 6 nguyên tử khác loại được chọn từ nitơ, oxy và lưu huỳnh. Trừ khi được chỉ định khác trong phần mô tả, heteroxyclyl là hệ vòng một vòng, hai vòng, ba vòng, hoặc bốn vòng, có thể được bao gồm hệ vòng được ngưng tụ hoặc có cầu. Nguyên tử khác loại trong gốc heteroxyclyl có thể tùy ý được oxy hóa. Một hoặc nhiều nguyên tử nitơ, nếu có, được tạo bậc 4 tùy ý. Heteroxyclyl no một phần hoặc toàn phần. Heteroxyclyl có thể được liên kết với phần còn lại của phân tử thông qua nguyên tử bất kỳ của vòng. Ví dụ về heteroxyclyl này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dioxanyl, thienyl[1,3]disulfonyl, decahydroisoquinolyl, imidazolinyl, imidazolidinyl, isothiazolidinyl, isoxazolidinyl, morpholinyl, octahydroindolyl, octahydroisoindolyl, 2-oxapiperazinyl, 2-oxapiperidinyl, 2-oxapyrimidinyl, oxazolidinyl, piperidinyl, piperazinyl, 4-piperidonyl, pyrolidinyl, pyrazolidinyl, quinuclidinyl, thiazolidinyl, tetrahydrofuryl, trithianyl, tetrahydropyranyl, trisulfonyl, tetrahydropyranyl, thiomorpholinyl, thiamorpholinyl, 1-oxa-thiomorpholinyl, và 1,1-dioxa-thiomorpholinyl.

"Heteroaryl" dùng để chỉ gốc có nguồn gốc từ gốc vòng thơm có 3 đến 18 cạnh chứa 2 đến 17 nguyên tử cacbon và 1 đến 6 nguyên tử khác loại được chọn từ nitơ, oxy và lưu huỳnh. Như được sử dụng trong phần mô tả này, heteroaryl có thể là hệ vòng một vòng, hai vòng, ba vòng hoặc bốn vòng, trong đó ít nhất một vòng trong hệ vòng chưa

no hoàn toàn, nghĩa là, chứa hệ điện tử (4n+2) π có vòng, được chuyển vị theo học thuyết Hückel. Heteroaryl bao gồm hệ vòng ngưng tụ hoặc có cầu. Nguyên tử khác loại trong gốc heteroaryl được oxy hóa tùy ý. Một hoặc nhiều nguyên tử nitơ, nếu có, được tạo bậc 4 tùy ý. Heteroaryl được liên kết với phần còn lại của phân tử qua bất kỳ nguyên tử của vòng. Ví dụ về heteroaryl này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, azepinyl, acridinyl, benzimidazolyl, benzindolyl, 1,3-benzodioxazolyl, benzofuranyl, benzoxazolyl, benzo[d]thiazolyl, benzothiadiazolyl, benzo[*b*][1,4]dioxazolyl, benzo[b][1,4]oxazolyl, 1,4-benzodioxazolyl, benzonaphtofuranyl, benzodiazolyl, benzodioxaphenyl, benzopyranyl, benzopyranonyl, benzofuranyl, benzofuranonyl, benzothienyl, benzothieno[3,2-d]pyrimidinyl, benzotriazolyl, benzo[4,6]imidazo[1,2-a]pyridinyl, carbazolyl, xinolinyl, xyclopenta[d]pyrimidinyl, 6,7-dihydro-5H-xyclopenta[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidinyl, 5,6-dihydrobenzo[h]quinazolinyl, 5,6-dihydrobenzo[h]xinolinyl, 6,7-dihydro-5H-benzo[6,7]xyclohepta[1,2-c]pyridazinyl, dibenzofuranyl, dibenzothienyl, furanyl, furanonyl, furo[3,2-c]pyridinyl, 5,6,7,8,9,10-hexahydroxyclohepta[d]pyrimidinyl, 5,6,7,8,9, 10-hexahydroxycloocta[d]pyridazinyl, 5,6,7,8,9,10-hexahydroxycloocta[d]pyridinyl,isothiazolyl, indazolyl, imidazolyl, indolyl, isoindolyl, indolinyl, isoindolinyl, isoquinolyl, indolizinyl, isoxazolyl, 5,8-methano-5,6,7,8-tetrahydroquinazolinyl, naphtyridinonyl, 1,6-naphtyridinonyl, oxadiazolyl, 2-oxoazepinyl, oxazolyl, oxalyl, 5,6,6a,7,8,9,10,10a-octahydrobenzo[h]quinazolinyl, 1-phenyl-1*H*-pyrolyl, phenazinyl, phenothiazinyl, phenoxazinyl, phtalyl, pteridinyl, purinyl, pyrolyl, pyrazolyl, pyrazolo[3,4-d]pyrimidinyl, pyridinyl, pyrido[3,2-d]pyrimidinyl, pyrido[3,4-d]pyrimidinyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, pyridazinyl, pyrolyl, quinazolinyl, quinoxalinyl, quinolinyl, isoquinolinyl, tetrahydroquinolinyl, 5,6,7,8-tetrahydroquinazolinyl, 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidinyl, 6,7,8,9-tetrahydro-5H-xyclohepta [4,5]thieno[2,3-d]pyrimidinyl, 5,6,7,8-tetrahydropyrido[4,5-c]pyridazinyl, thiazolyl, thiadiazolyl, triazolyl, tetrazolyl,

triazinyl, thieno[2,3-d]pyrimidinyl, thieno[3,2-d]pyrimidinyl, thieno[2,3-c]pridinyl, và thienyl.

Các nhóm bảo vệ hydroxyl khác nhau có thể được sử dụng trong phần mô tả này. Nói chung, nhóm bảo vệ làm cho các chức năng hóa học trở nên trơ trước các điều kiện phản ứng cụ thể, và có thể được gắn vào và loại bỏ khỏi các chức năng đó trong phân tử mà không gây tổn hại đáng kể đến phần còn lại của phân tử. Nhóm bảo vệ hydroxyl tiêu biểu được bộc lộ trong Beaucage, et al., *Tetrahedron* 1992, 48, 2223-2311, và cũng trong Greene và Wuts, Protective Group in Organic Synthesis, Chapter 2, 2d ed, John Wiley & Sons, New York, 1991, mỗi tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một số phương án, nhóm bảo vệ ổn định trong các điều kiện có tính bazơ nhưng có thể được loại bỏ trong các điều kiện có tính axit. Theo một số phương án, ví dụ không loại trừ về nhóm bảo vệ hydroxyl được sử dụng ở đây bao gồm dimetoxytrityl (DMT), monometoxytrityl, 9-phenylxanthen-9-yl (Pixyl), và 9-(p-metoxyphenyl)xanthen-9-yl (Mox). Theo một số phương án, ví dụ không loại trừ về nhóm bảo vệ hydroxyl được sử dụng ở đây bao gồm Tr (trityl), MMTr (4-metoxytrityl), DMTr (4,4'-dimetoxytrityl), và TMTr (4,4',4''-trimetoxytrityl).

Thuật ngữ "đối tượng", như được sử dụng trong phần mô tả này, đề cập đến động vật bất kỳ, ví dụ, động vật có vú hoặc thú có túi. Đối tượng theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, người, động vật linh trưởng không phải người (ví dụ, khỉ nâu hoặc các giống khỉ khác), chuột, lợn, ngựa, lừa, bò, cừu, chuột cống và loài gia cầm bất kỳ.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, "việc điều trị" hoặc "điều trị" hoặc "cải thiện (ameliorating)" hoặc "cải thiện" được sử dụng thay thế cho nhau ở đây. Các thuật ngữ này đề cập đến phương pháp thu được ưu điểm hoặc kết quả mong muốn, bao gồm nhưng không giới hạn ở, lợi ích điều trị. "Lợi ích điều trị" nghĩa là triệt tiêu hoặc cải thiện rối loạn tiềm ẩn cần được điều trị. Tương tự, lợi ích điều trị đạt được bằng cách triệt tiêu hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng sinh lý liên quan đến rối loạn tiềm ẩn sao cho việc cải thiện được quan sát thấy ở bệnh nhân, mặc dù bệnh nhân vẫn có thể bị ảnh hưởng bởi rối loạn tiềm ẩn.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, "phòng ngừa" và "ngăn ngừa" được sử dụng thay thế cho nhau. Các thuật ngữ này đề cập đến phương pháp thu được ưu điểm hoặc kết quả mong muốn, bao gồm nhưng không giới hạn ở, lợi ích phòng ngừa. Để thu được "lợi ích phòng ngừa", thể liên hợp hoặc chế phẩm có thể được dùng cho bệnh nhân có nguy cơ phát triển bệnh cụ thể, hoặc cho bệnh nhân báo cáo một hoặc nhiều triệu chứng sinh lý của bệnh, mặc dù chẩn đoán bệnh này có thể không được thực hiện.

siARN biến đổi

SiARN theo sáng chế chứa nucleotit là đơn vị cấu trúc cơ bản. Được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng nucleotit chứa nhóm phosphat, nhóm riboza và bazơ. Phần mô tả chi tiết liên quan đến các nhóm này được bỏ qua ở đây.

CN102140458B đã bộc lộ siARN ức chế đặc hiệu gen HBV và nghiên cứu các chiến lược biến đổi hóa học khác nhau của siARN. Nghiên cứu này được tìm thấy rằng các chiến lược biến đổi khác nhau có các tác dụng khác nhau hoàn toàn trên thông số của siARN, như độ ổn định, hoạt tính sinh học và độc hại tế bào. Trong thử nghiệm này, 7 cách biến đổi hữu ích được chứng minh. So sánh với siARN không biến đổi, siARN thu được bằng một trong số bảy cách biến đổi cho thấy độ ổn định trong máu tăng lên, trong khi vẫn duy trì hoạt tính ức chế về cơ bản tương đương với siARN không biến đổi.

Sáng chế đề xuất siARN biến đổi có khả năng ức chế sự biểu hiện của gen HBV, chứa chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa, mỗi nucleotit trong siARN là nucleotit biến đổi, trong đó, cả chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa bao gồm nucleotit biến đổi có flo và nucleotit biến đổi không có flo; chuỗi có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit I; chuỗi đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II bổ sung đảo ít nhất một phần để tạo thành vùng chuỗi kép; trong đó, trình tự nucleotit I chứa trình tự nucleotit A, có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:155; và trình tự nucleotit II chứa trình tự nucleotit B, có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156:

5’- CCUUGAGGCAUACUUCAAZ -3’ (SEQ ID NO: 155);

5’- Z’UUGAAGUAUGCCUCAAGG -3’ (SEQ ID NO: 156);

trong đó,

Z là A; Z’ là U;

trình tự nucleotit A chứa nucleotit Z_A tại vị trí tương ứng với Z;

trình tự nucleotit B chứa nucleotit Z'_B tại vị trí tương ứng với Z’; nucleotit Z'_B là nucleotit thứ nhất từ đầu tận 5’ của chuỗi đối nghĩa;

nucleotit biến đổi có flo được đặt trong trình tự nucleotit A và B;

theo hướng từ đầu tận 5’ đến đầu tận 3’, nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit A là nucleotit biến đổi có flo; và theo hướng từ đầu tận 5’ đến đầu tận 3’, nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit B là nucleotit biến đổi có flo. Theo một số phương án, không nhiều hơn 5 nucleotit biến đổi có flo có trong trình tự nucleotit A; và không nhiều hơn 7 nucleotit biến đổi có flo có trong trình tự nucleotit B.

Trong ngữ cảnh này, thuật ngữ “vị trí tương ứng” nghĩa là tại vị trí tương tự trong trình tự nucleotit bằng cách đếm từ đầu tận tương tự của trình tự nucleotit. Ví dụ, nucleotit thứ nhất tại đầu tận 3’ của trình tự nucleotit A là nucleotit tại vị trí tương ứng với nucleotit thứ nhất tại đầu tận 3’ của SEQ ID NO: 155.

Theo một số phương án, chuỗi có nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit I, và chuỗi đối nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit II.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit A có không nhiều hơn 1 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:155; và/hoặc trình tự nucleotit B có không nhiều hơn 1 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156.

Theo một số phương án, sự khác biệt về nucleotit giữa trình tự nucleotit B và trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156 bao gồm sự khác biệt tại vị trí của Z'_B, trong đó Z'_B được chọn từ A, C hoặc G. Theo một số phương án, sự khác biệt về nucleotit là sự khác biệt tại vị trí của Z'_B, trong đó Z'_B được chọn từ A, C hoặc G.

Theo một số phương án, Z_A là nucleotit bổ sung cho Z'_B. Các sự khác biệt về nucleotit này sẽ không làm giảm khả năng đáng kể của siARN để ức chế gen đích, và siARN này bao gồm sự khác biệt về nucleotit cũng nằm trong phạm vi theo sáng chế.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit A về cơ bản bổ sung đảo, gần như bổ sung đảo, hoặc bổ sung đảo hoàn toàn với trình tự nucleotit B. "về cơ bản bổ sung đảo" đề cập đến không nhiều hơn 3 sự bắt cặp nhầm bazơ trong hai trình tự nucleotit. "Gần như bổ sung đảo" đề cập đến không nhiều hơn 1 sự bắt cặp nhầm bazơ trong hai trình tự nucleotit. "Bổ sung đảo hoàn toàn" đề cập đến không có sự bắt cặp nhầm trong hai trình tự nucleotit.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit A là trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 1; và trình tự nucleotit B là trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 2:

5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAAZ_A-3' (SEQ ID NO: 1);

5'-Z'_BUUGAAGUAUGCCUCAAGG-3' (SEQ ID NO: 2);

trong đó, Z'_B là nucleotit thứ nhất từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa; Z_A được chọn từ A, U, G hoặc C; và Z'_B là nucleotit bổ sung cho Z_A; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit A là nucleotit biến đổi có flo; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit B là nucleotit biến đổi có flo.

Theo một số phương án, siARN chứa chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa; trong đó chuỗi có nghĩa chứa đoạn trình tự nucleotit I, và chuỗi đối nghĩa chứa đoạn trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II bổ sung đảo để tạo thành vùng chuỗi kép; trình tự nucleotit I chứa trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:1; và trình tự nucleotit II chứa trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:2:

5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAAZ_A-3' (SEQ ID NO: 1);

5'-Z'_BUUGAAGUAUGCCUCAAGG -3' (SEQ ID NO: 2);

trong đó, Z'_B là nucleotit thứ nhất từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa; Z_A được chọn từ A, U, G hoặc C; và Z'_B là nucleotit bổ sung cho Z_A; theo một số phương án, Z_A là A; và Z'_B là U; và

theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 của SEQ ID NO: 1 trong chuỗi có nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi không có flo; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của SEQ ID NO: 2 trong chuỗi đối nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi không có flo.

Chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa có chiều dài tương tự hoặc khác nhau. Chuỗi có nghĩa có chiều dài là 19-23 nucleotit, và chuỗi đối nghĩa có chiều dài là 20-26 nucleotit. Như vậy, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa trong siARN theo sáng chế có thể là 19/20, 19/21, 19/22, 19/23, 19/24, 19/25, 19/26, 20/20, 20/21, 20/22, 20/23, 20/24, 20/25, 20/26, 21/20, 21/21, 21/22, 21/23, 21/24, 21/25, 21/26, 22/20, 22/21, 22/22, 22/23, 22/24, 22/25, 22/26, 23/20, 23/21, 23/22, 23/23, 23/24, 23/25 hoặc 23/26. Theo một số phương án, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa trong siARN theo sáng chế là 19/21, 21/23 hoặc 23/25.

Theo một phương án theo sáng chế, chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa có chiều dài tương tự. Trình tự nucleotit I cũng chứa trình tự nucleotit III; và trình tự nucleotit II cũng chứa trình tự nucleotit IV. Mỗi trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV độc lập có chiều dài là 1-4 nucleotit; trình tự nucleotit III được liên kết với đầu tận 5' của trình tự nucleotit A; trình tự nucleotit IV được liên kết với đầu tận 3' của trình tự nucleotit B; và trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài tương tự.

Trình tự nucleotit III có thể bổ sung hoặc không bổ sung với trình tự nucleotit IV. Để tăng cường độ ổn định của siARN, theo một số phương án, trình tự nucleotit III là ít nhất bổ sung một phần với trình tự nucleotit IV; theo một số phương án, trình tự nucleotit III bổ sung với nhiều hơn 80% hoặc 90% bazơ trong trình tự nucleotit IV; theo một số

phương án, trình tự nucleotit II gần như bổ sung đảo hoặc bổ sung đảo hoàn toàn với trình tự nucleotit IV; "gần như bổ sung đảo" đề cập đến không nhiều hơn 1 sự bắt cặp nhầm bazơ trong hai trình tự nucleotit; "bổ sung đảo hoàn toàn" đề cập đến không có sự bắt cặp nhầm trong hai trình tự nucleotit; và theo một số phương án, trình tự nucleotit III là bổ sung đảo hoàn toàn với trình tự nucleotit IV. Như vậy, chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa của siARN có chiều dài tương tự, và tỷ lệ chiều dài của nó là 20/20, 21/21, 22/22, hoặc 23/23. Theo một số phương án, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa trong siARN là 21/21 hoặc 23/23.

Theo một số phương án, cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài là 1 nucleotit. Bazơ của trình tự nucleotit III là A, và bazơ của trình tự nucleotit IV là U; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa là 20/20; ngoài ra, cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài là 2 nucleotit; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', chế phẩm bazơ của trình tự nucleotit III là GA, và chế phẩm bazơ của trình tự nucleotit IV là UC; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa là 21/21; ngoài ra, cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài là 3 nucleotit; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', chế phẩm bazơ của trình tự nucleotit III là CGA, và chế phẩm bazơ của trình tự nucleotit IV là UCG; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa là 22/22; ngoài ra, cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài là 4 nucleotit; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', chế phẩm bazơ của trình tự nucleotit III là CCGA, và chế phẩm bazơ của trình tự nucleotit IV là UCGG; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa là 23/23. Theo một số phương án, cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài là 2 nucleotit; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', chế phẩm bazơ của trình tự nucleotit III là GA, và chế phẩm bazơ của trình tự nucleotit IV là UC; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa là 21/21.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit III có cùng chiều dài và bổ sung đảo hoàn toàn với trình tự nucleotit IV. Do vậy, nếu bazơ của trình tự nucleotit III được cung cấp, bazơ của trình tự nucleotit IV là cũng được xác định.

Theo một số phương án, chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa có các chiều dài khác nhau. Trình tự nucleotit II cũng chứa trình tự nucleotit V, có chiều dài là 1-3 nucleotit và được liên kết với đầu tận 3' của chuỗi đối nghĩa, từ đó tạo thành phần nhô ra 3' của chuỗi đối nghĩa. Như vậy, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa trong siARN theo sáng chế có thể là 19/20, 19/21, 19/22, 20/21, 20/22, 20/23, 21/22, 21/23, 21/24, 22/23, 22/24, 22/25, 23/24, 23/25, hoặc 23/26. Theo một số phương án, trình tự nucleotit V có chiều dài là 2 nucleotit. Như vậy, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa trong siARN theo sáng chế có thể là 19/21, 21/23 hoặc 23/25.

Mỗi nucleotit trong trình tự nucleotit V có thể là nucleotit bất kỳ. Theo một số phương án, trình tự nucleotit V là 2 thymidin deoxyribonucleotit (TT) liên tục hoặc 2 uridin ribonucleotit (UU) liên tục; theo một số phương án, trình tự nucleotit V bổ sung cho nucleotit tại vị trí tương ứng của mARN đích.

Theo một số phương án, chuỗi có nghĩa của siARN chứa trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:1, và chuỗi đối nghĩa của siARN chứa trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:3:

5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAZ$_A$-3' (SEQ ID NO: 1);

5'-Z'$_B$ UUGAAGUAUGCCUCAAGGUU-3' (SEQ ID NO: 3);

ngoài ra, chuỗi có nghĩa của siARN chứa trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:1, và chuỗi đối nghĩa của siARN chứa trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:4:

5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAZ$_A$-3' (SEQ ID NO: 1);

5'- Z'$_B$ UUGAAGUAUGCCUCAAGGUC-3' (SEQ ID NO: 4);

trong đó, nucleotit Z'$_B$ là nucleotit thứ nhất từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa; Z$_A$ được chọn từ A, U, G hoặc C; và Z'$_B$ là nucleotit bổ sung cho Z$_A$.

Theo một số phương án theo sáng chế, siARN được bộc lộ ở đây là siHBa1 hoặc siHBa2:

siHBa1

Chuỗi có nghĩa: 5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAA-3' (SEQ ID NO: 5),

Chuỗi đối nghĩa: 5'-UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU-3' (SEQ ID NO: 6),

siHBa2

Chuỗi có nghĩa: 5'-GACCUUGAGGCAUACUUCAAA-3' (SEQ ID NO: 7),

Chuỗi đối nghĩa: 5'-UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCGG -3' (SEQ ID NO: 8).

Như được mô tả ở trên, toàn bộ nucleotit trong siARN theo sáng chế là nucleotit biến đổi. Việc biến đổi nucleotit này sẽ không làm giảm hoặc mất đáng kể chức năng của thể liên hợp siARN theo sáng chế để ức chế sự biểu hiện của gen HBV. Ví dụ, nucleotit biến đổi được bộc lộ bởi J.K. Watts, G. F. Deleavey và M. J.Damha, Chemically Modified siARN: tools and applications. Drug Discov Today, 2008,13(19-20): p,842-55 có thể được lựa chọn.

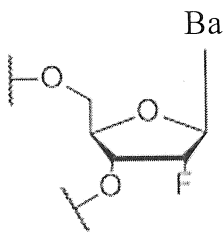
Theo một số phương án, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 hoặc 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit A trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi không có flo; và nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 hoặc 2, 6, 8, 9, 14 và 16 của trình tự nucleotit B trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi không có flo.

Trong ngữ cảnh theo sáng chế, nucleotit biến đổi có flo đề cập đến nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nó bằng nhóm flo, có cấu trúc được thể hiện bởi công thức (107). Nucleotit biến đổi không có flo đề cập đến nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nhóm không chứa flo, hoặc chất tương tự nucleotit. Theo một số phương án, mỗi nucleotit biến đổi không có flo độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nó bằng nhóm không chứa flo, và chất tương tự nucleotit.

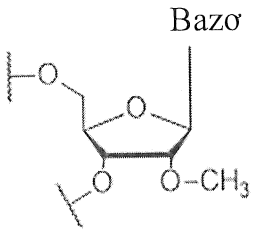
Nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nhóm không chứa flo được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật

này, và có thể được chọn từ một trong số nucleotit biến đổi 2'-alkoxy, nucleotit biến đổi được thế 2'-alkoxy, nucleotit biến đổi 2'-alkyl, nucleotit biến đổi được thế 2'-alkyl, nucleotit biến đổi 2'-amino, nucleotit biến đổi được thế 2'-amino và nucleotit 2'-deoxy.

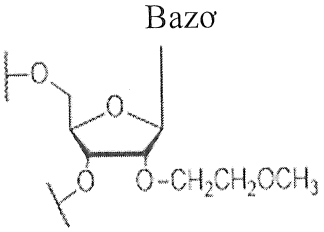
Theo một số phương án, nucleotit biến đổi 2'-alkoxy là nucleotit biến đổi metoxy (2'-OMe), như được thể hiện bởi công thức (108). Theo một số phương án, nucleotit biến đổi được thế 2'-alkoxy là, ví dụ, nucleotit biến đổi (2'-MOE) 2'-O-metoxyetoxy như được thể hiện bởi công thức (109). Theo một số phương án, nucleotit biến đổi (2'-NH_2) 2'-amino là như được thể hiện bởi công thức (110). Theo một số phương án, nucleotit 2'-deoxy (DNA) là như được thể hiện bởi công thức (111).



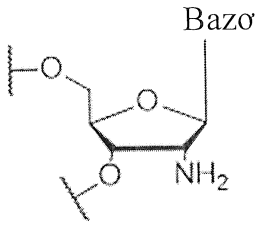
Công thức (107)



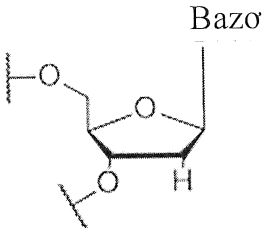
Công thức (108)



Công thức (109)



Công thức (110)

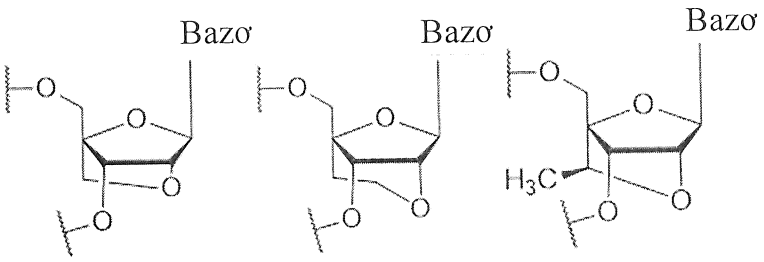


Công thức (111).

"Chất tương tự nucleotit" dùng để chỉ nhóm có thể thay thế nucleotit trong axit nucleic, trong khi có cấu trúc khác với adenin ribonucleotit, guanin ribonucleotit, xytosin ribonucleotit, uraxil ribonucleotit hoặc thymin deoxyribonucleotit. Theo một số phương án, chất tương tự nucleotit có thể là isonucleotit, axit nucleic có cầu nối (BNA) nucleotit hoặc axyclic nucleotit.

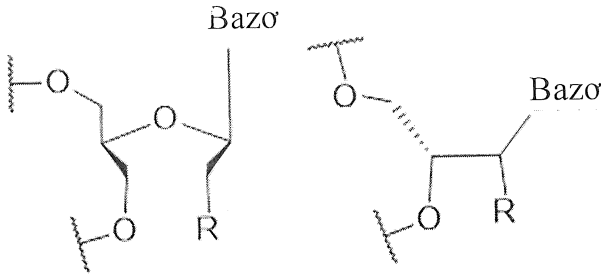
BNA là nucleotit bị miễn cưỡng hoặc không dễ bị ảnh hưởng. BNA có thể chứa 5, 6 cạnh hoặc thậm chí cấu trúc vòng có cầu có 7 cạnh với chế độ gấp phân tử đường C3'-endo "cố định". Cầu điển hình được bao gồm ở vị trí 2' và 4' của riboza để thu được

nucleotit 2', 4'-BNA. Theo một số phương án, BNA có thể là LNA, ENA và cET BNA, như được thể hiện bởi công thức (112), (113) và (114), tương ứng.



Công thức (112) Công thức (113) Công thức (114).

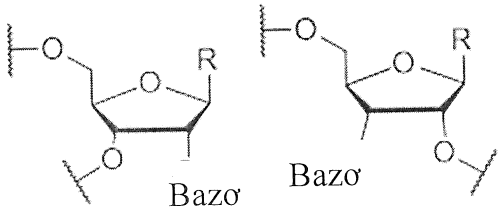
Axyclic nucleotit là nucleotit trong đó vòng riboza được mở. Theo một số phương án, axyclic nucleotit có thể là axit nucleic không bị khóa (UNA) nucleotit và glyxerol axit nucleic (GNA) nucleotit, như được thể hiện bởi công thức (115) và (116), tương ứng.



Công thức (115) Công thức (116),

trong đó R là H, OH hoặc alkoxy (O-alkyl).

Isonucleotit là nucleotit trong đó vị trí của bazơ trên vòng riboza thay đổi. Theo một số phương án, isonucleotit có thể là hợp chất trong đó bazơ được chuyển vị từ vị trí 1' sang vị trí 2' hoặc 3' trên vòng riboza, như được thể hiện bởi công thức (117) hoặc (118) tương ứng.



Công thức (117) Công thức (118),

trong đó "bazơ" là bazơ, như A, U, G, C hoặc T; R là H, OH, F hoặc nhóm không chứa floro được mô tả ở trên.

Theo một số phương án, chất tương tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm isonucleotit, LNA, ENA, cET, UNA, và GNA. Theo một số phương án, mỗi nucleotit biến đổi không có flo là nucleotit biến đổi metoxy. Trong ngữ cảnh theo sáng chế, nucleotit biến đổi metoxy đề cập đến nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza với nhóm metoxy.

Trong ngữ cảnh theo sáng chế, "nucleotit biến đổi có flo", "nucleotit biến đổi 2'-flo", "nucleotit trong đó 2'-hydroxy của nhóm riboza được thế bằng flo" và "2'-flororibosyl" có cùng ý nghĩa, đề cập đến nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza với flo, có cấu trúc như được thể hiện bằng công thức (107). "Nucleotit biến đổi metoxy", "2'-nucleotit biến đổi metoxy", "nucleotit trong đó 2'-hydroxy của nhóm riboza được thế bằng metoxy" và "2'-metoxyribosyl" có cùng ý nghĩa, đề cập đến nucleotit mà 2'-hydroxy của nhóm riboza trong nucleotit được thế bằng metoxy, có cấu trúc như được thể hiện bằng công thức (108).

Theo một số phương án, nucleotit biến đổi có flo được đặt trong trình tự nucleotit A và B; không nhiều hơn 5 nucleotit biến đổi có flo có trong trình tự nucleotit A, và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 trong trình tự nucleotit A là nucleotit biến đổi có flo; không nhiều hơn 7 nucleotit biến đổi có flo có trong trình tự nucleotit B, và nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 trong trình tự nucleotit B là nucleotit biến đổi có flo.

Theo một số phương án, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 hoặc 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit A trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi không có flo; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 hoặc 2, 6, 8, 9, 14 và 16 của trình tự nucleotit B trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi không có flo.

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế là A với các biến đổi sau: theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 hoặc 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit A trong chuỗi có nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi metoxy; và nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 hoặc 2, 6, 8, 9, 14 và 16 của trình tự nucleotit B trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi metoxy.

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế là siARN với các biến đổi sau: theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit A trong chuỗi có nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi metoxy; và, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 8, 9, 14 và 16 của trình tự nucleotit B trong chuỗi đối nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi metoxy;

ngoài ra, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit A trong chuỗi có nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi metoxy; và, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit B trong chuỗi đối nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi metoxy;

ngoài ra, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit A trong chuỗi có nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi metoxy; và, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit B trong chuỗi đối nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi metoxy.

Nói cách khác, nhóm riboza trong khung phosphat-riboza của siARN tương ứng có các nhóm biến đổi sau: theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nhóm riboza của nucleotit tại các vị trí 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit A trong chuỗi có nghĩa của siARN là 2'-flororibosyl, và nhóm riboza của nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa của siARN là 2'-metoxyribosyl; và, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nhóm riboza của nucleotit tại các vị trí 2, 6, 8, 9, 14 và 16 của trình tự nucleotit B trong chuỗi đối nghĩa của siARN là 2'-flororibosyl, và nhóm riboza của nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa của siARN là 2'-metoxyribosyl;

ngoài ra, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nhóm riboza của nucleotit tại các vị trí 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit A trong chuỗi có nghĩa của siARN là 2'-flororibosyl, và nhóm riboza của nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa của siARN là 2'-metoxyribosyl; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nhóm riboza của nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit B trong chuỗi đối nghĩa của siARN là 2'-flororibosyl, và nhóm riboza của nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa của siARN là 2'-metoxyribosyl;

ngoài ra, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nhóm riboza của nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit A trong chuỗi có nghĩa của siARN là 2'-flororibosyl, và nhóm riboza của nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa của siARN là 2'-metoxyribosyl; và, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nhóm riboza của nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit B trong chuỗi đối nghĩa của siARN là 2'-flororibosyl, và nhóm riboza của nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa của siARN là 2'-metoxyribosyl.

Theo một số phương án, siARN được đưa ra ở đây là siHBa1M1, siHBa1M2, siHBa2M1or siHBa2M2:

siHBa1M1

Chuỗi có nghĩa:

5'-CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3' (SEQ ID NO: 9),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm -3’ (SEQ ID NO: 10),

siHBa1M2

Chuỗi có nghĩa:

5’-CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 11),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm -3’ (SEQ ID NO: 12),

siHBa2M1

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 13),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm -3’ (SEQ ID NO: 14),

siHBa2M2

Chuỗi có nghĩa:

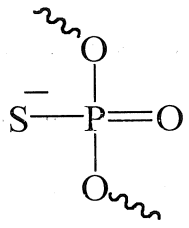
5’-GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 15),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-
UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm -3’
(SEQ ID NO: 16),

trong đó, C, G, U, và A chỉ chế phẩm bazơ của nucleotit; m chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái m là nucleotit biến đổi 2’-metoxy; f chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái f là nucleotit biến đổi 2’-flo. SiARN với các biến đổi nói trên không chỉ có thể được cung cấp với chi phí thấp hơn, mà còn cho phép ribonucleaza trong máu ít có khả năng cắt axit nucleic để tăng độ ổn định của axit nucleic và cho phép axit nucleic có khả năng kháng mạnh hơn đối với sự thủy phân nucleaza.

Theo một số phương án, ít nhất một vị trí của nhóm phosphat trong khung phosphat-riboza của ít nhất một chuỗi đơn trong chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa của siARN được đề xuất bởi sáng chế là nhóm phosphat với các nhóm biến đổi. Theo một số phương án, nhóm phosphat với các nhóm biến đổi là nhóm phosphorothioat được tạo thành bằng cách thế ít nhất một nguyên tử oxy trong liên kết phosphodieste trong nhóm phosphat với nguyên tử lưu huỳnh; và theo một số phương án nhóm phosphat với các nhóm biến đổi là nhóm phosphorothioat có cấu trúc như được thể hiện bằng công thức (101):



Công thức (101).

Sự biến đổi này làm ổn định cấu trúc chuỗi kép của siARN, nhờ đó duy trì tính đặc hiệu cao và ái lực cao để bắt cặp bazơ.

Theo một số phương án, trong siARN được đề xuất bởi sáng chế, liên kết phosphorothioat tồn tại trong ít nhất một trong số các vị trí sau: vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai tại đầu tận của chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa, vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba tại đầu tận của chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa, hoặc tổ hợp bất

kỳ của nó. Theo một số phương án, liên kết phosphorothioat tồn tại ở toàn bộ vị trí nêu trên ngoại trừ đầu tận 5’ của chuỗi có nghĩa. Theo một số phương án, liên kết phosphorothioat tồn tại ở toàn bộ vị trí nêu trên ngoại trừ đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa. Theo một số phương án, liên kết phosphorothioat tồn tại trong ít nhất một trong số các vị trí sau:

vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai tại đầu tận 5’ của chuỗi có nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba tại đầu tận 5’ của chuỗi có nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai tại đầu tận 3’ của chuỗi có nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba tại đầu tận 3’ của chuỗi có nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai tại đầu tận 5’ của chuỗi đối nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba tại đầu tận 5’ của chuỗi đối nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai tại đầu tận 3’ của chuỗi đối nghĩa; và

vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba tại đầu tận 3’ của chuỗi đối nghĩa.

Theo một số phương án, siARN được đề xuất bởi sáng chế là siHBa1M1S, siHBa1M2S, siHBa2M1S, hoặc siHBa2M2S:

siHBa1M1S

Chuỗi có nghĩa:

5’-CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 17),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm -3’ (SEQ ID NO: 18),

siHBa1M2S

Chuỗi có nghĩa:

5’-CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 19),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm -3’ (SEQ ID NO: 20),

siHBa2M1S

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 21),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm -3’ (SEQ ID NO: 22),

siHBa2M2S

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 23),

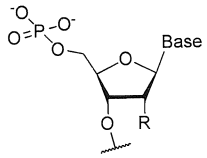
Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm -3’ (SEQ ID NO: 24),

trong đó, C, G, U, và A chỉ chế phẩm bazơ của nucleotit; m chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái m là nucleotit biến đổi metoxy; f chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái f là nucleotit biến đổi có flo; s chỉ liên kết phosphorothioat giữa hai nucleotit liền kề với các bên của chữ cái.

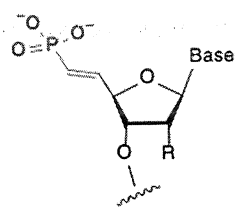
Theo một số phương án, nucleotit đầu tận 5'trong chuỗi đối nghĩa của siARN là nucleotit 5'-phosphat hoặc nucleotit biến đổi tương tự 5'-phosphat.

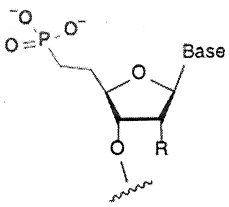
Các loại thông thường của nucleotit 5'-phosphat hoặc nucleotit biến đổi tương tự 5′-phosphat được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này; ví dụ, nucleotit 5'-phosphat có thể có cấu trúc sau:

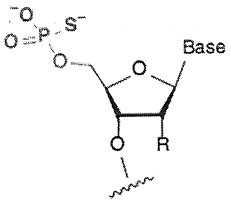


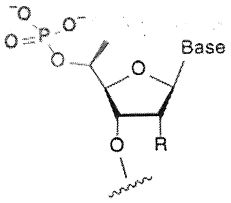
Công thức (102);

đối với ví dụ khác, như được bộc lộ trong Anastasia Khvorova và Jonathan K. Watts, The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nature Biotechnology, 2017, 35(3): 238-48, bốn nucleotit biến đổi tương tự 5′-phosphat như sau:









Công thức (103) Công thức (104) Công thức (105) Công thức (106),

trong đó,

R đại diện nhóm được chọn từ nhóm bao gồm H, OH, metoxy và F;

"Bazơ" đại diện bazơ được chọn từ A, U, C, G, hoặc T.

Theo một số phương án, nucleotit 5'-phosphat là nucleotit với biến đổi 5'-phosphat như được thể hiện bởi công thức (102); nucleotit biến đổi tương tự 5'-phosphat là nucleotit với biến đổi 5'-(E)-vinylphosphonat (E-VP) như được thể hiện bởi công thức (103) hoặc nucleotit biến đổi phosphorothioat như được thể hiện bởi công thức (105).

Theo một số phương án, siARN được đề xuất bởi sáng chế là bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm siHBa1M1P1, siHBa1M2P1, siHBa2M1P1, siHBa2M2P1, siHBa1M1SP1, siHBa1M2SP1, siHBa2M1SP1, và siHBa2M2SP1:

siHBa1M1P1

Chuỗi có nghĩa:

5'-CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3' (SEQ ID NO: 25),

Chuỗi đối nghĩa:

5'-P1-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm -3' (SEQ ID NO: 26),

siHBa1M2P1

Chuỗi có nghĩa:

5'-CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3' (SEQ ID NO: 27),

Chuỗi đối nghĩa:

5'-P1-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm -3' (SEQ ID NO: 28),

siHBa2M1P1

Chuỗi có nghĩa:

5'-GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3' (SEQ ID NO: 29),

Chuỗi đối nghĩa:

5'-P1-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm -3' (SEQ ID NO: 30),

siHBa2M2P1

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 31),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm -3’ (SEQ ID NO: 32),

siHBa1M1SP1

Chuỗi có nghĩa:

5’-CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 33),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm -3’ (SEQ ID NO: 34),

siHBa1M2SP1

Chuỗi có nghĩa:

5’-CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 35),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm -3’ (SEQ ID NO: 36),

siHBa2M1SP1

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 37),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm-3’ (SEQ ID NO: 38),

siHBa2M2SP1

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 39),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm -3’ (SEQ ID NO: 40),

trong đó, C, G, U, và A chỉ chế phẩm bazơ của nucleotit; m chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái m là nucleotit biến đổi 2’-metoxy; f chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái f là nucleotit biến đổi 2’-flo; s đại diện hai nucleotit liền kề với các bên của chữ cái s được liên kết bằng liên kết phosphorothioat; P1 đại diện nucleotit liền kề với phía bên phải của P1 là nucleotit 5’-phosphat hoặc nucleotit biến đổi tương tự 5’-phosphat.

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên thấy rằng siARN được đưa ra ở đây tăng cường đáng kể độ ổn định của huyết tương và tiêu thể, làm giảm tác dụng ngoài đích, trong khi duy trì hoạt tính ức chế gen cao hơn.

SiARN được đưa ra ở đây có thể thu được bằng các phương pháp thông thường để điều chế siARN trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, phương pháp tổng hợp pha rắn và tổng hợp pha lỏng. Trong đó, dịch vụ tùy biến thương mại đã có sẵn cho tổng hợp pha

rắn. Nucleotit biến đổi có thể được đưa vào siARN theo sáng chế bằng cách sử dụng nucleotit monome có biến đổi tương ứng, trong đó phương pháp để điều chế nucleotit monome có biến đổi tương ứng và phương pháp để đưa nucleotit biến đổi vào siARN cũng được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Dược phẩm

Sáng chế đề xuất dược phẩm, bao gồm siARN được mô tả nêu trên làm thành phần hoạt chất, và chất mang dược dụng.

Chất mang dược dụng có thể là chất mang thường được sử dụng trong lĩnh vực sử dụng siARN, ví dụ, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều hạt nano nam châm (như hạt nano trên cơ sở Fe_3O_4 và Fe_2O_3), ống nano cacbon, silic mao quản trung bình, hạt nano canxi phosphat, polyetylenimin (PEI), dendrime polyamidoamin (PAMAM), poly(L-lysin) (PLL), chitosan, 1,2-dioleoyl-3-trimetylamoni-propan (DOTAP), poly(axit D&L-lactic/glycolic) copolyme (PLGA), poly(2-aminoetyl etylen phosphat) (PPEEA), poly(2-dimetylaminoetyl methacrylat) (PDMAEMA), và dẫn xuất của nó.

Theo một số phương án, trong dược phẩm theo sáng chế, không có yêu cầu đặc biệt nào đối với làm lượng của siARN và chất mang dược dụng. Theo một số phương án, tỷ lệ khối lượng của siARN với chất mang dược dụng là 1: (1-500), và theo một số phương án 1: (1-50).

Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa tá dược dược dụng khác, có thể là một hoặc nhiều chế phẩm công thức hoặc hợp chất thông thường khác nhau trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, tá dược dược dụng khác này có thể chứa ít nhất một trong số đệm pH, chất bảo vệ và chất điều áp thẩm thấu.

Đệm pH có thể là dung dịch đệm tris(hydroxymetyl) aminometan hydroclorua có độ pH là 7,5-8,5, và/hoặc dung dịch đệm phosphat có độ pH là 5,5-8,5, tốt hơn là dung dịch đệm phosphat có độ pH là 5,5-8,5.

Chất bảo vệ có thể là ít nhất một trong số inositol, sorbitol, sucroza, trehaloza, manoza, maltoza, lactoza, và glucoza. Hàm lượng của chất bảo vệ có thể nằm trong

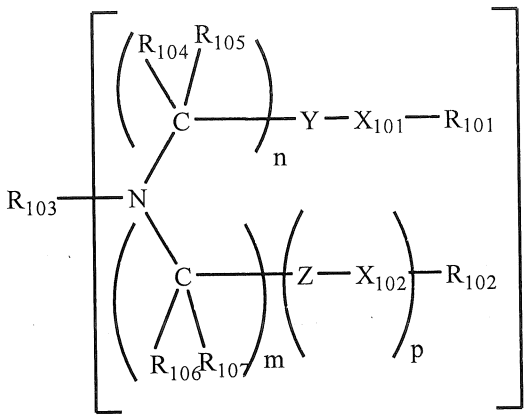
khoảng từ 0,01% khối lượng đến 30% khối lượng trên cơ sở tổng khối lượng của dược phẩm.

Chất điều áp thẩm thấu có thể là natri clorua và/hoặc kali clorua. Hàm lượng của chất điều áp thẩm thấu cho phép áp suất thẩm thấu của dược phẩm là 200-700 milliosmol/kg. Phụ thuộc vào áp suất thẩm thấu mong muốn, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được xác định một cách dễ dàng hàm lượng của chất điều áp thẩm thấu.

Theo một số phương án, dược phẩm có thể là chế phẩm công thức lỏng, ví dụ, dung dịch tiêm; hoặc bột đông khô để tiêm, được trộn với tá dược lỏng để tạo thành chế phẩm công thức lỏng khi dùng. Chế phẩm công thức lỏng có thể được dùng bằng, nhưng không giới hạn ở, đường tiêm dưới da, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch, và cũng có thể được dùng cho, nhưng không giới hạn ở, phổi bằng cách bơm, hoặc các cơ quan khác (như gan) thông qua phổi bằng cách bơm. Theo một số phương án, dược phẩm được dùng bằng tiêm trong tĩnh mạch.

Theo một số phương án, dược phẩm có thể là ở dạng của chế phẩm công thức liposom. Theo một số phương án, chất mang dược dụng được sử dụng trong chế phẩm công thức liposom chứa hợp chất chuyển nhiễm chứa amin (sau đây còn được gọi là amin hữu cơ), lipit trợ giúp và/hoặc lipit được PEG hóa. Trong đó, amin hữu cơ, lipit trợ giúp và lipit được PEG hóa có thể là tương ứng được chọn từ một hoặc nhiều hợp chất chuyển nhiễm chứa amin hoặc muối dược dụng hoặc dẫn xuất của nó, lipit trợ giúp và lipit được PEG hóa như được mô tả trong CN103380113A, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một số phương án, amin hữu cơ có thể là hợp chất như được thể hiện bởi công thức (201) như được mô tả trong CN103380113A hoặc muối dược dụng của nó:



Công thức (201)

trong đó:

X_{101} và X_{102} độc lập với nhau được chọn từ O, S, N-A và C-A, trong đó A là hydro hoặc chuỗi C_1-C_{20} hydrocacbon;

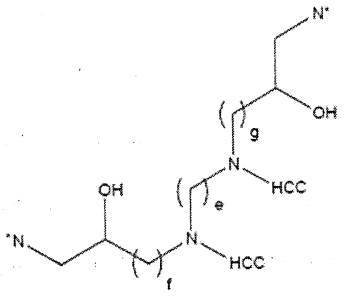
Y và Z độc lập với nhau được chọn từ C=O, C=S, S=O, CH-OH và SO_2;

R_{101}, R_{102}, R_{103}, R_{104}, R_{105}, R_{106} và R_{107} độc lập với nhau được chọn từ hydro; nhóm béo được thế hoặc không được thế, thẳng hoặc có nhánh, cò vòng hoặc không có vòng; nhóm béo khác loại được thế hoặc không được thế, thẳng hoặc có nhánh, có vòng hoặc không có vòng; nhóm axyl được thế hoặc không được thế, thẳng hoặc có nhánh; nhóm aryl được thế hoặc không được thế, thẳng hoặc có nhánh, hoặc nhóm aryl khác loại được thế hoặc không được thế, thẳng hoặc có nhánh;

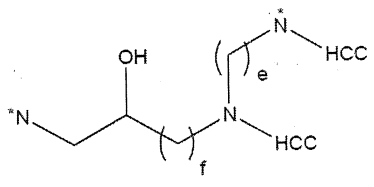
x là số nguyên từ 1 - 10;

n là số nguyên từ 1 - 3, m là số nguyên từ 0 - 20, p là 0 hoặc 1; trong đó nếu m và p đều là 0, thì R_{102} là hydro, và

nếu ít nhất một trong số n hoặc m là 2, thì R_{103} và nitơ trong công thức (201) tạo thành cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (202) hoặc (203):



Công thức (202)

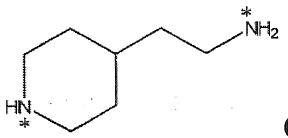


Công thức (203);

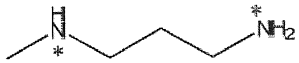
trong đó g, e và f độc lập của nhóm khác là số nguyên từ 1 đến 6, "HCC" là chuỗi hydrocacbon, và mỗi *N là nguyên tử nitơ thể hiện trong công thức (201).

Theo một số phương án, R_{103} là polyamin. Theo các phương án khác, R_{103} là ketal. Theo một số phương án, R_{101} và R_{102} trong công thức (201) độc lập của một nhóm khác là bất kỳ trong số các nhóm alkyl hoặc alkenyl được thế hoặc không được thế, thẳng hoặc có nhánh có 3 - 20 nguyên tử cacbon (như 8 - 18 nguyên tử cacbon) và 0 - 4 liên kết đôi (như 0 - 2 liên kết đôi).

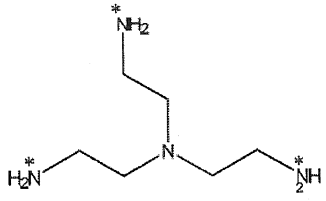
Theo một số phương án, nếu n và m độc lập của một nhóm khác là 1 - 3, R_{103} là bất kỳ trong số các công thức sau (204)-(213):



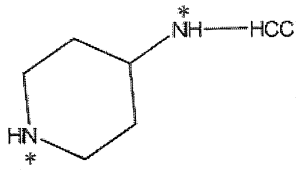
Công thức (204) ,



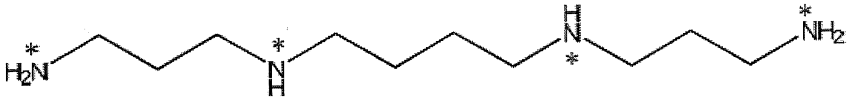
Công thức (205),



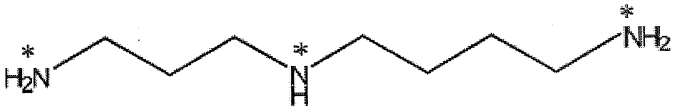
Công thức (206) ,



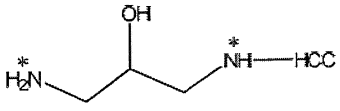
Công thức (207) ,



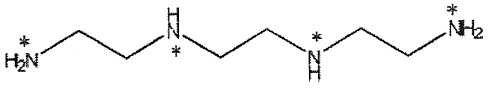
Công thức (208) ,



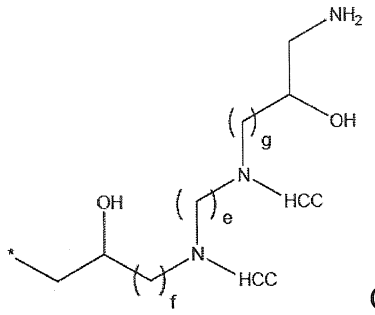
Công thức (209) ,



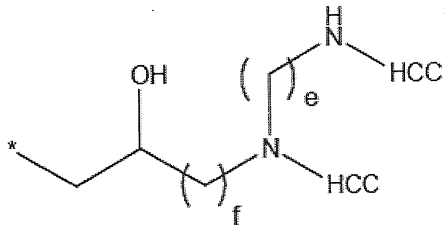
Công thức (210) ,



Công thức (211) ,



Công thức (212) , và

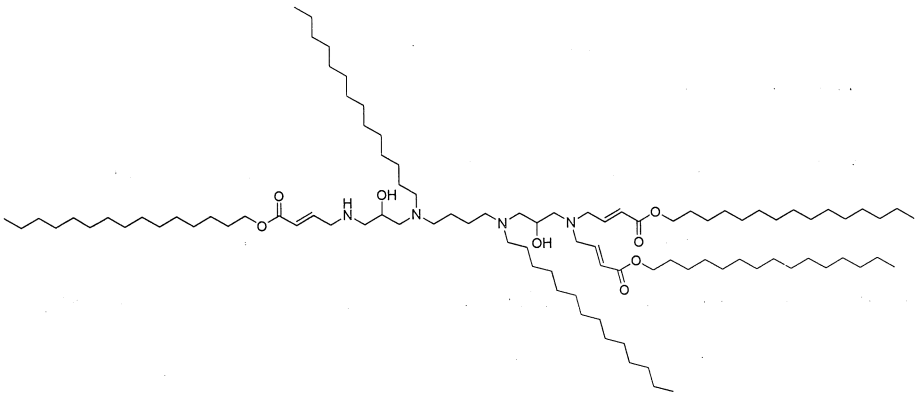


Công thức (213);

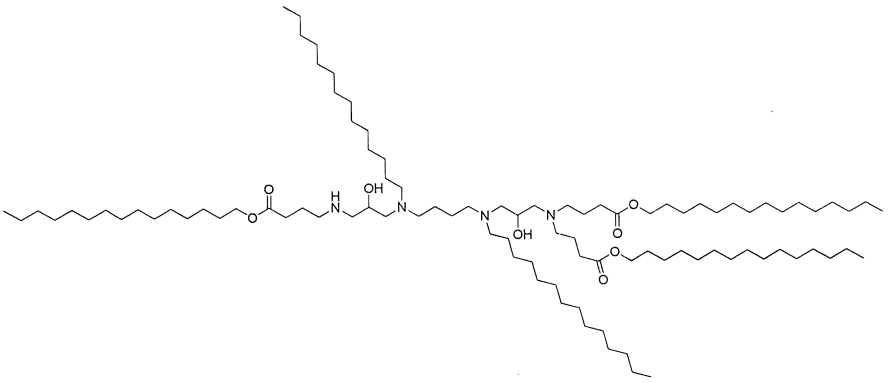
trong đó, mỗi g, e và f độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6; mỗi "HCC" là chuỗi hydrocacbon, và mỗi * là điểm gắn tiềm năng của R_{103} với nguyên tử nitơ trong công thức (201), trong đó mỗi H tại bất kỳ vị trí * có thể được thay thế để nhận ra sự liên kết với nguyên tử nitơ trong công thức (201).

Hợp chất như được thể hiện bằng (201) có thể được điều chế như được mô tả trong CN103380113A.

Theo một số phương án, amin hữu cơ có thể là amin hữu cơ như được thể hiện bởi công thức (214) và/hoặc amin hữu cơ như được thể hiện bởi công thức (215):



Công thức (214),



Công thức (215).

Lipit trợ giúp là cholesteol, chất tương tự cholesteol và/hoặc dẫn xuất cholesteol.

Lipit được PEG hóa là 1,2-dipalmitoyl-sn-glyxero-3-phosphatidyletanol amin-N-[metoxy(polyetylen glycol)]-2000.

Theo một số phương án, tỷ lệ mol trong số amin hữu cơ, lipit trợ giúp, và lipit được PEG hóa trong dược phẩm là (19,7-80): (19,7-80): (0,3-50); ví dụ, tỷ lệ mol có thể là (50-70): (20-40): (3-20).

Theo một số phương án, dược phẩm được tạo thành bằng siARN theo sáng chế và chất chuyển nhiễm chứa amin bên trên có đường kính trung bình nằm trong khoảng từ khoảng 30 nm đến khoảng 200 nm, điển hình nằm trong khoảng từ khoảng 40 nm đến khoảng 135 nm, và điển hình hơn là, đường kính trung bình của các hạt liposom nằm trong khoảng từ khoảng 50 nm đến khoảng 120 nm, nằm trong khoảng từ khoảng 50 nm đến khoảng 100 nm, nằm trong khoảng từ khoảng 60 nm đến khoảng 90 nm, hoặc nằm trong khoảng từ khoảng 70 nm đến khoảng 90 nm, ví dụ, đường kính trung bình của hạt liposom là khoảng 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 hoặc 160 nm.

Theo một số phương án, trong dược phẩm được tạo thành bằng siARN theo sáng chế và chất chuyển nhiễm chứa amin bên trên, tỷ lệ (khối lượng/tỷ lệ khối lượng) của siARN so với tổng lượng lipit, ví dụ, amin hữu cơ, lipit trợ giúp và/hoặc lipit được PEG hóa, phạm vi nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 1:50, nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 1:30, nằm trong khoảng từ khoảng 1:3 đến khoảng 1:20, nằm trong khoảng từ khoảng 1:4 đến khoảng 1:18, nằm trong khoảng từ khoảng 1:5 đến khoảng 1:17, nằm trong khoảng từ khoảng 1:5 đến khoảng 1:15, nằm trong khoảng từ

khoảng 1:5 đến khoảng 1:12, nằm trong khoảng từ khoảng 1:6 đến khoảng 1:12, hoặc nằm trong khoảng từ khoảng 1:6 đến khoảng 1:10. Ví dụ, tỷ lệ của siARN theo sáng chế so với tổng lượng lipit là khoảng1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17 hoặc 1:18 khối lượng.

Theo một số phương án, dược phẩm có thể được bán trên thị trường với mỗi thành phần riêng biệt, và được sử dụng ở dạng của chế phẩm công thức lỏng. Theo một số phương án, dược phẩm được tạo thành bằng siARN theo sáng chế và chất mang dược dụng nêu trên có thể được điều chế bằng các quy trình đã biết khác nhau, ngoại trừ thay thế oligonucleotit chuỗi kép có sẵn với siARN theo sáng chế. Theo một số phương án, dược phẩm có thể được điều chế theo quy trình sau.

Amin hữu cơ, lipit trợ giúp và lipit được PEG hóa được tạo huyền phù trong cồn ở tỷ lệ mol như được mô tả ở trên và được trộn đồng nhất để thu được dung dịch lipit; cồn được sử dụng với lượng sao cho dung dịch lipit thu được có mặt với tổng nồng độ khối lượng là 2 đến 25 mg/mL (ví dụ, 8 đến 18 mg/mL). Cồn là cồn dược dụng, như cồn là ở dạng lỏng ở khoảng nhiệt độ phòng, ví dụ, một hoặc nhiều etanol, propylen glycol, rượu benzyl, glyxerol, PEG 200, PEG 300, PEG 400, tốt hơn là etanol.

SiARN theo sáng chế được hòa tan trong dung dịch muối được tạo đệm để tạo ra dung dịch nước của siARN. Dung dịch muối được tạo đệm có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5 M, như 0,1 đến 0,2 M. Độ pH của dung dịch muối được tạo đệm được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,5, như 5,0 đến 5,2. Dung dịch muối được tạo đệm được sử dụng với lượng sao cho siARN có mặt ở nồng độ ít hơn 0,6 mg/ml, như 0,2 đến 0,4 mg/mL. Muối được tạo đệm có thể là một hoặc nhiều muối được chọn từ nhóm bao gồm axetat hòa tan được và xitrat hòa tan được, như natri axetat và/hoặc kali axetat.

Dung dịch lipit và dung dịch nước của siARN được trộn. Sản phẩm thu được sau khi trộn được ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C trong ít nhất 2 phút (ví dụ, 5 đến 30 phút) để tạo ra chế phẩm công thức lipit được ủ. Tỷ lệ thể tích của dung dịch lipit với dung dịch nước của siARN là 1: (2-5), như 1:4.

Chế phẩm công thức lipit đã ủ được cô hoặc pha loãng, được tinh chế để loại bỏ tạp chất, và sau đó được vô trùng để thu được dược phẩm theo sáng chế, có thông số lý hóa như sau: độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8, phần trăm bao nang nhiều hơn 80%, kích cỡ hạt là 40 đến 200 nm, chỉ số đa phân tán ít hơn 0,30, và áp suất thẩm thấu nằm trong khoảng từ 250 đến 400 mOsm/kg; ví dụ, thông số lý hóa có thể là như sau: độ pH nằm trong khoảng từ 7,2 đến 7,6, phần trăm bao nang nhiều hơn 90%, kích cỡ hạt nằm trong khoảng từ 60 đến 100 nm, chỉ số đa phân tán nhiều hơn 0,20, và áp suất thẩm thấu nằm trong khoảng từ 300 đến 400 mOsm/kg.

Trong đó, bước cô hoặc pha loãng có thể được thực hiện trước, sau hoặc đồng thời với bước loại bỏ tạp chất. Phương pháp loại bỏ tạp chất có thể là phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp có sẵn khác, ví dụ, siêu lọc sử dụng 100 kDa cột sợi rỗng, PBS ở độ pH 7,4 như dung dịch trao đổi siêu lọc và hệ dòng tiếp tuyến. Phương pháp vô trùng có thể là phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp có sẵn khác, như vô khuẩn bằng cách lọc trên bộ lọc 0,22 μm.

Thể liên hợp siARN thứ nhất

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thể liên hợp siARN thứ nhất, chứa siARN được mô tả bên trên và nhóm liên hợp gắn vào đó.

Nhóm liên hợp điển hình chứa ít nhất một nhóm gắn đích dược dụng và chất liên kết tùy chọn. Ngoài ra, siARN, chất liên kết và nhóm gắn đích được liên kết liên tục. Theo một số phương án, có 1 đến 6 nhóm gắn đích. Theo một số phương án, có 2 đến 4 nhóm gắn đích. Phân tử siARN có thể được liên hợp không đồng hóa trị hoặc đồng hóa trị với nhóm liên hợp, ví dụ, phân tử siARN được liên hợp đồng hóa trị với nhóm liên hợp. Vị trí liên hợp giữa siARN và nhóm liên hợp có thể là tại đầu tận 3' hoặc đầu tận 5'của chuỗi có nghĩa của siARN, hoặc tại đầu tận 5'của chuỗi đối nghĩa, hoặc nằm trong trình tự bên trong của siARN. Theo một số phương án, vị trí liên hợp giữa siARN và nhóm liên hợp là tại đầu tận 3'của chuỗi có nghĩa của siARN.

Theo một số phương án, nhóm liên hợp được liên kết với nhóm phosphat, nhóm 2'-hydroxy hoặc bazơ của nucleotit. Theo một số phương án, nhóm liên hợp có thể được

liên kết với nhóm 3'-hydroxy khi nucleotit được liên kết thông qua liên kết 2'-5'-phosphodieste. Khi nhóm liên hợp được liên kết với đầu tận của siARN, nhóm liên hợp được liên kết điển hình với nhóm phosphat của nucleotit; khi nhóm liên hợp được liên kết với trình tự bên trong của siARN, nhóm liên hợp được liên kết điển hình với vòng riboza hoặc bazơ. Đối với liên kết đặc hiệu, có thể tham khảo: Muthiah Manoharan *et.al.* Liên hợp siARN mang N-axetylgalactosamin hóa trị ba được lắp ráp liên tục liên kết thông qua nucleosit gợi ra tác dụng tắt gen mạnh mẽ in vivo trong tế bào gan. ACS Chemical biology,2015,10(5):1181-7.

Theo một số phương án, siARN và nhóm liên hợp có thể được liên kết bằng liên kết hóa học rút gọn được hoặc axit không bền, và các liên kết hóa học này có thể được làm giảm bớt trong môi trường axit của nội bào tế bào, nhờ đó đưa ra siARN ở trạng thái tự do. Đối với chế độ liên hợp không thoái biến, nhóm liên hợp có thể được liên kết với chuỗi có nghĩa của siARN, do đó giảm thiểu ảnh hưởng của sự liên hợp lên hoạt tính của oligonucleotit chuỗi kép.

Theo một số phương án, nhóm gắn đích dược dụng có thể là phối tử thông thường trong lĩnh vực của việc sử dụng oligonucleotit chuỗi kép, ví dụ, các phối tử khác nhau như được mô tả trong WO2009082607A2, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một số phương án, nhóm gắn đích dược dụng có thể được chọn từ một hoặc nhiều phối tử được tạo ra bằng phân tử hoặc dẫn xuất gắn đích của nó như sau: phân tử ưa chất béo, như cholesteol, axit mật, vitamin (như vitamin E), phân tử lipit của chiều dài chuỗi khác nhau; polyme, như polyetylen glycol; polypeptit, như peptit thấm vào tế bào; aptame; kháng thể; chấm lượng tử; sacarit, như lactoza, polylactoza, manoza, galactoza, N-axetylgalactosamin (GalNAc); folat; hoặc phối tử thụ thể được biểu hiện trong tế bào nhu mô gan, như asialoglycoprotein, gốc đường asialo, lipoprotein (như lipoprotein mật độ cao, lipoprotein mật độ thấp), glucagon, chất dẫn truyền thần kinh (như adrenalin), yếu tố tăng trưởng, transferrin và tương tự.

Theo một số phương án, mỗi phối tử độc lập là phối tử có khả năng liên kết với thụ thể bề mặt tế bào. Theo một số phương án, ít nhất một phối tử là phối tử có khả năng liên kết với thụ thể bề mặt tế bào gan. Theo một số phương án, ít nhất một phối tử là phối tử có khả năng liên kết với thụ thể bề mặt tế bào gan động vật có vú. Theo một số phương án, ít nhất một phối tử là phối tử có khả năng liên kết với thụ thể bề mặt tế bào gan ở người. Theo một số phương án, ít nhất một phối tử là phối tử có khả năng liên kết với thụ thể bề mặt asialoglycoprotein gan (ASGP-R). Các loại của phối tử này là biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và chúng thường có chức năng liên kết với thụ thể đặc hiệu trên bề mặt của tế bào đích, nhờ đó điều tiết sự vận chuyển của oligonucleotit chuỗi kép được liên kết với phối tử vào tế bào đích.

Theo một số phương án, nhóm gắn đích dược dụng có thể là phối tử bất kỳ liên kết với thụ thể asialoglycoprotein (ASGP-R) trên bề mặt của tế bào gan động vật có vú. Theo một phương án, mỗi phối tử độc lập được chọn từ asialoglycoprotein, như asialoorosomucoid (ASOR) hoặc asialofetuin (ASF). Theo một số phương án, phối tử là sacarit hoặc dẫn xuất của nó.

Theo một số phương án, ít nhất một phối tử là sacarit. Theo một số phương án, mỗi phối tử là sacarit. Theo một số phương án, ít nhất một phối tử là monosacarit, polysacarit, monosacarit biến đổi, polysacarit biến đổi, hoặc dẫn xuất của nó. Theo một số phương án, ít nhất một phối tử có thể là monosacarit, disacarit hoặc trisacarit. Theo một số phương án, ít nhất một phối tử là sacarit biến đổi. Theo một số phương án, mỗi phối tử là sacarit biến đổi. Theo một số phương án, mỗi phối tử độc lập được chọn từ nhóm bao gồm polysacarit, polysacarit biến đổi, monosacarit, monosacarit biến đổi, dẫn xuất polysacarit và dẫn xuất monosacarit. Theo một số phương án, mỗi phối tử hoặc ít nhất một phối tử có thể độc lập được chọn từ nhóm bao gồm glucoza và dẫn xuất của nó, manoza và dẫn xuất của nó, galactoza và dẫn xuất của nó, xyloza và dẫn xuất của nó, riboza và dẫn xuất của nó, fucoza và dẫn xuất của nó, lactoza và dẫn xuất của nó, maltoza và dẫn xuất của nó, arabinoza và dẫn xuất của nó, fructoza và dẫn xuất của nó, và axit sialic.

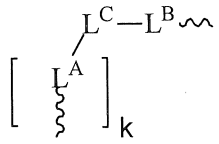
Theo một số phương án, mỗi phối tử có thể độc lập được chọn từ nhóm bao gồm D-mannopyranoza, L-mannopyranoza, D-arabinoza, D-xylofuranoza, L-xylofuranoza, D-glucoza, L-glucoza, D-galactoza, L-galactoza, α-D-mannofuranoza, β-D-mannofuranoza, α-D-mannopyranoza, β-D-mannopyranoza, α-D-glucopyranoza, β-D-glucopyranoza, α-D-glucofuranoza, β-D-glucofuranoza, α-D-fructofuranoza, α-D-fructopyranoza, α-D-galactopyranoza, β-D-galactopyranoza, α-D-galactofuranoza, β-D-galactofuranoza, glucosamin, axit sialic, galactosamin, N-axetylgalactosamin, N-trifloroaxetylgalactosamin, N-propionylgalactosamin, N-n-butyrylgalactosamin, N-isobutyrylgalactosamin, 2-amino-3-O-[(R)-1-carboxyetyl]-2-deoxy-β-D-glucopyranoza, 2-deoxy-2-metylamino-L-glucopyranoza, 4,6-dideoxy-4-formamido -2,3-di-O-metyl-D-mannopyranoza, 2-deoxy-2-sulfoamino-D-glucopyranoza, axit N-glycolyl-α -neuraminic, 5-thio-β-D-glucopyranoza, metyl 2,3,4-tris-O-axetyl-1-thio- 6-O-trityl- α-D-glucopyranosit, 4-thio-β-D-galactopyranoza, etyl 3,4,6,7-tetra-O-axetyl-2- deoxy-1,5-dithio-α-D-glucoheptopyranosit, 2,5-anhydro-D- allononitril, riboza, D-riboza, D-4-thioriboza, L-riboza, L-4-thioriboza. Việc lựa chọn phối tử khác có thể được tìm thấy, ví dụ, trong phần mô tả của CN105378082A, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một số phương án, nhóm gắn đích dược dụng trong liên hợp siARN thứ nhất có thể là galactoza hoặc N-axetylgalactosamin, trong đó phân tử galactoza hoặc N-axetylgalactosamin có thể là đơn trị, hóa trị hai, hóa trị ba hoặc hóa trị bốn. Nên được hiểu rằng thuật ngữ đơn trị, hóa trị hai, hóa trị ba hoặc hóa trị bốn được mô tả ở đây tương ứng nghĩa là tỷ lệ mol của phân tử oligonucleotit chuỗi kép với phân tử galactoza hoặc N-axetylgalactosamin trong liên hợp oligonucleotit là 1:1, 1:2, 1:3 hoặc 1:4, trong đó thể liên hợp oligonucleotit được tạo thành từ phân tử oligonucleotit chuỗi kép và nhóm liên hợp chứa phân tử galactoza hoặc N-axetylgalactosamin làm nhóm gắn đích. Theo một số phương án, nhóm gắn đích dược dụng là N-axetylgalactosamin. Theo một số phương án, khi oligonucleotit chuỗi kép theo sáng chế được liên hợp với nhóm liên hợp chứa N-axetylgalactosamin, phân tử N-axetylgalactosamin là hóa trị ba hoặc hóa trị bốn. Theo một số phương án, khi oligonucleotit chuỗi kép theo sáng chế được liên hợp

với nhóm liên hợp chứa N-axetylgalactosamin, phân tử N-axetylgalactosamin là hóa trị ba.

Nhóm gắn đích có thể được liên kết với phân tử siARN thông qua chất liên kết tương ứng, và chất liên kết tương ứng có thể được lựa chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này theo loại đặc hiệu của nhóm gắn đích. Các loại của chất liên kết và nhóm gắn đích và cách thức liên kết với siARN có thể được tìm thấy trong phần mô tả của WO2015006740A2, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một số phương án, khi nhóm gắn đích là N-axetylgalactosamin, chất liên kết thích hợp có thể là cấu trúc sau như được thể hiện bởi công thức (301):

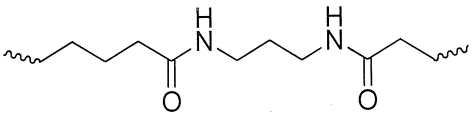


Công thức (301)

trong đó,

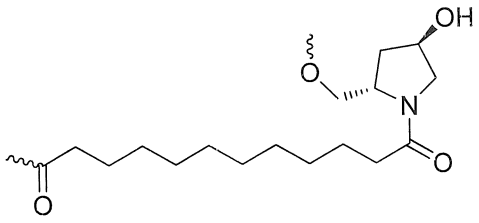
trong đó k là số nguyên từ 1 - 3;

L^A là gốc mạch nhánh chứa liên kết amit có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (302), mỗi L^A được liên kết tương ứng với nhóm gắn đích và gốc L^C thông qua liên kết ete ở hai đầu tận của nó:



Công thức (302)

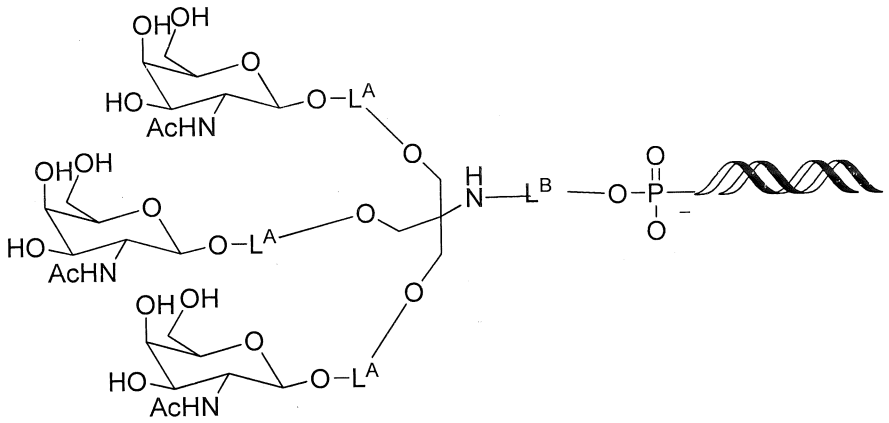
L^B là gốc mạch nhánh chứa N-axylpyrolidin có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (303), gốc mạch nhánh có nhóm cacbonyl tại một đầu tận và được liên kết với gốc L^C thông qua liên kết amit, và có nhóm oxy tại đầu tận khác và được liên kết với siARN thông qua liên kết phosphoeste:



Công thức (303)

L^C là nhóm liên kết hóa trị hai đến hóa trị ba dựa trên hydroxymetyl aminometan, dihydroxymetyl aminometan hoặc trihydroxymetyl aminometan, L^C được liên kết với mỗi gốc L^A thông qua liên kết ete thông qua nguyên tử oxy, và được liên kết với gốc L^B thông qua liên kết amit qua nguyên tử nitơ.

Theo một số phương án, khi n=3 và L^C là nhóm liên kết hóa trị ba dựa trên trihydroxymetyl aminometan, thể liên hợp siARNN thứ nhất được tạo thành bằng cách liên kết phân tử N-axetylgalactosamin với phân tử siARN qua -$(L^A)_3$-trihydroxymetyl aminometan-L^B- làm chất liên kết có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (304):



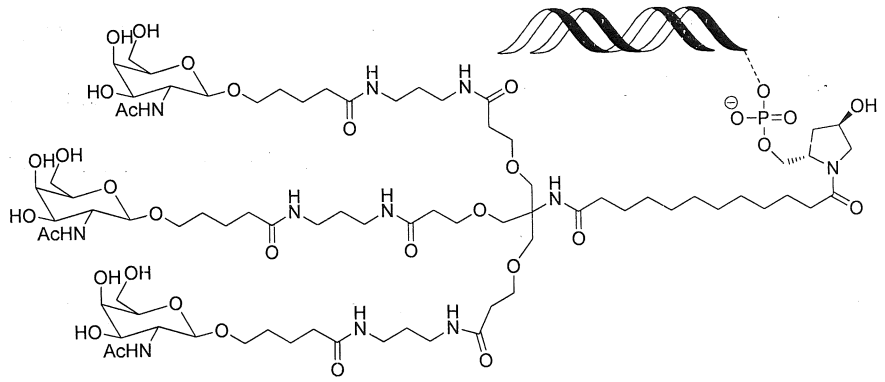
Công thức (304)

trong đó cấu trúc xoắn đôi là siARN.

Tương tự, vị trí liên hợp giữa siARN và nhóm liên hợp có thể ở đầu tận 3' hoặc đầu tận 5' của chuỗi có nghĩa của siARN, hoặc tại đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa, hoặc trong trình tự bên trong của siARN.

Theo một số phương án, đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa của siARN theo sáng chế được liên hợp đồng hóa trị với ba phân tử N-axetylgalactosamin (GalNAc) qua chất liên kết -$(L^A)_3$-trihydroxymetyl aminometan-L^B- để thu được liên hợp siARN thứ nhất trong

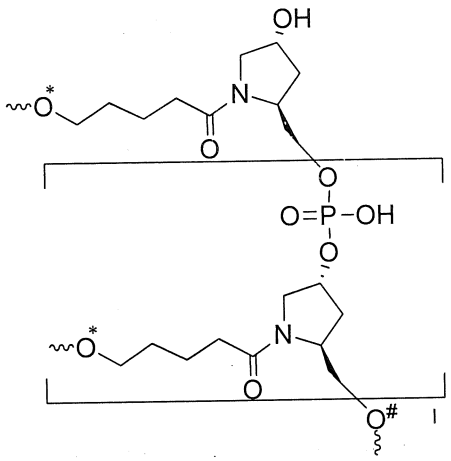
đó tỷ lệ mol của phân tử siARN với phân tử GalNAc là 1:3 (sau đây được gọi là $(GalNAc)_3$-siARN), và thể liên hợp này có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (305):



Công thức (305)

trong đó cấu trúc xoắn đôi là siARN; và liên kết được liên kết với đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa của siARN.

Theo một số phương án, khi nhóm gắn đích là N-axetylgalactosamin, chất liên kết thích hợp có thể có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (306):



Công thức (306)

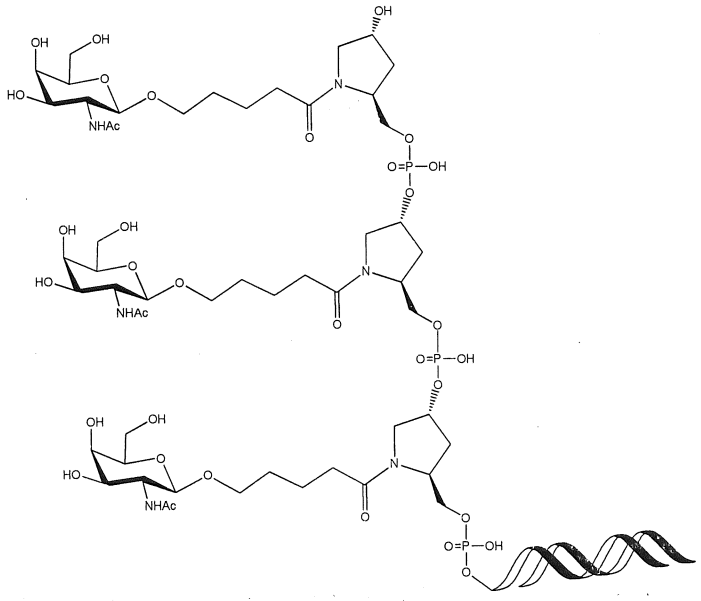
trong đó,

l là số nguyên từ 0 đến 3;

* là vị trí được liên kết với nhóm gắn đích qua liên kết ete trên chất liên kết; và

là vị trí được liên kết với siARN qua liên kết phosphoeste trên chất liên kết.

Theo một số phương án cụ thể, khi l=2, thể liên hợp siARN có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (307):



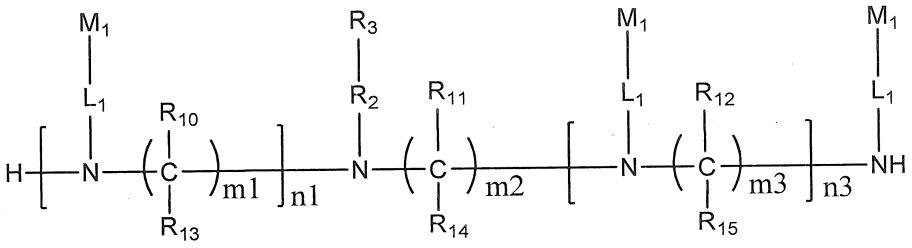
Công thức (307)

trong đó, cấu trúc xoắn đôi chỉ siARN; và liên kết được liên kết với đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa của siARN.

Liên hợp nêu trên có thể được tổng hợp theo phương pháp được mô tả chi tiết trong phần lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, WO2015006740 A2 mô tả chi tiết cách điều chế các thể liên hợp khác. Thể liên hợp siARN thứ nhất theo sáng chế có thể thu được bằng các phương pháp đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đối với ví dụ khác, WO2014025805A1 mô tả chi tiết cách điều chế phương pháp liên hợp có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (305). Đối với một ví dụ khác, Rajeev *et al.*, ChemBioChem 2015, 16, 903-908, mô tả cách điều chế phương pháp liên hợp có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (307).

Thể liên hợp siARN thứ hai

Theo một số phương án, sáng chế đề cập thể liên hợp siARN thứ hai, có cấu trúc được thể hiện bởi công thức (1):



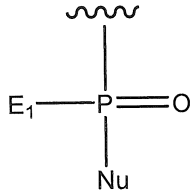
Công thức (1)

trong đó, n1 là số nguyên từ 1-3, và n3 là số nguyên từ 0-4;

mỗi m1, m2, và m3 độc lập là số nguyên từ 2-10;

mỗi R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} độc lập là H, hoặc được chọn từ nhóm bao gồm C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} haloalkyl, và C_1-C_{10} alkoxy;

R_3 là nhóm có cấu trúc như được thể hiện bằng công thức (A59):



Công thức (A59)

trong đó,

E_1 là OH, SH hoặc BH_2;

Nu là siARN;

mỗi nucleotit trong siARN được đại diện bởi Nu độc lập là nucleotit biến đổi hoặc không biến đổi. SiARN được đại diện bởi Nu chứa chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa, trong đó chuỗi có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit 1, và chuỗi đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit 2; trình tự nucleotit 1 và trình tự nucleotit 2 bổ sung đảo ít nhất một phần để tạo thành vùng chuỗi kép; trình tự nucleotit 1 có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:155; và trình tự nucleotit 2 có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156:

5'- CCUUGAGGCAUACUUCAAZ -3' (SEQ ID NO: 155);

5'- Z'UUGAAGUAUGCCUCAAGG -3' (SEQ ID NO: 156);

trong đó,

Z là A; Z' là U;

trình tự nucleotit 1 chứa nucleotit Z_A tại vị trí tương ứng với Z;

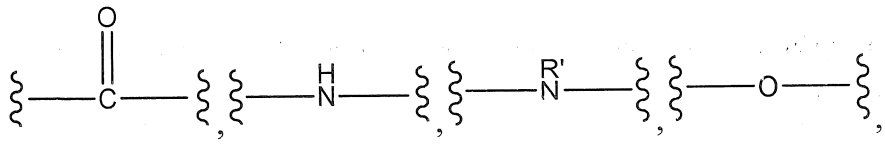
trình tự nucleotit 2 chứa nucleotit Z'_B tại vị trí tương ứng với Z'; nucleotit Z'_B là nucleotit thứ nhất tại đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa;

R_2 là alkylen mạch thẳng có chiều dài từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon được thế tùy ý bằng một hoặc nhiều nhóm được chọn từ nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, $S(O)_2$, C_2-C_{10} alkeylen, C_2-C_{10} alkynylen, C_6-C_{10} arylen, C_3-C_{18} heteroxyclylen, và C_5-C_{10} heteroarylen, và trong đó R_2 tùy ý có một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm: C_1-C_{10} alkyl, C_6-C_{10} aryl, C_5-C_{10} heteroaryl, C_1-C_{10} haloalkyl, -OC_1-C_{10} alkyl, -OC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-OH, -OC_1-C_{10} haloalkyl, -SC_1-C_{10} alkyl, -SC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-SH, -SC_1-C_{10} haloalkyl, halo, -OH, -SH, $-NH_2$, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2, -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -NH(C_1-C_{10} alkyl), xyano, nitro, $-CO_2H$, -C(O)OC_1-C_{10} alkyl, -CON(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -CONH(C_1-C_{10} alkyl), $-CONH_2$, -NHC(O)(C_1-C_{10} alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C_1-C_{10} alkyl, -C(O)C_1-C_{10} alkylphenyl, -C(O)C_1-C_{10} haloalkyl, -OC(O)C_1-C_{10} alkyl, $-SO_2$(C_1-C_{10} alkyl), $-SO_2$(phenyl), $-SO_2$(C_1-C_{10} haloalkyl), $-SO_2NH_2$, $-SO_2$NH(C_1-C_{10} alkyl), $-SO_2$NH(phenyl), -NHSO_2(C_1-C_{10} alkyl), -NHSO_2(phenyl), và -NHSO_2(C_1-C_{10} haloalkyl);

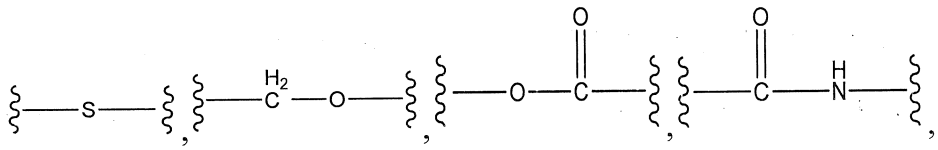
mỗi L_1 độc lập là alkylen mạch thẳng có chiều dài từ 1 đến 70 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon được thế tùy ý bằng một hoặc nhiều nhóm được chọn từ nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, $S(O)_2$, C_2-C_{10} alkeylen, C_2-C_{10} alkynylen, C_6-C_{10} arylen, C_3-C_{18} heteroxyclylen, và C_5-C_{10} heteroarylen, và trong đó L_1 tùy ý có một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm: C_1-C_{10} alkyl, C_6-C_{10} aryl, C_5-C_{10} heteroaryl, C_1-C_{10} haloalkyl, -OC_1-C_{10} alkyl, -OC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-OH, -OC_1-C_{10} haloalkyl, -SC_1-C_{10} alkyl, -SC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-

C_{10} alkyl-SH, -SC_1-C_{10} haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH_2, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2, -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -NH(C_1-C_{10} alkyl), xyano, nitro, -CO_2H, -C(O)OC_1-C_{10} alkyl, -CON(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -CONH(C_1-C_{10} alkyl), -$CONH_2$, -NHC(O)(C_1-C_{10} alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C_1-C_{10} alkyl, -C(O)C_1-C_{10} alkylphenyl, -C(O)C_1-C_{10} haloalkyl, -OC(O)C_1-C_{10} alkyl, -SO_2(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2(phenyl), -SO_2(C_1-C_{10} haloalkyl), -SO_2NH_2, -SO_2NH(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2NH(phenyl), -$NHSO_2$(C_1-C_{10} alkyl), -$NHSO_2$(phenyl), và -$NHSO_2$(C_1-C_{10} haloalkyl).

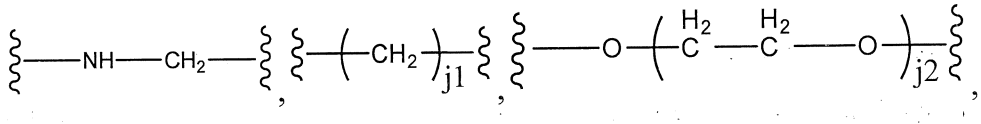
Theo một số phương án, L_1 có thể được chọn từ nhóm bao gồm các nhóm A1-A26 và tổ hợp bất kỳ của nó, trong đó cấu trúc và định nghĩa của A1-A26 như sau:



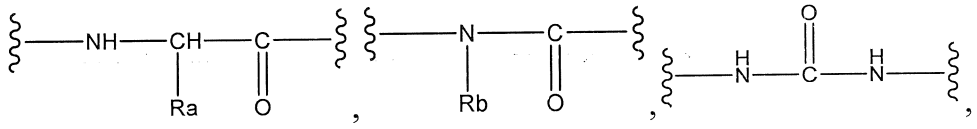
(A1) (A2) (A3) (A4)



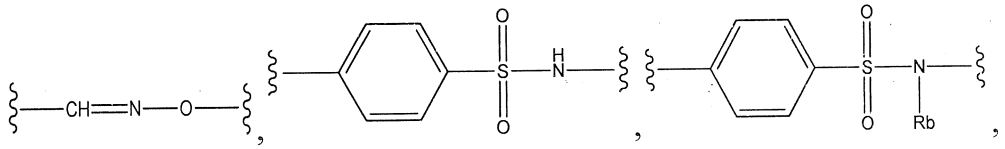
(A5) (A6) (A7) (A8)



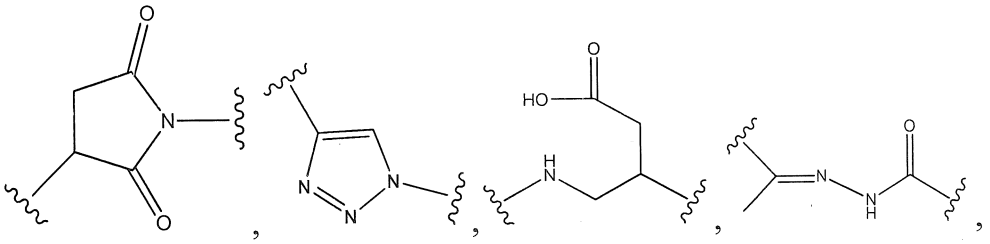
(A9) (A10) (A11)



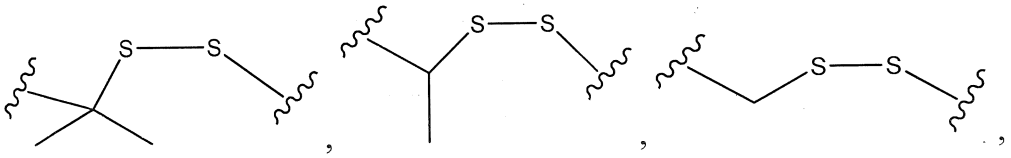
(A12) (A13) (A14)



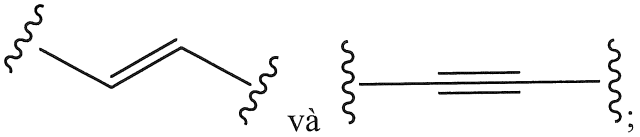
(A15) (A16) (A17)



(A18) (A19) (A20) (A21)



(A22) (A23) (A24)



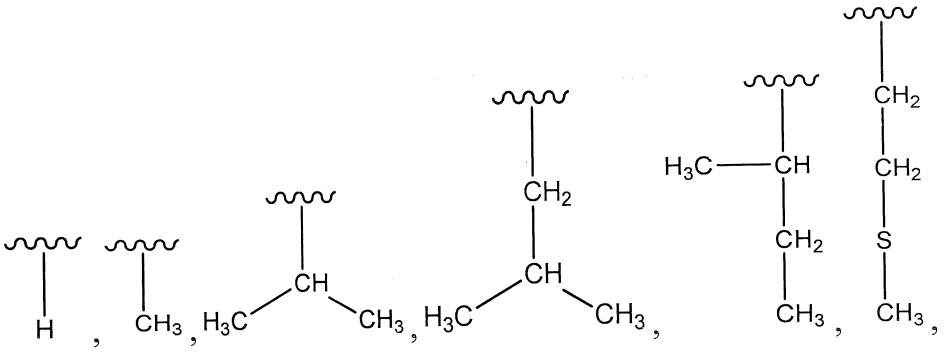
(A25) (A26)

trong đó mỗi j1 độc lập là số nguyên từ 1-20;

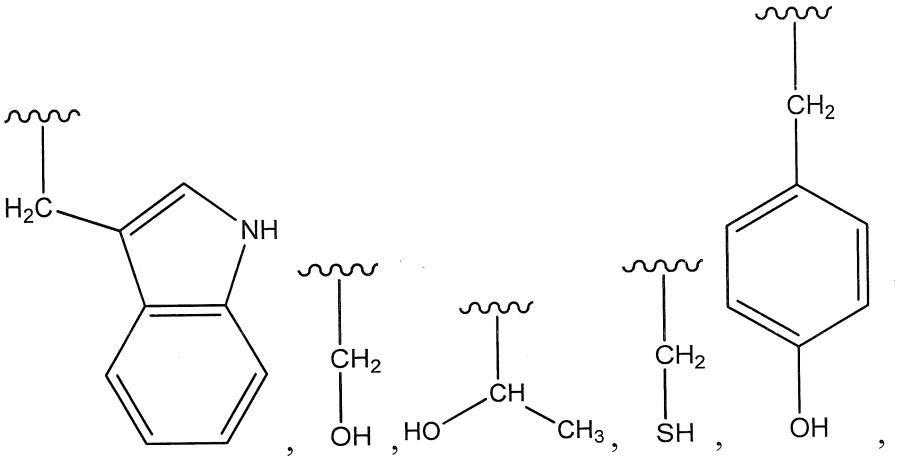
mỗi j2 độc lập là số nguyên từ 1-20;

R' là C_1-C_{10} alkyl;

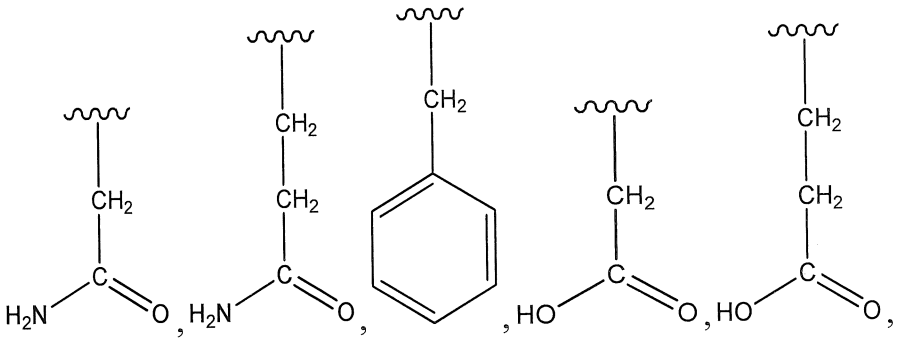
Ra được chọn từ nhóm bao gồm A27-A45 và tổ hợp bất kỳ của nó:



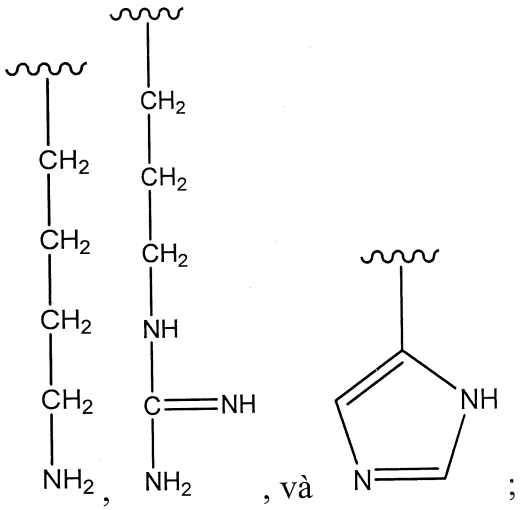
(A27) (A28) (A29) (A30) (A31) (A32)



(A33) (A34) (A35) (A36) (A37)



(A38) (A39) (A40) (A41) (A42)



(A43) (A44) A45)

Rb là C_1-C_{10} alkyl; và

đại diện vị trí trong đó nhóm được liên kết với phần còn lại của phân tử.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng, thông qua L_1 được định nghĩa là alkyl mạch thẳng để thuận tiện, nhưng nó không thể là nhóm mạch

thẳng hoặc được đặt tên khác, như amin hoặc alkenyl được sản xuất bởi việc thay thế và/hoặc thế nêu trên. Với mục đích của phần mô tả này, chiều dài của L_1 là số lượng của nguyên tử trong chuỗi liên kết hai điểm liên kết. Với mục đích này, vòng thu được bằng cách thế nguyên tử cacbon của alkylen mạch thẳng, như heteroxyclylen hoặc heteroarylen, được tính là một nguyên tử.

M_1 là nhóm gắn đích, trong đó các định nghĩa và tùy chọn giống như các định nghĩa và tùy chọn được mô tả bên trên. Theo một số phương án, mỗi M_1 độc lập được chọn từ một trong số các phối tử có ái lực với thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt của tế bào gan động vật có vú.

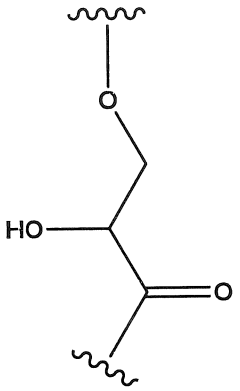
Khi M_1 là phối tử có ái lực với thụ thể asialoglycoprotein (ASGP-R) trên bề mặt của tế bào gan động vật có vú, theo một số phương án, n1 có thể là số nguyên từ 1-3, và n3 có thể là số nguyên từ 0-4 để đảm bảo rằng số lượng của phối tử M_1 trong thể liên hợp có thể là ít nhất 2. Theo một số phương án, $n1+n3 \geq 2$, sao cho số lượng của phối tử M_1 trong thể liên hợp có thể là ít nhất 3, do đó cho phép phối tử M_1 để liên kết thuận tiện hơn với thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt của tế bào gan, có thể tạo điều kiện nhập bào của thể liên hợp vào tế bào. Các thử nghiệm thể hiện rằng khi số lượng của phối tử M_1 lớn hơn 3, thì khả năng dễ dàng liên kết phối tử M_1 với thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt của tế bào gan tăng không đáng kể. Do đó, xét về các khía cạnh khác nhau như sự thuận tiện trong tổng hợp, chi phí cấu trúc/quy trình và hiệu quả phân phối, theo một số phương án, n1 là số nguyên từ 1-2, n3 là số nguyên từ 0-1, và n1+n3 =2-3.

Theo một số phương án, khi m1, m2, và m3 độc lập với nhau được chọn từ số nguyên từ 2-10, vị trí đột biến không gian trong số nhiều phối tử M_1 có thể phù hợp để liên kết phối tử M_1 với thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt của tế bào gan. Để tạo ra thể liên hợp theo sáng chế có cấu trúc đơn giản hơn, tổng hợp dễ dàng hơn và/hoặc chi phí được giảm, theo một số phương án, m1, m2 và m3 độc lập của một nhóm khác là số nguyên từ 2-5, theo một số phương án, m1 = m2 = m3.

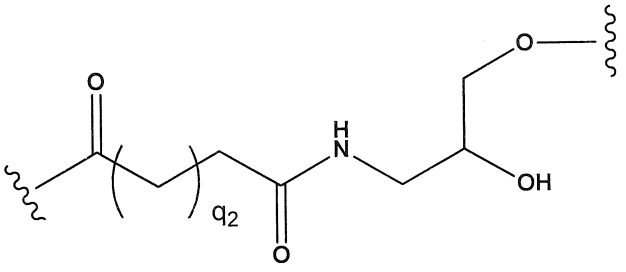
Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng khi R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, và R_{15} độc lập của một nhóm khác là một trong số H, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} haloalkyl, và C_1-C_{10} alkoxy, chúng sẽ không thay đổi đặc tính của thể liên hợp theo sáng chế và có thể đạt được được toàn bộ mục đích theo sáng chế. Theo một số phương án, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, và R_{15} độc lập với nhau được chọn từ H, metyl và etyl. Theo một số phương án, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, và R_{15} là H.

R_3 là nhóm có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức A59, trong đó E_1 là OH, SH hoặc BH_2, và xem xét sự sẵn có của nguyên liệu ban đầu, theo một số phương án, E_1 là OH hoặc SH.

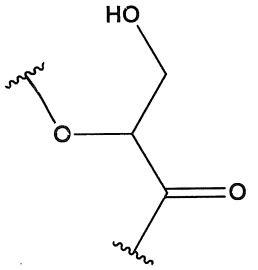
Theo một số phương án, R_2 được chọn để thu được liên kết giữa nhóm như được thể hiện bởi công thức (A59) và nguyên tử N trên khung nitơ. Trong ngữ cảnh theo sáng chế, "khung nitơ" đề cập đến cấu trúc mạch trong đó nguyên tử cacbon gắn với R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, và R_{15} và nguyên tử N được liên kết với nhau. Theo một số phương án, R_2 có thể là bất kỳ nhóm liên kết có khả năng gắn nhóm như được thể hiện bởi công thức (A59) với nguyên tử N trên khung nitơ bằng công cụ thích hợp. Theo một số phương án, trong trường hợp mà thể liên hợp siARN theo sáng chế được điều chế bằng quy trình tổng hợp pha rắn, nhóm R_2 cần để có cả vị trí liên kết với nguyên tử N trên khung nitơ và vị trí liên kết với nguyên tử P trong R_3. Theo một số phương án, trong R_2, vị trí liên kết với nguyên tử N trên khung nitơ tạo thành liên kết amit với nguyên tử N, và vị trí liên kết với nguyên tử P trên R_3 tạo thành liên kết phosphoeste với nguyên tử P. Theo một số phương án, R_2 là B5, B6, B5' hoặc B6':



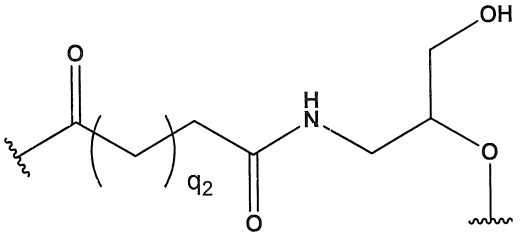
(B5),



(B6),



(B5'), hoặc



(B6');

trong đó ~~~ đại diện vị trí trong đó nhóm được liên kết đồng hóa trị;

q_2 là số nguyên từ 1-10; theo một số phương án, q_2 là số nguyên từ 1-5.

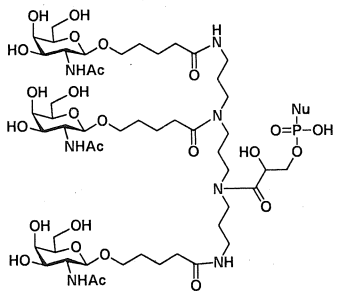
L_1 được sử dụng để liên kết phối tử M_1 với nguyên tử N trên khung nitơ, do đó tạo ra chức năng gắn đích gan cho thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế. Theo một số phương án, L_1 được chọn từ tổ hợp kết nối của một hoặc nhiều công thức A1-A26. Theo một số phương án, L_1 được chọn từ tổ hợp kết nối của một hoặc nhiều công thức A1, A4, A5, A6, A8, A10, A11, và A13. Theo một số phương án, L_1 được chọn từ tổ hợp kết nối của ít nhất hai công thức A1, A4, A8, A10, và A11. Theo một số phương án, L_1 được chọn từ tổ hợp kết nối của ít nhất hai công thức A1, A8, và A10.

Theo một số phương án, chiều dài của L_1 có thể là 3 đến 25, 3 đến 20, 4 đến 15 hoặc 5 đến 12 nguyên tử. Theo một số phương án, L_1 là 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 nguyên tử về chiều dài.

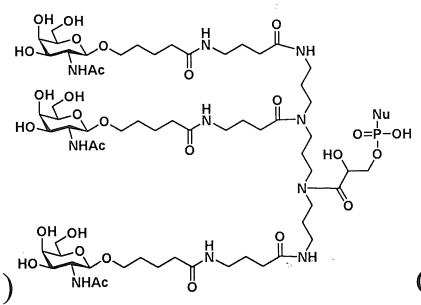
Theo một số phương án, j1 là số nguyên từ 2-10, và theo một số phương án, là số nguyên từ 3-5. j2 là số nguyên từ 2-10, và theo một số phương án, là số nguyên từ 3-5. R' là C_1-C_4 alkyl, và theo một số phương án, là một trong số metyl, etyl, và isopropyl. Ra là một trong số A27, A28, A29, A30, và A31, và theo một số phương án, là A27

hoặc A28. Rb là C_1-C_5 alkyl, và theo một số phương án, là một trong số metyl, etyl, isopropyl, và butyl. Theo một số phương án, j1, j2, R', Ra, và Rb có công thức A1-A26 được chọn lựa tương ứng để thu được liên kết giữa phối tử M_1 và nguyên tử N trên khung nitơ, và để tạo ra vị trí đột biến không gian giữa các phối tử M_1 phù hợp hơn để liên kết các phối tử M_1 với thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt của tế bào gan.

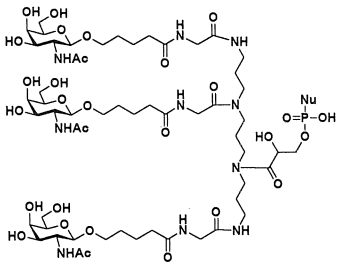
Theo một số phương án, thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19), (20), (21) hoặc (22):



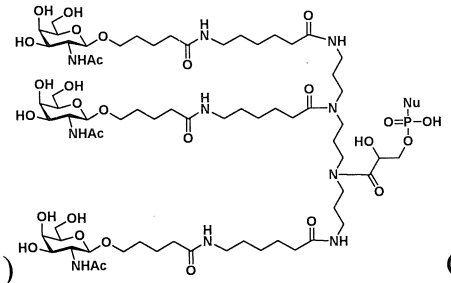
Công thức (3)



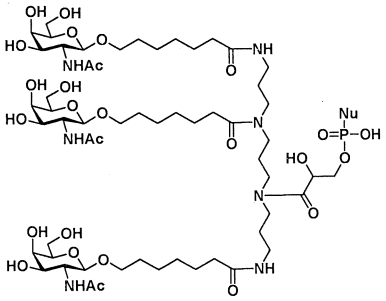
Công thức (4)



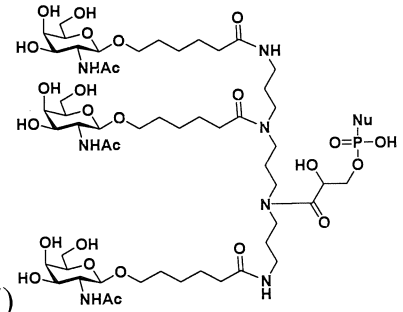
Công thức (5)



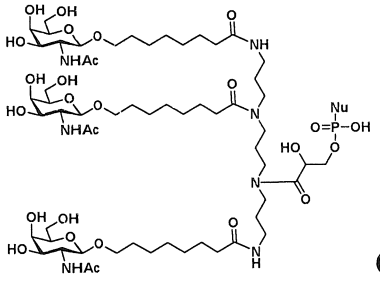
Công thức (6)



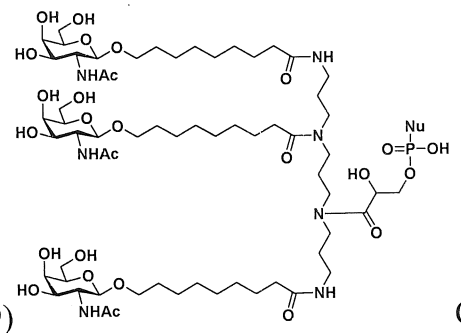
Công thức (7)



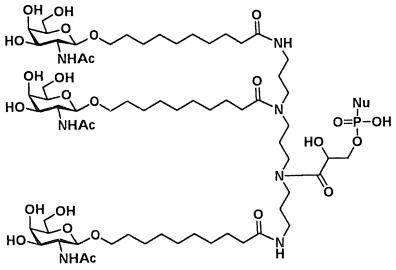
Công thức (8)



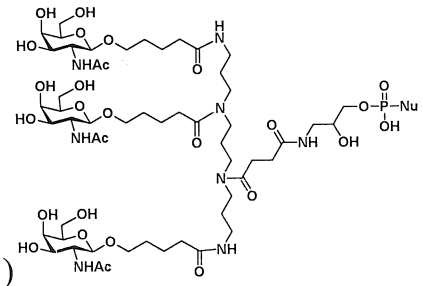
Công thức (9)



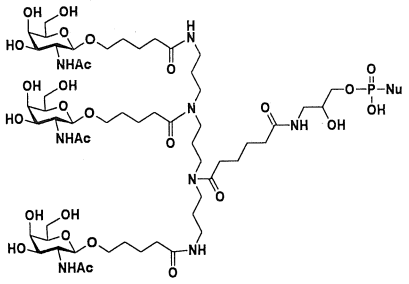
Công thức (10)



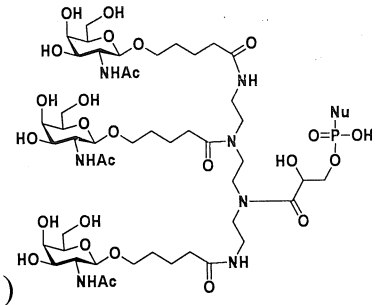
Công thức (11)



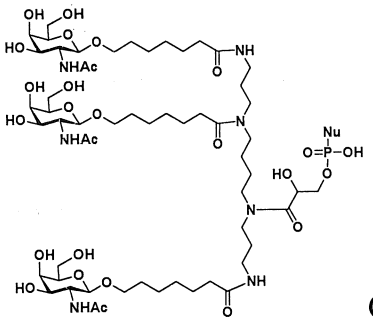
Công thức (12)



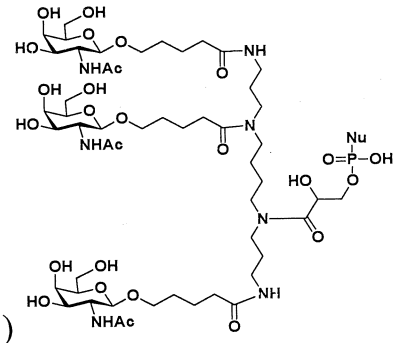
Công thức (13)



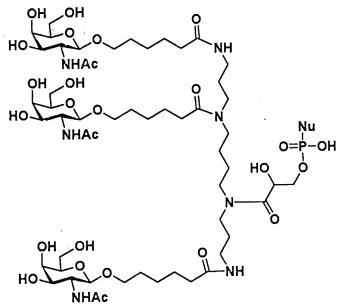
Công thức (14)



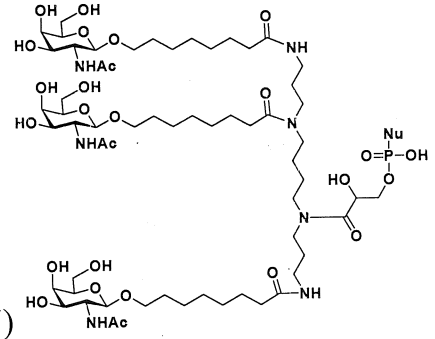
Công thức (15)



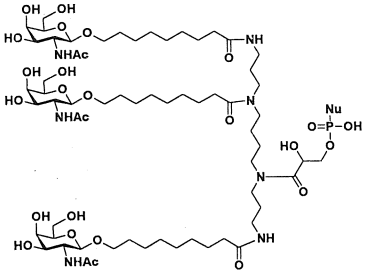
Công thức (16)



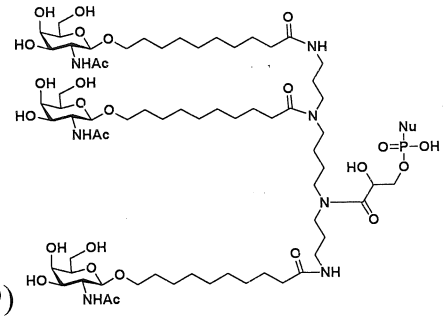
Công thức (17)



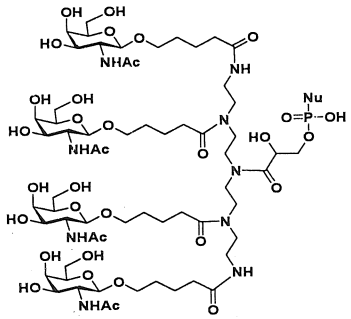
Công thức (18)



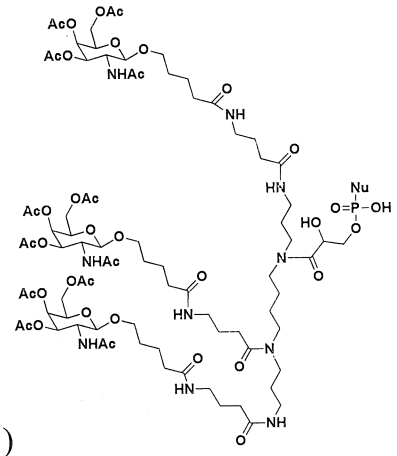
Công thức (19)



Công thức (20)



Công thức (21)



Công thức (22).

Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 có thể được liên kết với bất kỳ vị trí có thể trong trình tự siARN (được đại diện bởi Nu trong công thức nêu trên), ví dụ, nguyên tử P trong công thức A59 có thể được liên kết với bất kỳ nucleotit trong chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa của siARN. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với bất kỳ nucleotit trong chuỗi có nghĩa của siARN. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 có thể được liên kết với đầu tận của chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa của siARN. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với đầu tận của chuỗi có nghĩa của siARN. Đầu tận này đề cập đến 4 nucleotit thứ nhất được tính từ một đầu tận của chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với đầu tận của chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa của siARN. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với đầu tận 3’ của chuỗi có nghĩa của siARN. Trong trường hợp mà nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với vị trí bên trên trong chuỗi có nghĩa của siARN, sau khi đi vào tế bào, liên hợp được đề xuất bởi sáng chế có thể giải phóng chuỗi đối nghĩa riêng biệt của siARN

trong quá trình tháo xoắn, do đó phong bế dịch mã của HBV mARN thành protein và ức chế sự biểu hiện của gen virut viêm gan B (HBV).

Nguyên tử P trong công thức A59 có thể được liên kết với bất kỳ vị trí có thể của nucleotit trong siARN được đại diện bởi Nu, ví dụ, đến vị trí 5', 2' hoặc 3', hoặc với bazơ của nucleotit. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 có thể được liên kết với vị trí 2', 3', hoặc 5' của nucleotit trong siARN bằng cách tạo ra liên kết phosphodieste. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với nguyên tử oxy được tạo thành bằng cách loại bỏ proton 3'-hydroxy của nucleotit tại đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa trong siARN, hoặc nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với nucleotit bằng cách thế nguyên tử hydro trong 2'-hydroxy của nucleotit của chuỗi có nghĩa trong siARN, hoặc nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với nucleotit bằng cách thế nguyên tử hydro trong 5'-hydroxy của nucleotit tại đầu tận 5' của chuỗi có nghĩa trong siARN.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit 1 có không nhiều hơn 1 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:1; và/hoặc trình tự nucleotit 2 có không nhiều hơn 1 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:2.

Theo một số phương án, sự khác biệt về nucleotit giữa trình tự nucleotit 2 và trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:2 bao gồm sự khác biệt tại vị trí của nucleotit Z'_B, và Z'_B được chọn từ A, C hoặc G; theo một số phương án, sự khác biệt về nucleotit là sự khác biệt tại vị trí của nucleotit Z'_B, và Z'_B được chọn từ A, C hoặc G; theo một số phương án, Z_A là nucleotit bổ sung cho Z'_B. Sự khác biệt về nucleotit đặc biệt này sẽ không làm giảm đáng kể khả năng của thể liên hợp siARN thứ hai để ức chế gen đích, và nhờ đó liên hợp siARN thứ hai bao gồm sự khác biệt về nucleotit đặc hiệu cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit 1 về cơ bản bổ sung đảo, gần như bổ sung đảo, hoặc hoàn toàn bổ sung đảo với trình tự nucleotit 2. "Về cơ bản bổ sung đảo" đề cập đến không nhiều hơn 3 bắt cặp nhầm trong hai trình tự nucleotit. "Gần như bổ

sung đảo" đề cập đến không nhiều hơn 1 bắt cặp nhầm trong hai trình tự nucleotit. "Bổ sung đảo hoàn toàn" dùng để chỉ việc không bắt cặp nhầm trong hai trình tự nucleotit.

Theo một số phương án, chuỗi có nghĩa cũng chứa trình tự nucleotit 3, và chuỗi đối nghĩa cũng chứa trình tự nucleotit 4. Mỗi trình tự nucleotit 3 và 4 độc lập có chiều dài là 1-4 nucleotit. Nucleotit trong trình tự nucleotit 3 tương ứng với trình tự tại vị trí tương ứng trong trình tự nucleotit 4. Theo một số phương án, trình tự nucleotit 4 là ít nhất bổ sung một phần với nucleotit tại vị trí tương ứng trong mARN đích. Theo một số phương án, trình tự nucleotit 4 bổ sung hoàn toàn vào nucleotit tại vị trí tương ứng trong mARN đích.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit 3 được liên kết với đầu tận 5' của trình tự nucleotit 1, và trình tự nucleotit 4 được liên kết với đầu tận 3' của trình tự nucleotit 2. Theo một số phương án, trình tự nucleotit 3 có cùng chiều dài và bổ sung đảo với trình tự nucleotit 4. Do đó, theo một số phương án, chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa có thể có có chiều dài là 19-23 nucleotit.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit 3 và trình tự nucleotit 4 đều có chiều dài là 1 nucleotit. Bazơ của trình tự nucleotit 3 là A; trong trường hợp này, vùng chuỗi kép có thể có chiều dài là 20 nucleotit, nghĩa là, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa là 20/20;

ngoài ra, trình tự nucleotit 3 và trình tự nucleotit 4 đều có chiều dài là 2 nucleotit; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', bazơ của trình tự nucleotit 3 là G và A nối tiếp nhau; trong trường hợp này, vùng chuỗi kép có thể có chiều dài là 21 nucleotit, nghĩa là, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa là 21/21;

ngoài ra, trình tự nucleotit 3 và trình tự nucleotit 4 đều có chiều dài là 3 nucleotit; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', bazơ của trình tự nucleotit 3 là C, G và A nối tiếp nhau; trong trường hợp này, vùng chuỗi kép có thể có có chiều dài là 22 nucleotit, nghĩa là, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa là 22/22;

ngoài ra, trình tự nucleotit 3 và trình tự nucleotit 4 đều có chiều dài là 4 nucleotit; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', bazơ của trình tự nucleotit 3 là C, C, G và A

nối tiếp nhau; trong trường hợp này, vùng chuỗi kép có thể có chiều dài là 23 nucleotit, nghĩa là, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa là 23/23.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit 3 có chiều dài là 2 nucleotit; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', bazơ của trình tự nucleotit 3 là G và G nối tiếp nhau.

Nên được hiểu rằng trình tự nucleotit 3 và trình tự nucleotit 4 có chiều dài tương tự và bổ sung cho nhau. Do đó, khi bazơ của trình tự nucleotit 3 được tạo ra, bazơ của trình tự nucleotit 4 cũng được xác định.

Theo một số phương án, siARN được đại diện bởi Nu trong công thức (1) cũng chứa trình tự nucleotit 5, có chiều dài là 1-3 nucleotit và được liên kết với đầu tận 3' của chuỗi đối nghĩa, từ đó tạo thành phần nhô ra 3' của chuỗi đối nghĩa. Theo một số phương án, trình tự nucleotit 5 có chiều dài là 1 hoặc 2 nucleotit. Như vậy, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa trong siARN được đại diện bởi Nu có thể là 19/20, 19/21, 20/21, 20/22, 21/22, 21/23, 22/23, 22/24, 23/24, hoặc 23/25.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit 5 có chiều dài là 2 nucleotit. Ngoài ra, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', trình tự nucleotit 5 là 2 thymidin deoxyribonucleotit liên tục, 2 uridin ribonucleotit liên tục hoặc 2 nucleotit bổ sung với mARN đích. Do đó, theo một số phương án, tỷ lệ chiều dài của chuỗi có nghĩa với chuỗi đối nghĩa trong siARN được đại diện bởi Nu là 19/21 hoặc 21/23. Ở đây, thể liên hợp bao gồm siARN thể hiện hoạt tính tắt tốt hơn so với APOC3 mARN.

Theo một số phương án, chuỗi có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:1, và chuỗi đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:4:

5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAZ$_A$-3' (SEQ ID NO: 1),

5'-Z'$_B$UUGAAGUAUGCCUCAAGGUU-3' (SEQ ID NO: 3),

5'-Z'$_B$UUGAAGUAUGCCUCAAGGUC-3' (SEQ ID NO: 4),

trong đó, nucleotit Z'$_B$ là nucleotit thứ nhất từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa; Z$_A$ được chọn từ A, U, G hoặc C; và Z'$_B$ là nucleotit bổ sung cho Z$_A$.

Theo một số phương án, siARN được đại diện bởi Nu là siHBa1 hoặc siHBa2:

siHBa1

Chuỗi có nghĩa: 5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAA -3' (SEQ ID NO: 5),

Chuỗi đối nghĩa: 5'-UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU -3' (SEQ ID NO: 6),

siHBa2

Chuỗi có nghĩa: 5'-GACCUUGAGGCAUACUUCAAA -3' (SEQ ID NO: 7),

Chuỗi đối nghĩa: 5'-UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCGG -3' (SEQ ID NO: 8).

Như được mô tả ở trên, mỗi nucleotit trong siARN được đại diện bởi Nu trong công thức (1) độc lập biến đổi hoặc nucleotit không biến đổi. Theo một số phương án, nucleotit trong siARN được đại diện bởi Nu là nucleotit không biến đổi; theo một số phương án, một vài hoặc toàn bộ nucleotit trong siARN được đại diện bởi Nu là nucleotit biến đổi. Việc biến đổi này trên nucleotit sẽ không gây ra việc làm giảm đáng kể hoặc mất chức năng của thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế để ức chế sự biểu hiện của gen HBV.

Theo một số phương án, siARN trong liên hợp chứa ít nhất một nucleotit biến đổi. Trong ngữ cảnh theo sáng chế, thuật ngữ "nucleotit biến đổi" được sử dụng ở đây đề cập đến nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza với nhóm khác, chất tương tự nucleotit, hoặc nucleotit với bazơ biến đổi. Nucleotit biến đổi này sẽ không làm giảm hoặc mất đi đáng kể chức năng của thể liên hợp siARN để ức chế sự biểu hiện của gen. Ví dụ, nucleotit biến đổi được bộc lộ bởi J.K. Watts, G. F. Deleavey và M. J.Damha, Chemically Modified siARN: tools and applications. Drug Discov Today, 2008,13(19-20): p,842-55 có thể được chọn lựa.

Theo một số phương án, ít nhất một nucleotit trong chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi, và/hoặc ít nhất một phosphat là nhóm phosphat với nhóm biến đổi. Nói cách khác, ít nhất một vị trí của phosphat và/hoặc nhóm riboza trong khung

phosphat-riboza của ít nhất một chuỗi đơn trong chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa là phosphat và/hoặc nhóm riboza với nhóm biến đổi.

Theo một số phương án, toàn bộ nucleotit trong chuỗi có nghĩa và/hoặc chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi. Theo một số phương án, mỗi nucleotit trong chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa độc lập là nucleotit biến đổi có flo hoặc nucleotit biến đổi không có flo.

Các tác giả sáng chế theo sáng chế ngạc nhiên thấy rằng thể liên hợp siARN thứ hai được bộc lộ ở đây đạt được mức độ cân bằng cao giữa độ ổn định trong huyết thanh và hiệu quả làm tắt gen trong thử nghiệm trên động vật.

Theo một số phương án, nucleotit biến đổi có flo được đặt trong trình tự nucleotit 1 và 2; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 là nucleotit biến đổi có flo; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 là nucleotit biến đổi có flo.

Theo một số phương án, không nhiều hơn 5 nucleotit biến đổi có flo có trong trình tự nucleotit 1; theo một số phương án, không nhiều hơn 7 nucleotit biến đổi có flo có trong trình tự nucleotit 2.

Theo một số phương án, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 hoặc 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi không có flo; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 hoặc 2, 6, 8, 9, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi không có flo.

Các định nghĩa và tùy chọn của nucleotit biến đổi có flo và nucleotit biến đổi không có flo lần lượt như được mô tả bên trên.

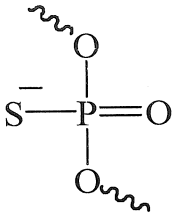
Theo một số phương án, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 trong chuỗi có nghĩa của siARN được đại diện

bởi Nu là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi metoxy; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 8, 9, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 trong chuỗi đối nghĩa của siARN được đại diện bởi Nu là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi metoxy;

ngoài ra, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 trong chuỗi có nghĩa của siARN được đại diện bởi Nu là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi metoxy; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 trong chuỗi đối nghĩa của siARN được đại diện bởi Nu là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi metoxy;

ngoài ra, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 trong chuỗi có nghĩa của siARN được đại diện bởi Nu là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi metoxy; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 trong chuỗi đối nghĩa của siARN được đại diện bởi Nu là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi metoxy.

Theo một số phương án, nucleotit có các biến đổi trên nhóm phosphat. Theo một số phương án, biến đổi trên nhóm phosphat là biến đổi phosphorothioat như được thể hiện bởi công thức (101) bên dưới, nghĩa là, việc thế nguyên tử oxy không tạo cầu trên liên kết phosphodieste với nguyên tử lưu huỳnh sao cho liên kết phosphodieste được thay đổi thành liên kết phosphorothioat dieste. Việc biến đổi này làm ổn định cấu trúc của siARN, trong khi duy trì tính đặc hiệu cao và ái lực cao để bắt cặp bazơ.



Công thức (101).

Theo một số phương án, trong siARN được đại diện bởi Nu, liên kết phosphorothioat tồn tại trong ít nhất một trong các vị trí sau: giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai từ đầu tận của chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa, giữa nucleotit thứ hai và thứ ba từ đầu tận của chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa, hoặc tổ hợp bất kỳ của nó. Theo một số phương án, liên kết phosphorothioat tồn tại ở toàn bộ vị trí nêu trên ngoại trừ đầu tận 5' của chuỗi có nghĩa. Theo một số phương án, liên kết phosphorothioat tồn tại tại toàn bộ vị trí nêu trên ngoại trừ đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa. Theo một số phương án, liên kết phosphorothioat tồn tại trong ít nhất một trong số các vị trí sau:

giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai từ đầu tận 5' của chuỗi có nghĩa;

giữa nucleotit thứ hai và thứ ba từ đầu tận 5' của chuỗi có nghĩa;

giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai từ đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa;

giữa nucleotit thứ hai và thứ ba từ đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa;

giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa;

giữa nucleotit thứ hai và thứ ba từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa;

giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai từ đầu tận 3' của chuỗi đối nghĩa; và

giữa nucleotit thứ hai và thứ ba từ đầu tận 3' của chuỗi đối nghĩa.

Theo một số phương án, đầu tận 5' nucleotit trong trình tự chuỗi đối nghĩa của phân tử siARN được đại diện bởi Nu là nucleotit 5'-phosphat hoặc nucleotit biến đổi tương tự 5'-phosphat.

Theo một số phương án, nucleotit 5'-phosphat hoặc nucleotit biến đổi tương tự 5'-phosphat là nucleotit biến đổi 5'-phosphat như được thể hiện bởi công thức (102), nucleotit bao gồm việc biến đổi E-vinylphosphonat (E-VP) như được thể hiện bởi công

thức (103), hoặc nucleotit biến đổi 5'-phosphorothioat như được thể hiện bởi công thức (105).

Các tác giả sáng chế theo sáng chế đã ngạc nhiên thấy rằng thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế cho thấy độ ổn định được cải thiện đáng kể trong huyết thanh và tác dụng xa đích thấp mà không ảnh hưởng đáng kể hoạt tính tắt với HBV mARN, và cũng thể hiện tác dụng ức chế cao hơn trên lipit máu. Do đó, theo một số phương án, siARN được đại diện bởi Nu trong thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế có thể là siARN thể hiện trong bảng 1:

Bảng 1: Trình tự siARN trong các thể liên hợp theo sáng chế

siARN	SEQ ID NO:	Hướng trình tự 5'-3'
siHBa1	5	CCUUGAGGCAUACUUCAAA
	6	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU
siHBa2	7	GACCUUGAGGCAUACUUCAAA
	8	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCGG
siHBa1M1	9	CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm
	10	UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm
siHBa1M2	11	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm
	12	UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm
siHBa2M1	13	GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm
	14	UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm
siHBa2M2	15	GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm
	16	UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm
siHBa1M1S	17	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm
	18	UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm
siHBa1M2S	19	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm

	20	UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm
siHBa2M1S	21	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm
	22	UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm
siHBa2M2S	23	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm
	24	UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm
siHBa1M1P1	25	CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm
	26	P1-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm
siHBa1M2P1	27	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm
	28	P1-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm
siHBa2M1P1	29	GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm
	30	P1-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm
siHBa2M2P1	31	GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm
	32	P1-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm
siHBa1M1SP1	33	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm
	34	P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm
siHBa1M2SP1	35	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm
	36	P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm
siHBa2M1SP1	37	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm

	38	P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm
siHBa2M2SP1	39	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm
	40	P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm

Trong siARN hoặc thể liên hợp siARN theo sáng chế, mỗi cặp của nucleotit liền kề được liên kết thông qua liên kết phosphodieste hoặc liên kết phosphorothioat dieste. Nguyên tử không tạo cầu nối oxy hoặc lưu huỳnh không tạo cầu nối trong liên kết phosphodieste hoặc liên kết phosphorothioat dieste được tích điện âm, và có thể có mặt ở dạng hydroxy hoặc sulfhydryl. Ngoài ra, ion hydro trong hydroxy hoặc sulfhydryl có thể được thế một phần hoặc hoàn toàn bằng cation. Cation có thể là cation bất kỳ, như cation kim loại, cation amoni $NH4^+$ hoặc cation amoni hữu cơ. Để tăng độ hòa tan, theo một số phương án, cation được chọn từ một hoặc nhiều cation kim loại kiềm, cation amoni được tạo thành bằng cation amin bậc ba và amoni bậc bốn. Ion kim loại kiềm có thể là K^+ và/hoặc Na^+, và cation được tạo thành bằng amin bậc ba có thể là cation amoni được tạo thành bằng trietylamin và/hoặc cation amoni được tạo thành bằng N,N-diisopropyletylamin.Do đó, siARN hoặc thể liên hợp siARN theo sáng chế có thể là ít nhất một phần có mặt ở dạng muối. Theo một phương án, nguyên tử oxy hoặc nguyên tử lưu huỳnh không tạo cầu nối trong liên kết phosphodieste hoặc liên kết phosphorothioat dieste ít nhất liên kết một phần với ion natri, và do đó siARN hoặc thể liên hợp siARN theo sáng chế có mặt hoặc có mặt một phần ở dạng của muối natri.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ rằng nucleotit biến đổi có thể được đưa vào siARN theo sáng chế bằng monome nucleosit với biến đổi tương ứng. Các phương pháp để điều chế monome nucleosit có biến đổi tương ứng và phương pháp để đưa nucleotit biến đổi vào siARN cũng được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Toàn bộ monome nucleosit biến đổi có thể có sẵn trên thị trường hoặc được điều chế bằng các phương pháp đã biết.

Điều chế thể liên hợp siARN thứ hai

Thể liên hợp siARN thứ hai như được mô tả ở trên có thể được điều chế bằng các con đường tổng hợp tương ứng bất kỳ.

Theo một số phương án, thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế có thể được điều chế bằng phương pháp sau, bao gồm: monome nucleosit liên kết liên tục theo hướng 3' đến 5' theo loại nucleotit và trình tự trong chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa của oligonucleotit chuỗi kép tương ứng, dưới điều kiện tổng hợp pha rắn phosphoramidit, trong đó bước liên kết mỗi monome nucleosit bao gồm bốn bước phản ứng của khử bảo vệ, liên kết, gắn mũ, và oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa; phân lập chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa của siARN; và bắt cặp; trong đó mỗi nucleotit trong siARN độc lập là nucleotit biến đổi hoặc không biến đổi. SiARN được đại diện bởi Nu chứa chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa, trong đó chuỗi có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit 1, và chuỗi đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit 2; trình tự nucleotit 1 và trình tự nucleotit 2 bổ sung đảo ít nhất một phần để tạo thành vùng chuỗi kép; trình tự nucleotit 1 có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:155; và trình tự nucleotit 2 có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156:

5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAZ-3' (SEQ ID NO: 155);

5'-Z'UUGAAGUAUGCCUCAAGG-3' (SEQ ID NO: 156);

trong đó,

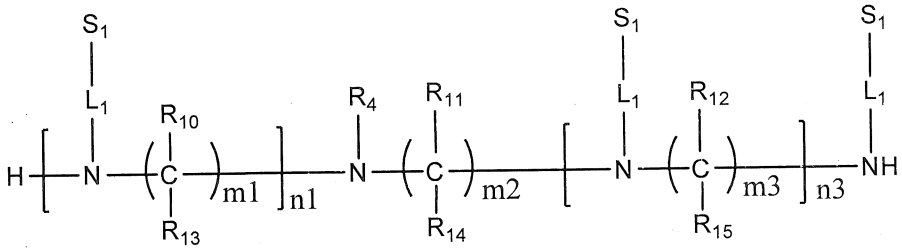
Z là A; Z' là U;

trình tự nucleotit 1 chứa nucleotit Z_A tại vị trí tương ứng với Z;

trình tự nucleotit 2 chứa nucleotit Z'_B tại vị trí tương ứng với Z'; nucleotit Z'_B là nucleotit thứ nhất từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa.

Ngoài ra, phương pháp còn bao gồm: cho tiếp xúc hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) với monome nucleosit hoặc trình tự nucleotit được liên kết với giá đỡ pha rắn dưới điều kiện phản ứng liên kết và với sự có mặt của chất liên kết, nhờ đó liên kết hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) với trình tự nucleotit thông

qua phản ứng liên kết. Sau đây, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) cũng được gọi là phân tử liên hợp.



Công thức (321)

trong đó,

R_4 là gốc có khả năng liên kết với siARN được đại diện bởi Nu. Theo một số phương án, R_4 là gốc có khả năng liên kết với siARN được đại diện bởi Nu thông qua liên kết đồng hóa trị; theo một số phương án, R_4 là gốc bao gồm nhóm chức bất kỳ có thể được liên hợp với siARN thông qua liên kết phosphodieste bằng phản ứng;

Mỗi S_1 độc lập là M_1, là nhóm được tạo thành bằng cách thế toàn bộ hydroxyl hoạt tính bằng nhóm YCOO-, trong đó mỗi Y độc lập được chọn từ nhóm bao gồm metyl, triflometyl, diflometyl, monoflometyl, triclometyl, diclometyl, monoclometyl, etyl, n-propyl, isopropyl, phenyl, halophenyl, và alkylphenyl.

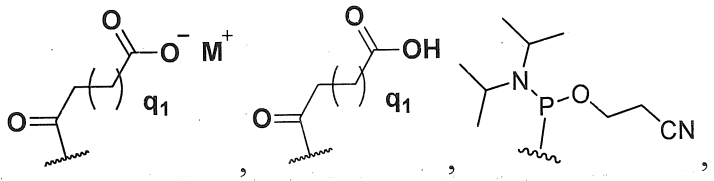
Các định nghĩa và tùy chọn của n1, n3, m1, m2, m3, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, L_1, M_1 lần lượt như được mô tả bên trên.

R_4 được lựa chọn để thu được liên kết với nguyên tử N trên khung nitơ và để cung cấp vị trí phản ứng thích hợp để tổng hợp thể liên hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (1). Theo một số phương án, R_4 chứa nhóm liên kết R_2 hoặc nhóm liên kết R_2 được bảo vệ, và có thể tạo ra nhóm chức như được thể hiện bởi công thức (A59) với siARN qua phản ứng.

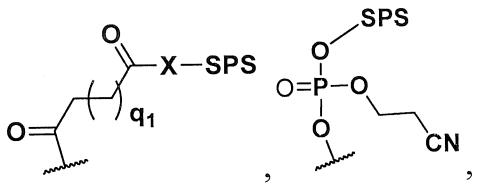
Theo một số phương án, R_4 chứa nhóm chức thứ nhất có thể phản ứng với nhóm trên siARN hoặc monome nucleosit để tạo thành phosphit este, và nhóm chức thứ hai có thể tạo thành liên kết đồng hóa trị với nhóm hydroxy hoặc nhóm amino, hoặc bao gồm giá đỡ pha rắn được liên kết thông qua liên kết đồng hóa trị. Theo một số phương

án, nhóm chức thứ nhất là phosphoramidit, hydroxy hoặc hydroxy được bảo vệ. Theo một số phương án, nhóm chức thứ hai là phosphoramidit, carboxyl hoặc muối carboxylat. Theo một số phương án, nhóm chức thứ hai là giá đỡ pha rắn được liên kết với phần còn lại của phân tử thông qua liên kết đồng hóa trị được tạo thành bằng nhóm hydroxy hoặc nhóm amino. Theo một số phương án, giá đỡ pha rắn được liên kết thông qua liên kết phosphoeste, liên kết carboxyl este, hoặc liên kết amit. Theo một số phương án, giá đỡ pha rắn là nhựa.

Theo một số phương án, nhóm chức thứ nhất chứa hydroxy, $-OR_k$ hoặc nhóm như được thể hiện bởi công thức (C3); nhóm chức thứ hai chứa nhóm như được thể hiện bởi công thức (C1), (C2), (C3), (C1'), hoặc (C3'):



(C1) (C2) (C3)



(C1') (C3')

trong đó q_1 là số nguyên từ 1-4, X là O hoặc NH, M^+ là cation, R_k là nhóm bảo vệ hydroxy, SPS đại diện giá đỡ pha rắn, và ~~~ đại diện vị trí trong đó nhóm được liên kết đồng hóa trị.

Theo một số phương án, nhóm chức thứ nhất chứa nhóm chức phosphoramidit, như nhóm được thể hiện bởi công thức (C3). Nhóm phosphoramidit có thể tạo thành phosphit este với hydroxy tại bất kỳ vị trí trên nucleotit (như 2'- hoặc 3'-hydroxy) bằng phản ứng liên kết, và phosphit este có thể tạo thành liên kết phosphodieste hoặc liên kết phosphorothioat este như được thể hiện bởi công thức (A59) qua oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa, để liên hợp phân tử liên hợp với siARN. Ở đây, thậm chí nếu nhóm chức thứ hai

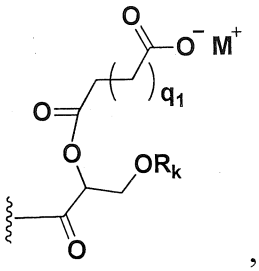
không tồn tại, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) vẫn sẽ có thể được liên hợp với nucleotit, không ảnh hưởng đến việc đạt được thể liên hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (1). Trong hoàn cảnh này, sau khi thu được chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa của siARN bằng phương pháp như tổng hợp pha rắn phosphoramidit, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) được phản ứng với hydroxy trên đầu tận nucleotit của trình tự nucleotit, và phosphit este thu được tạo thành liên kết phosphodieste hoặc liên kết phosphorothioat bằng oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa tiếp theo, do đó liên hợp hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) với siARN.

Theo một số phương án, nhóm chức thứ nhất chứa nhóm hydroxy được bảo vệ. Theo một số phương án, nhóm chức thứ hai chứa nhóm có thể phản ứng với giá đỡ pha rắn để tạo ra phân tử liên hợp bao gồm giá đỡ pha rắn. Theo một số phương án, nhóm chức thứ hai chứa carboxyl, carboxylat hoặc phosphoramidit, như nhóm chức như được thể hiện bởi công thức (C1), (C2) hoặc (C3). Khi nhóm chức thứ hai chứa carboxyl hoặc carboxylat, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) có thể phản ứng thông qua phản ứng este hóa hoặc amit hóa với nhóm hydroxy hoặc amino trên giá đỡ pha rắn như nhựa, để tạo thành phân tử liên hợp bao gồm giá đỡ pha rắn được liên kết thông qua liên kết carboxylat este hoặc liên kết amit. Khi nhóm chức thứ hai chứa nhóm chức phosphoramidit, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) có thể được liên kết với nhóm hydroxy trên giá đỡ pha rắn thông dụng, như nhựa, và bằng oxy hóa, tạo thành phân tử liên hợp chứa giá đỡ pha rắn liên kết thông qua liên kết phosphodieste. Tiếp đó, bắt đầu từ sản phẩm nêu trên được liên kết với giá đỡ pha rắn, monome nucleosit được liên kết liên tục bằng phương pháp tổng hợp pha rắn phosphoramidit, do đó thu được chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa của siARN được liên kết với nhóm liên hợp. Trong quá trình tổng hợp phosphoramidit pha rắn, nhóm chức thứ nhất được khử bảo vệ, và sau đó được liên kết với nhóm phosphoramidit trên monome nucleosit dưới điều kiện phản ứng liên kết.

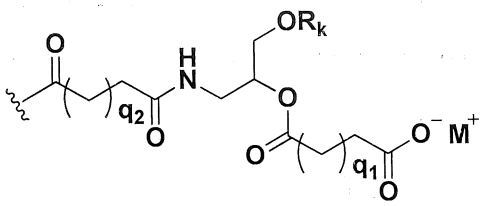
Theo một số phương án, nhóm chức thứ nhất chứa hydroxy hoặc nhóm hydroxy được bảo vệ, và nhóm chức thứ hai chứa giá đỡ pha rắn liên kết qua liên kết carboxylat este, liên kết amit hoặc liên kết phosphoeste như được thể hiện bởi công thức (C1') hoặc

(C3'). Trong các trường hợp này, bắt đầu từ hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) thay cho giá đỡ pha rắn, monome nucleosit được liên kết liên tục bằng phương pháp tổng hợp pha rắn phosphoramidit, nhờ đó thu được chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa của siARN được liên kết với nhóm liên hợp. Theo một số phương án, carboxylat có thể được thể hiện là $-COO^-M^+$, trong đó M^+ là cation như một trong số cation kim loại, cation amoni NH_4^+ và cation amoni hữu cơ. Theo một phương án, cation kim loại có thể là cation kim loại kiềm, như K^+ hoặc Na^+. Để tăng độ hòa tan và thúc đẩy phản ứng, theo một số phương án, cation amoni hữu cơ là cation amoni được tạo thành bằng amin bậc ba, hoặc cation amoni bậc bốn, như cation amoni được tạo thành bằng trietylamin hoặc N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, carboxylat là trietylamin carboxylat hoặc N,N-diisopropyletylamin carboxylat.

Theo một số phương án, R_4 chứa cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (B9), (B10), (B9'), (B10'), (B11), (B12), (B11') hoặc (B12'):

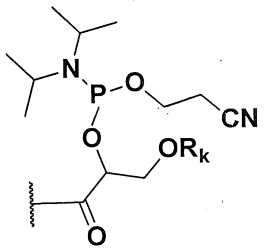


,

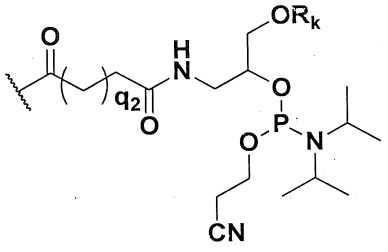


,

(B9) (B10)

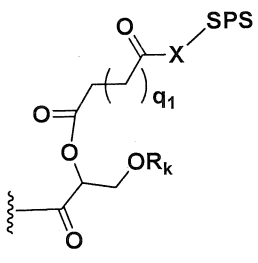


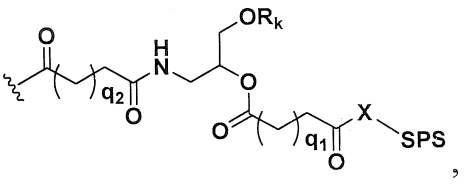
,



,

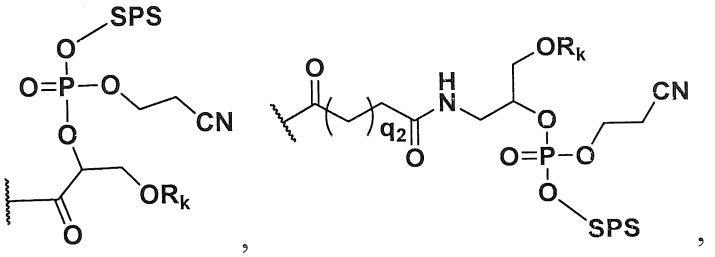
(B9') (B10')





,

(B11) (B12)



(B11')(B12')

trong đó q_1 là số nguyên từ 1-4, q_2 là số nguyên từ 1-10, X là O hoặc NH, M^+ là cation, R_k là nhóm bảo vệ hydroxy, SPS đại diện giá đỡ pha rắn, và ~~~ đại diện vị trí trong đó nhóm được liên kết đồng hóa trị. Theo một số phương án, q_1 là 1 hoặc 2. Theo một số phương án, q_2 là số nguyên từ 1-5. Theo một số phương án, R_4 chứa cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (B9) hoặc (B10). Theo một số phương án, R_4 chứa cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (B11) hoặc (B12).

Theo một số phương án, R_k là một hoặc nhiều Tr (trityl), MMTr (4-metoxytrityl), DMTr (4,4'-dimetoxytrityl), và TMTr (4,4',4''-trimetoxytrityl). Theo một số phương án, R_k có thể là DMTr, nghĩa là, 4,4'-dimetoxytrityl.

Định nghĩa của L_1 là như được mô tả ở trên.

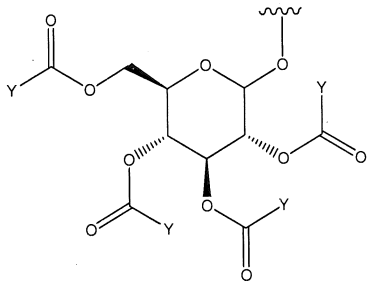
Theo một số phương án, L_1 được sử dụng để liên kết phối tử M_1 với nguyên tử N trên khung nitơ, do đó tạo ra chức năng gắn đích gan cho liên hợp oligonucleotit. Theo một số phương án, L_1 chứa bất kỳ một trong số các công thức A1-A26, hoặc tổ hợp của nó.

Theo các phương án được mô tả bên trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng hiểu rằng như được so sánh với phương pháp tổng hợp pha rắn phosphoramidit đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, thể liên hợp siARN trong đó phân tử liên hợp được liên kết với bất kỳ vị trí có thể của trình tự nucleotit có thể thu được thông qua nhóm chức thứ nhất bên trên và nhóm chức thứ hai tùy chọn. Ví dụ, phân tử liên hợp được liên kết với đầu tận của trình tự nucleotit hoặc với đầu tận của trình tự nucleotit. Do đó, trừ khi được quy định khác, trong phần mô tả sau liên quan đến việc điều chế thể liên hợp, khi đề cập đến phản ứng như "khử bảo vệ", "liên kết",

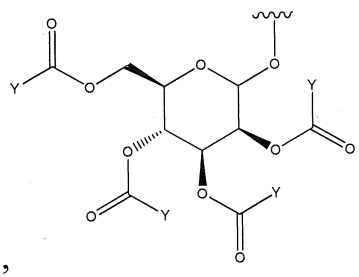
"gắn mũ", "oxy hóa", "lưu huỳnh hóa", sẽ được hiểu rằng các điều kiện và chất phản ứng liên quan trong phương pháp tổng hợp pha rắn phosphoramidit đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ áp dụng cho các phản ứng này. Các điều kiện và chất phản ứng được lấy làm ví dụ sẽ được mô tả chi tiết sau đây.

Theo một số phương án, mỗi S_1 độc lập là M_1. Theo một số phương án, mỗi S_1 độc lập là nhóm được tạo thành bằng cách bảo vệ ít nhất một hydroxyl hoạt tính trong M_1 với nhóm bảo vệ hydroxyl. Theo một số phương án, S_1 độc lập là nhóm được tạo thành bằng cách bảo vệ toàn bộ hydroxyl hoạt tính trong M_1 với nhóm bảo vệ hydroxyl. Theo một số phương án, bất kỳ nhóm bảo vệ hydroxyl đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để bảo vệ hydroxyl hoạt tính trên M_1. Theo một số phương án, hydroxy được bảo vệ được thể hiện là công thức YCOO-, trong đó mỗi Y độc lập được chọn từ nhóm bao gồm C_1-C_{10} alkyl và C_6-C_{10} aryl, được thế tùy ý bằng một hoặc nhiều phần tử thế được chọn từ nhóm bao gồm halo và C_1-C_6 alkyl. Theo một số phương án, mỗi Y độc lập được chọn từ nhóm bao gồm metyl, triflometyl, diflometyl, monoflometyl, triclometyl, diclometyl, monoclometyl, etyl, n-propyl, isopropyl, phenyl, halophenyl, và C_1-C_6 alkylphenyl.

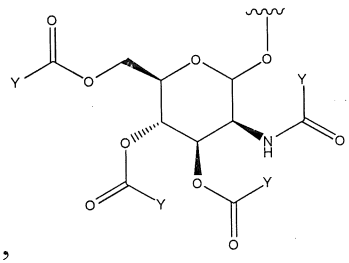
Theo một số phương án, mỗi S_1 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm công thức A46-A54:



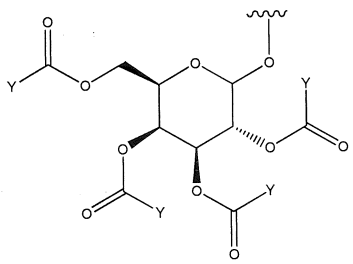
(A46)

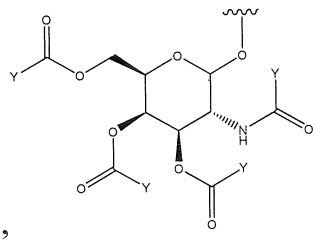


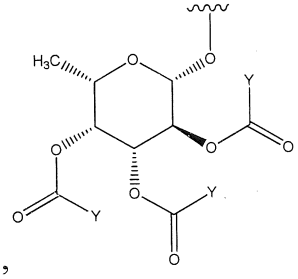
(A47)



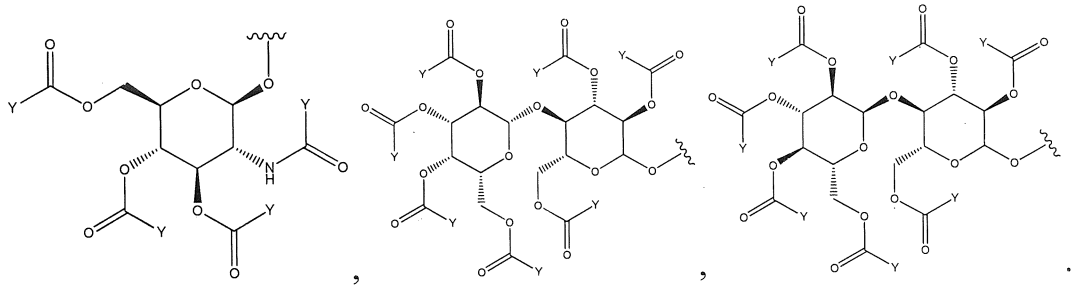
(A48)







(A49) (A50) (A51)



(A52) (A53) (A54)

Theo một số phương án, S_1 là công thức A49 hoặc A50.

Theo một số phương án, mỗi Y độc lập được chọn từ một trong số metyl, triflometyl, diflometyl, monoflometyl, triclometyl, diclometyl, monoclometyl, etyl, n-propyl, isopropyl, phenyl, halophenyl, và alkylphenyl. Với mục đích đơn giản hóa phân tử liên hợp theo sáng chế, theo một số phương án, Y là metyl.

Như được đề cập trước đó, phương pháp điều chế thể liên hợp siARN thứ hai cũng bao gồm bước sau: tổng hợp chuỗi siARN khác (ví dụ, khi chuỗi có nghĩa của siARN được liên kết với phân tử liên hợp được tổng hợp trong bước nêu trên, phương pháp còn bao gồm bước tổng hợp chuỗi đối nghĩa của siARN bằng phương pháp tổng hợp pha rắn, và ngược lại); phân lập chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa; và bắt cặp. Cụ thể là, trong bước phân lập, giá đỡ pha rắn được liên kết với trình tự nucleotit và/hoặc phân tử liên hợp bị cắt và đồng thời nhóm bảo vệ cần thiết được loại bỏ (trong trường hợp này, mỗi nhóm S_1 trong hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) được chuyển đổi thành phối tử M_1 tương ứng), nhờ đó tạo ra chuỗi có nghĩa (hoặc chuỗi đối nghĩa) của siARN được liên kết với phân tử liên hợp và chuỗi đối nghĩa tương ứng (hoặc chuỗi có nghĩa). Chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa được bắt cặp để tạo thành cấu trúc chuỗi kép ARN, nhờ đó cung cấp liên hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (1).

Theo một số phương án, phương pháp điều chế thể liên hợp siARN thứ hai bao gồm các bước sau: cho tiếp xúc hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) với monome nucleosit thứ nhất tại đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa dưới điều kiện phản ứng liên kết với sự có mặt của chất liên kết, nhờ đó liên kết hợp chất như

được thể hiện bằng công thức (321) với nucleotit thứ nhất trong trình tự; liên kết liên tục monome nucleosit theo hướng 3' đến 5' để tổng hợp chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa của siARN theo loại nucleotit mong muốn và trình tự của chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa, dưới điều kiện tổng hợp pha rắn phosphoramidit; trong đó hợp chất có công thức (321) là hợp chất trong đó R_4 chứa nhóm chức thứ nhất bao gồm hydroxy được bảo vệ và nhóm chức thứ hai bao gồm nhóm như được thể hiện bởi công thức (C1') hoặc (C3'), và hợp chất có công thức (321) được khử bảo vệ trước khi được liên kết với monome nucleosit thứ nhất; và sự liên kết của mỗi monome nucleosit chứa bốn bước phản ứng của khử bảo vệ, liên kết, gắn mũ, và oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa; nhờ đó thu được chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa của axit nucleic được liên kết với phân tử liên hợp; liên kết liên tục monome nucleosit theo hướng 3' đến 5' để tổng hợp chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa của axit nucleic theo loại nucleotit và trình tự của chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa, dưới điều kiện tổng hợp pha rắn phosphoramidit; trong đó liên kết mỗi monome nucleosit bao gồm bốn bước phản ứng của khử bảo vệ, liên kết, gắn mũ, và oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa; loại bỏ nhóm bảo vệ và cắt giá đỡ pha rắn; phân lập và tinh chế chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa của axit nucleic; và bắt cặp.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế thể liên hợp siARN chứa các bước sau: liên kết liên tục monome nucleosit theo hướng 3' đến 5' để tổng hợp chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa theo loại nucleotit và trình tự của chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa trong oligonucleotit chuỗi kép; trong đó liên kết mỗi monome nucleosit bao gồm bốn bước phản ứng của khử bảo vệ, liên kết, gắn mũ, và oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa, nhờ đó thu được chuỗi có nghĩa được liên kết với giá đỡ pha rắn và chuỗi đối nghĩa được liên kết với giá đỡ pha rắn; cho tiếp xúc hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) với chuỗi có nghĩa được liên kết với giá đỡ pha rắn hoặc chuỗi đối nghĩa được liên kết với giá đỡ pha rắn dưới điều kiện phản ứng liên kết với sự có mặt của chất liên kết, nhờ đó liên kết hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) với chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa; trong đó hợp chất có công thức (321) là hợp chất trong đó R_4 chứa nhóm phosphoramidit làm nhóm chức thứ nhất; loại bỏ nhóm bảo vệ và cắt giá đỡ pha rắn; phân lập và tinh chế tương ứng chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa của

siARN; và bắt cặp; trong đó chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa của siARN được liên kết với phân tử liên hợp.

Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa của siARN, và phương pháp điều chế thể liên hợp siARN theo sáng chế bao gồm:

(1) loại bỏ nhóm bảo vệ hydroxyl R_k trong hợp chất có công thức (321) (trong đó hợp chất có công thức (321) là hợp chất trong đó R_4 chứa nhóm chức thứ nhất và nhóm chức thứ hai, trong đó nhóm chức thứ nhất chứa hydroxy OR_k được bảo vệ, và nhóm chức thứ hai có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (C1') hoặc (C3')); cho tiếp xúc sản phẩm khử bảo vệ với monome nucleosit để thu được monome nucleosit liên kết với giá đỡ pha rắn qua phân tử liên hợp, trong điều kiện phản ứng liên kết với sự có mặt của chất liên kết;

(2) bắt đầu từ monome nucleosit được liên kết với giá đỡ pha rắn qua phân tử liên hợp, tổng hợp chuỗi có nghĩa của chuỗi có nghĩa của siARN theo hướng 3' đến 5' bằng phương pháp tổng hợp pha rắn phosphoramidit;

(3) tổng hợp chuỗi đối nghĩa của siARN bằng phương pháp tổng hợp pha rắn phosphoramidit; và

(4) phân lập chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa của siARN và bắt cặp chúng để thu được liên hợp siARN theo sáng chế;

trong đó trong bước (1), phương pháp loại bỏ nhóm bảo vệ R_k trong hợp chất có công thức (321) bao gồm việc cho hợp chất có công thức (321) tiếp xúc với chất khử bảo vệ dưới điều kiện khử bảo vệ. Điều kiện khử bảo vệ có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 50°C, và theo một số phương án, 15 đến 35°C, và thời gian phản ứng là 30-300 giây, và theo một số phương án, 50-150 giây. Chất khử bảo vệ có thể được chọn từ một hoặc nhiều axit trifloaxetic, axit tricloaxetic, axit dicloaxetic, và axit monocloaxetic, và theo một số phương án, chất khử bảo vệ là axit dicloaxetic. Tỷ lệ mol của chất khử bảo vệ với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) có thể là 10:1 đến 1000:1, và theo một số phương án, 50:1 đến 500:1.

Điều kiện phản ứng liên kết và chất liên kết có thể là bất kỳ điều kiện và chất thích hợp đối với phản ứng liên kết nêu trên. Theo một số phương án, điều kiện và chất tương tự như điều kiện và chất của phản ứng liên kết trong phương pháp tổng hợp pha rắn có thể được sử dụng.

Theo một số phương án, điều kiện phản ứng liên kết có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0-50°C, và theo một số phương án, 15-35°C. Tỷ lệ mol của hợp chất có công thức (321) với monome nucleosit có thể là 1:1 đến 1:50, và theo một số phương án, 1:2 đến 1:5. Tỷ lệ mol của hợp chất có công thức (321) với chất liên kết có thể là 1:1 đến 1:50, và theo một số phương án, 1:3 đến 1:10. Thời gian phản ứng có thể là 200-3000 giây, và theo một số phương án, 500-1500 giây. Chất liên kết có thể được chọn từ một hoặc nhiều 1H-tetrazol, 5-etylthio-1H-tetrazol và 5-benzylthio-1H-tetrazol, và theo một số phương án, là 5-etylthio-1H-tetrazol. Phản ứng liên kết có thể được thực hiện trong dung môi hữu cơ. Dung môi hữu cơ có thể được chọn từ một hoặc nhiều axetonitril khan, DMF khan và diclometan khan, và theo một số phương án, là axetonitril khan. Lượng dung môi hữu cơ có thể là 3-50 L/mol, và theo một số phương án, 5-20 L/mol, đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321).

Trong bước (2), chuỗi có nghĩa S của thể liên hợp siARN được tổng hợp theo hướng 3' đến 5' bằng phương pháp tổng hợp pha rắn phosphoramidit, bắt đầu từ monome nucleosit liên kết với giá đỡ pha rắn thông qua phân tử liên hợp được điều chế trong các bước nêu trên. Trong trường hợp này, phân tử liên hợp được liên kết với đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa thu được.

Các điều kiện khác đối với việc tổng hợp pha rắn trong các bước (2) và (3), bao gồm điều kiện khử bảo vệ đối với monome nucleosit, loại và lượng chất khử bảo vệ, điều kiện phản ứng liên kết, loại và lượng chất liên kết, điều kiện phản ứng gắn mũ, loại và lượng chất gắn mũ, điều kiện phản ứng oxy hóa, loại và lượng chất oxy hóa, điều kiện phản ứng lưu huỳnh hóa, và loại và lượng chất lưu huỳnh hóa, thông qua các chất, lượng và điều kiện thông thường khác trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một số phương án, ví dụ, tổng hợp pha rắn trong các bước (2) và (3) có thể sử dụng các điều kiện sau:

Điều kiện khử bảo vệ đối với monome nucleosit có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0-50°C, và theo một số phương án, 15-35°C, và thời gian phản ứng là 30-300 giây, và theo một số phương án, 50-150 giây. Chất khử bảo vệ có thể được chọn từ một hoặc nhiều axit trifloaxetic, axit tricloaxetic, axit dicloaxetic, và axit monocloaxetic, và theo một số phương án, là axit dicloaxetic. Tỷ lệ mol của chất khử bảo vệ với nhóm bảo vệ 4,4'-dimetoxytrityl trên giá đỡ pha rắn là 2:1 đến 100:1, và theo một số phương án, là 3:1 đến 50:1.

Điều kiện phản ứng liên kết có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0-50°C, và theo một số phương án, 15-35°C. Tỷ lệ mol của trình tự axit nucleic liên kết với giá đỡ pha rắn với monome nucleosit là 1:1 đến 1:50, và theo một số phương án, là 1:5 đến 1:15. Tỷ lệ mol của trình tự axit nucleic được liên kết với giá đỡ pha rắn với chất liên kết là 1:1 đến 1:100, và theo một số phương án, là 1:50 đến 1:80. Việc lựa chọn thời gian phản ứng và chất liên kết có thể giống như trên.

Điều kiện phản ứng gắn mũ có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0-50°C, và theo một số phương án, 15-35°C, và thời gian phản ứng là 5-500 giây, và theo một số phương án, 10-100 giây. Việc lựa chọn chất gắn mũ có thể tương tự như bên trên. Tỷ lệ mol của tổng lượng chất gắn mũ với trình tự axit nucleic được liên kết với giá đỡ pha rắn có thể là 1:100 đến 100:1, và theo một số phương án, là 1:10 đến 10:1. Trong trường hợp chất gắn mũ sử dụng axetic anhydrit đẳng mol và N-metylimidazol, tỷ lệ mol của axetic anhydrit, N-metylimidazol, và trình tự axit nucleic được liên kết với giá đỡ pha rắn có thể là 1:1:10 - 10:10:1, và theo một số phương án, là 1:1:2 - 2:2:1.

Điều kiện phản ứng oxy hóa có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0-50°C, và theo một số phương án, 15-35°C, và thời gian phản ứng là 1-100 giây, và theo một số phương án, 5-50 giây. Theo một số phương án, chất oxy hóa là iot (theo một số phương án được cung cấp là nước iot). Tỷ lệ mol của chất oxy hóa với trình tự axit nucleic được liên kết với giá đỡ pha rắn trong bước liên kết có thể là 1:1 đến 100:1, và

theo một số phương án, là 5:1 đến 50:1. Theo một số phương án, phản ứng oxy hóa được thực hiện trong dung môi hỗn hợp trong đó tỷ lệ của tetrahydrofuran: nước: pyridin là 3:1:1-1:1:3. Điều kiện phản ứng lưu huỳnh hóa có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0-50°C, và theo một số phương án, 15-35°C, và thời gian phản ứng là 50-2000 giây, và theo một số phương án, 100-1000 giây. Theo một số phương án, chất lưu huỳnh hóa là xanthan hydrua. Tỷ lệ mol của chất lưu huỳnh hóa với trình tự axit nucleic liên kết với giá đỡ pha rắn trong bước liên kết là 10:1 đến 1000:1, và theo một số phương án, là 10:1 đến 500:1. Theo một số phương án, phản ứng lưu huỳnh hóa được thực hiện trong dung môi hỗn hợp trong đó tỷ lệ của axetonitril: pyridin là 1:3-3:1.

Phương pháp còn bao gồm việc phân lập chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa của siARN sau khi liên kết toàn bộ monome nucleosit và trước khi bắt cặp. Phương pháp phân lập được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và thường bao gồm việc cắt trình tự nucleotit được tổng hợp từ giá đỡ pha rắn, loại bỏ nhóm bảo vệ trên bazơ, nhóm phosphat và phối tử, tinh chế và khử muối.

Phương pháp cắt và khử bảo vệ thông thường trong tổng hợp siARN có thể được sử dụng để cắt trình tự nucleotit được tổng hợp từ giá đỡ pha rắn, và loại bỏ nhóm bảo vệ trên bazơ, nhóm phosphat và phối tử. Ví dụ, cho trình tự nucleotit thu được đã liên kết tiếp xúc với giá đỡ pha rắn với amoniac chứa nước được cô; trong quá trình khử bảo vệ, nhóm bảo vệ $YCOO^-$ trong nhóm A46-A54 được chuyển đổi thành nhóm hydroxyl, và nhờ đó nhóm S_1 được chuyển đổi thành nhóm M_1 tương ứng, tạo ra thể liên hợp như được thể hiện bởi công thức (1); trong đó amoniac nước cô đặc có thể là amoniac nước có nồng độ là 25-30% khối lượng. Lượng amoniac nước cô đặc có thể là 0,2 ml/μmol-0,8 ml/μmol đối với siARN đích.

Khi có ít nhất một số sự bảo vệ 2'-TBDMS trên trình tự nucleotit được tổng hợp, phương pháp còn bao gồm cho trình tự nucleotit được loại bỏ từ giá đỡ pha rắn tiếp xúc với trietylamin trihydroflorua để loại bỏ sự bảo vệ 2'-TBDMS. Ở đây, trình tự siARN đích thu được chứa nucleosit tương ứng có 2'-hydroxy tự do. Lượng trietylamin trihydroflorua tinh khiết là 0,4 ml/μmol-1,0 ml/μmol đối với trình tự siARN đích. Như vậy, thể liên hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (1) có thể thu được.

Phương pháp tinh chế và khử muối được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, tinh chế axit nucleic có thể được thực hiện sử dụng cột tinh chế sắc ký ion điều chế với giải hấp gradien NaBr hoặc NaCl; sau khi thu gom và kết hợp sản phẩm, khử muối có thể được thực hiện sử dụng cột tinh chế sắc ký pha đảo.

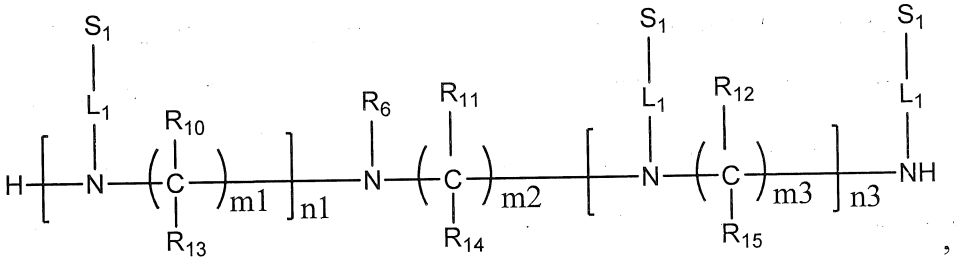
Nguyên tử không tạo cầu nối oxy hoặc lưu huỳnh trong liên kết phosphodieste hoặc liên kết phosphorothioat dieste giữa nucleotit trong thể liên hợp siARN thu được gần như liên kết với ion natri, và thể liên hợp siARN gần như có trong dạng của muối natri. Phương pháp trao đổi ion đã biết rõ có thể được sử dụng, trong đó ion natri có thể được thay thế bằng ion hydro và/hoặc cation khác, nhờ đó tạo ra các dạng khác của thể liên hợp siARN. Cation như được mô tả ở trên.

Trong quá trình tổng hợp, độ tinh khiết và khối lượng mol của trình tự axit nucleic có thể được xác định tại bất kỳ thời gian nào, để kiểm soát tốt hơn chất lượng tổng hợp. Phương pháp xác định được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, độ tinh khiết của axit nucleic có thể được xác định bằng sắc ký trao đổi ion, và khối lượng mol có thể được xác định bằng sắc ký lỏng-phổ khối (LC-MS).

Phương pháp bắt cặp cũng được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, chuỗi có nghĩa được tổng hợp (chuỗi S) và chuỗi đối nghĩa (chuỗi AS) có thể được trộn đơn giản trong nước để tiêm tại tỷ lệ đẳng mol, gia nhiệt đến 70-95°C, và sau đó làm lạnh xuống nhiệt độ phòng để tạo thành cấu trúc chuỗi kép thông qua liên kết hydro. Vì thế, thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế có thể thu được.

Sau khi thu được thể liên hợp, theo một số phương án, thể liên hợp siARN thứ hai nhờ đó tổng hợp có thể cũng được đặc trưng bởi cách thức như dò khối lượng mol sử dụng phương pháp như LC-MS, để xác nhận thể liên hợp siARN được tổng hợp là thể liên hợp siARN thứ hai được thiết kế cần quan tâm, và trình tự của siARN được tổng hợp là trình tự của trình tự siARN mong muốn cần được tổng hợp, ví dụ, là một trong số các trình tự được liệt kê trong bảng 1 nêu trên.

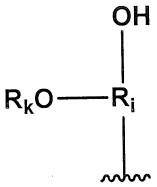
Hợp chất như được hiển thị bằng công thức (321) có thể được điều chế bằng phương pháp sau bao gồm: cho hợp chất được thể hiện bằng công thức (313) tiếp xúc với anhydrit vòng trong dung môi hữu cơ dưới điều kiện phản ứng este hóa với sự có mặt của bazơ và chất xúc tác quá trình este hóa; phân lập hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) bằng trao đổi ion:



Công thức (313)

trong đó các định nghĩa và tùy chọn của n1, n3, m1, m2, m3, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, L_1, S_1 lần lượt như được mô tả bên trên;

R_6 là nhóm để cung cấp R_4 có công thức (321). Theo một số phương án, ví dụ, R_6 có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (A61):



Công thức (A61),

trong đó,

R_i là nhóm bất kỳ có thể liên kết với nguyên tử N trên khung nitơ, liên kết với R_kO và liên kết với nhóm hydroxy tự do; R_k là nhóm bảo vệ hydroxy. Trong trường hợp này, hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) thu được, trong đó R_4 chứa nhóm chức thứ nhất làm nhóm bảo vệ hydroxy và nhóm chức thứ hai chứa nhóm như được thể hiện bởi công thức (C1) hoặc (C2).

Điều kiện phản ứng este hóa có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0-100°C và thời gian phản ứng là 8-48 giờ. Theo một số phương án, điều kiện phản ứng este hóa có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 10-40°C và thời gian phản ứng là 20-30 giờ.

Theo một số phương án, dung môi hữu cơ chứa một hoặc nhiều dung môi epoxy, dung môi ete, dung môi haloalkan, dimetyl sulfoxit, N,N-dimetylformamit, và N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, dung môi epoxy là dioxan và/hoặc tetrahydrofuran. Theo một số phương án, dung môi ete là dietyl ete và/hoặc metyl tertbutyl ete. Theo một số phương án, dung môi haloalkan là một hoặc nhiều diclometan, triclometan và 1,2-dicloetan. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là diclometan. Lượng dung môi hữu cơ là 3-50 L/mol, và theo một số phương án, 5-20 L/mol, đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (313).

Theo một số phương án, anhydrit vòng là một trong số suxinic anhydrit, glutaric anhydrit, adipic anhydrit hoặc pimelic anhydrit, và theo một số phương án, anhydrit vòng là suxinic anhydrit. Tỷ lệ mol của anhydrit vòng đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (313) là 1:1 đến 10:1, và theo một số phương án, 2:1 đến 5:1.

Chất xúc tác este có thể là bất kỳ chất xúc tác có thể este hóa quá trình xúc tác, như 4-dimetylaminopyridin. Tỷ lệ mol của chất xúc tác đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (313) là 1:1 đến 10:1, và theo một số phương án, là 2:1 đến 5:1.

Theo một số phương án, bazơ có thể là bất kỳ bazơ vô cơ, bazơ hữu cơ hoặc tổ hợp của nó. Xem xét độ hòa tan và độ ổn định của sản phẩm, bazơ là bazơ hữu cơ của amin bậc ba. Theo một số phương án, bazơ hữu cơ của amin bậc ba là trietylamin hoặc N,N-diisopropyletylamin. Tỷ lệ mol của bazơ hữu cơ của amin bậc ba đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (313) là 1:1 đến 20:1, và theo một số phương án, là 3:1 đến 10:1.

Trao đổi ion là chức năng chuyển hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) thành dạng mong muốn của axit carboxylic hoặc muối carboxylic và phương pháp trao đổi ion được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phân tử liên hợp nêu trên trong đó cation là M^+ có thể thu được bằng cách sử dụng dung dịch trao đổi ion thích hợp và điều kiện trao đổi ion, không được mô tả chi tiết ở đây. Theo một số phương án, dung dịch trietylamin phosphat được sử dụng trong phản ứng trao đổi ion. Theo một số phương án, nồng độ của dung dịch trietylamin phosphat là

0,2-0,8 M. Theo một số phương án, nồng độ của dung dịch trietylamin phosphat là 0,4-0,6 M. Theo một số phương án, lượng dung dịch trietylamin phosphat là 3-6 L/mol, và theo phương án khác, 4-5 L/mol, đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (313).

Hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) có thể được phân lập từ hỗn hợp phản ứng sử dụng bất kỳ phương pháp phân lập thích hợp. Theo một số phương án, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) có thể được phân lập bằng cách loại bỏ dung môi qua quá trình bay hơi sau đó bằng kỹ thuật sắc ký, ví dụ, sử dụng các điều kiện sắc ký sau cho phân lập: (1) tinh chế pha thường: lớp đệm 200-300 mesh silica gel, giải hấp gradien 1‰ khối lượng trietylamin trong diclometan: metanol = 100:18-100:20; hoặc (2) tinh chế pha đảo: lớp đệm pha đảo C18 và C8, giải hấp gradien của metanol:axetonitril = 0,1:1-1:0,1. Theo một số phương án, dung môi có thể được loại bỏ trực tiếp để thu được sản phẩm thô của hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321), có thể được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) còn bao gồm: cho sản phẩm thu được từ phản ứng trao đổi ion bên trên tiếp xúc với giá đỡ pha rắn với nhóm amino hoặc hydroxy trong dung môi hữu cơ dưới điều kiện phản ứng ngưng tụ với sự có mặt của chất ngưng tụ và bazơ hữu cơ của amin bậc ba. Trong trường hợp này, hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) thu được, trong đó R_4 chứa nhóm chức thứ nhất bao gồm nhóm bảo vệ hydroxy và nhóm chức thứ hai có cấu trúc như được thể hiện bằng công thức (C1').

Giá đỡ pha rắn là một trong số các giá đỡ sử dụng trong tổng hợp pha rắn của siARN, một vài chất được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, giá đỡ pha rắn có thể được chọn từ giá đỡ pha rắn chứa nhóm chức hydroxy hoặc amino hoạt tính. Theo một số phương án, giá đỡ pha rắn là nhựa amino hoặc hydroxy. Đối với mục đích tạo điều kiện tổng hợp pha rắn tiếp theo của axit nucleic, nhựa amino hoặc hydroxy có theo một số phương án các thông số sau: kích cỡ hạt là 100-400 mesh, và lượng nạp amino hoặc hydroxy bề mặt là 0,2-0,5 mmol/g. Tỷ lệ của hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) đối với giá đỡ pha rắn là 10 μmol hợp

chất mỗi gam của giá đỡ pha rắn (μmol/g) đối với 400 μmol/g. Theo một số phương án, tỷ lệ của hợp chất có công thức (321) với giá đỡ pha rắn là 50 μmol/g đến 200 μmol/g.

Dung môi hữu cơ có thể là bất kỳ dung môi thích hợp hoặc dung môi được trộn biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều axetonitril, dung môi epoxy, dung môi ete, dung môi haloalkan, dimetyl sulfoxit, N,N-dimetylformamit, và N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, dung môi epoxy là dioxan và/hoặc tetrahydrofuran; dung môi ete là dietyl ete và/hoặc metyl tertbutyl ete; dung môi haloalkan là một hoặc nhiều diclometan, triclometan và 1,2-dicloetan. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là axetonitril. Lượng dung môi hữu cơ là 20-200 L/mol, theo một số phương án, 50-100 L/mol, đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321).

Chất ngưng tụ có thể là benzotriazol-1-yl- oxytripyrolidinophosphoni hexaflophosphat, 3-dietoxyphosphoryl-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on và/hoặc O-benzotriazol-tetrametyluroni hexaflophosphat. Theo một số phương án, chất ngưng tụ là O-benzotriazol- tetrametyluroni hexaflophosphat. Tỷ lệ mol của chất ngưng tụ đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) là 1:1 đến 20:1, và theo một số phương án, 1:1 đến 5:1.

Theo một số phương án, bazơ hữu cơ của amin bậc ba là trietylamin và/hoặc N,N-diisopropyletylamin, và theo một số phương án, N,N-diisopropyletylamin. Tỷ lệ mol của bazơ hữu cơ của amin bậc ba với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) là 1:1 với 20:1, và theo một số phương án, 1:1 đến 5:1.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) còn bao gồm: cho sản phẩm ngưng tụ thu được tiếp xúc với chất gắn mũ và chất xúc tác axyl hóa trong dung môi hữu cơ dưới điều kiện phản ứng gắn mũ, và phân lập hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321). Phản ứng gắn mũ được sử dụng để loại bỏ bất kỳ nhóm chức hoạt chất không phản ứng hoàn toàn, nhằm tránh tạo ra các sản phẩm phụ không cần thiết trong các phản ứng tiếp theo. Điều kiện phản ứng gắn mũ có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0-50°C, và theo một số phương án,

15-35°C, và thời gian phản ứng là 1-10 giờ, và theo một số phương án, 3-6 giờ. Chất gắn mũ có thể là chất gắn mũ được sử dụng trong tổng hợp pha rắn của siARN, được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một số phương án, chất gắn mũ gồm chất gắn mũ A (capA) và chất gắn mũ B (capB). CapA là N-metylimidazol, và theo một số phương án, được cung cấp làm dung dịch đã trộn chứa N-metylimidazol trong pyridin/axetonitril, trong đó tỷ lệ thể tích của pyridin với axetonitril là 1:10 đến 1:1, và theo một số phương án, 1:3 đến 1:1. Theo một số phương án, tỷ lệ của toàn bộ thể tích của pyridin và axetonitril đối với thể tích của N-metylimidazol là 1:1 đến 10:1, và theo một số phương án, 3:1 đến 7:1. Chất gắn mũ B axetic anhydrit. Theo một số phương án, capB được tạo ra dưới dạng dung dịch chứa axetic anhydrit trong axetonitril, trong đó tỷ lệ thể tích của axetic anhydrit với axetonitril là 1:1 đến 1:10, và theo một số phương án, 1:2 đến 1:6.

Theo một số phương án, tỷ lệ của thể tích của dung dịch đã trộn chứa N-metylimidazol trong pyridin/axetonitril đối với khối lượng của hợp chất có công thức (321) là 5 ml/g-50 ml/g, và theo một số phương án, 15ml/g-30ml/g. Tỷ lệ của thể tích của dung dịch chứa axetic anhydrit trong axetonitril đối với khối lượng của hợp chất có công thức (321) là 0,5 ml/g-10 ml/g, và theo một số phương án, 1 ml/g-5 ml/g.

Theo một số phương án, chất gắn mũ chứa đẳng mol axetic anhydrit và N-metylimidazol. Dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều axetonitril, dung môi epoxy, dung môi ete, dung môi haloalkan, dimetyl sulfoxit, N,N-dimetylformamit, và N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là axetonitril. Lượng dung môi hữu cơ là 10-50 L/mol, và theo một số phương án, 5-30 L/mol, đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321).

Chất xúc tác axyl hóa có thể được chọn từ bất kỳ chất xúc tác có thể được sử dụng để ngưng tụ quá trình este hóa hoặc amit hóa, như hợp chất dị vòng kiềm. Theo một số phương án, chất xúc tác axyl hóa là 4-dimetylaminopyridin. Tỷ lệ khối lượng của chất xúc tác với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) có thể là 0,001:1 đến 1:1, và theo một số phương án, 0,01:1 đến 0,1:1.

Hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) có thể được phân lập từ hỗn hợp phản ứng bằng bất kỳ phương pháp thích hợp. Theo một số phương án, hợp chất có công thức (321) có thể thu được bằng cách rửa kỹ với dung môi hữu cơ và lọc để loại bỏ chất phản ứng không phản ứng, chất gắn mũ dư và tạp chất khác, trong đó dung môi hữu cơ được chọn từ axetonitril, diclometan, hoặc metanol. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là axetonitril.

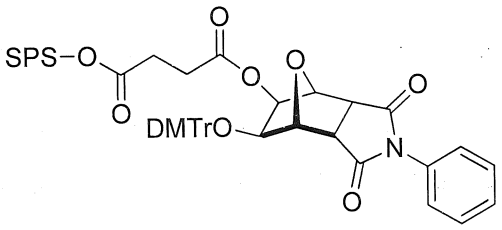
Theo một số phương án, việc điều chế phân tử liên hợp như được thể hiện bởi công thức (321) bao gồm việc cho hợp chất được thể hiện bằng công thức (313) tiếp xúc với phosphorodiamidit trong dung môi hữu cơ dưới điều kiện phản ứng liên kết với sự có mặt của chất liên kết, và phân lập hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321). Trong trường hợp này, hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) được thu, trong đó R_4 chứa nhóm chức thứ nhất bao gồm nhóm bảo vệ hydroxy và nhóm chức thứ hai có cấu trúc như được thể hiện bằng công thức (C3).

Theo một số phương án, điều kiện phản ứng liên kết có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0-50°C, như 15-35°C. Tỷ lệ mol của hợp chất có công thức (313) với phosphorodiamidit có thể là 1:1 đến 1:50, như 1:5 đến 1:15. Tỷ lệ mol của hợp chất có công thức (313) với chất liên kết có thể là 1:1 đến 1:100, như 1:50 đến 1:80. Thời gian phản ứng có thể là 200-3000 giây, như 500-1500 giây. Phosphorodiamidit có thể là, ví dụ, bis(diisopropylamino)(2-xyanoetoxy)phosphin, có thể có sẵn trên thị trường hoặc được tổng hợp theo phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chất liên kết được chọn từ một hoặc nhiều 1H-tetrazol, 5-etylthio-1H-tetrazol và 5-benzylthio-1H-tetrazol, như 5-etylthio-1H-tetrazol. Phản ứng liên kết có thể được thực hiện trong dung môi hữu cơ. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ được chọn từ một hoặc nhiều axetonitril khan, DMF khan và diclometan khan, như axetonitril khan. Lượng dung môi hữu cơ có thể là 3-50 L/mol, như 5-20 L/mol, đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (313). Bằng cách thực hiện phản ứng liên kết, nhóm hydroxy trong hợp chất (313) phản ứng với phosphorodiamidit để tạo thành nhóm phosphoramidit. Theo một số phương án, dung môi có thể được loại bỏ trực tiếp để thu được sản phẩm thô của hợp

chất như được thể hiện bằng công thức (321), có thể được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321) còn bao gồm: cho sản phẩm đã phân lập với giá đỡ pha rắn tiếp xúc với nhóm hydroxy trong dung môi hữu cơ dưới điều kiện phản ứng liên kết với sự có mặt của chất liên kết, sau đó gắn mũ, oxy hóa, và phân lập, để thu được hợp chất như được thể hiện bằng công thức (321), trong đó R_4 nhóm chức thứ nhất bao gồm nhóm bảo vệ hydroxy và nhóm chức thứ hai có cấu trúc như được thể hiện bằng công thức (C3').

Theo một số phương án, giá đỡ pha rắn là giá đỡ đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này để tổng hợp pha rắn của axit nucleic, như giá đỡ pha rắn phổ biến có sẵn trên thị trường khử bảo vệ , như NittoPhase®HL UnyLinker™ 300 Oligonucleotide Synthesis Support, Kinovate Life Sciences, như được thể hiện bởi công thức B80:



Công thức (B80).

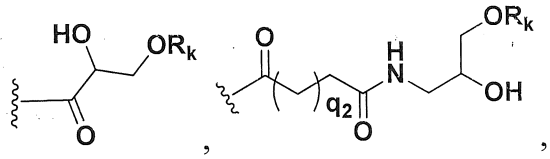
Phản ứng khử bảo vệ đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, điều kiện khử bảo vệ có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0-50°C, như 15-35°C, và thời gian phản ứng là 30-300 giây, như 50-150 giây. Chất khử bảo vệ có thể được chọn từ một hoặc nhiều axit trifloaxetic, axit tricloaxetic, axit dicloaxetic, và axit monocloaxetic. Theo một số phương án, chất khử bảo vệ là axit dicloaxetic. Tỷ lệ mol của chất khử bảo vệ với nhóm bảo vệ -DMTr (4,4'-dimetoxytrityl) trên giá đỡ pha rắn có thể là 2:1 đến 100:1, như 3:1 đến 50:1. Bằng cách khử bảo vệ, nhóm hydroxy tự do phản ứng thu được trên bề mặt của giá đỡ pha rắn, để tạo điều kiện phản ứng liên kết tiếp theo.

Điều kiện phản ứng liên kết và chất liên kết có thể được lựa chọn như nêu trên. Bằng phản ứng liên kết này, nhóm hydroxy tự do tạo thành trong phản ứng khử bảo vệ phản ứng với nhóm phosphoramidit, để tạo thành liên kết phosphit este.

Theo một số phương án, điều kiện phản ứng gắn mũ có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0-50°C, như 15-35°C, và thời gian phản ứng là 5-500 giây, như 10-100 giây. Phản ứng gắn mũ được thực hiện với sự có mặt của chất gắn mũ. Việc lựa chọn và lượng chất gắn mũ là như nêu trên.

Điều kiện phản ứng oxy hóa có thể có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0-50°C, như 15-35°C, và thời gian phản ứng là 1-100 giây, như 5-50 giây. Chất oxy hóa có thể là, ví dụ, iot (theo một số phương án, được đề cập là nước iot). Theo một số phương án, tỷ lệ mol của chất oxy hóa đối với nhóm phosphit este là 1:1 đến 100:1, tốt hơn là 5:1 đến 50:1. Theo một số phương án, phản ứng oxy hóa được thực hiện trong dung môi hỗn hợp trong đó tỷ lệ của tetrahydrofuran: nước: pyridin là 3:1:1-1:1:3.

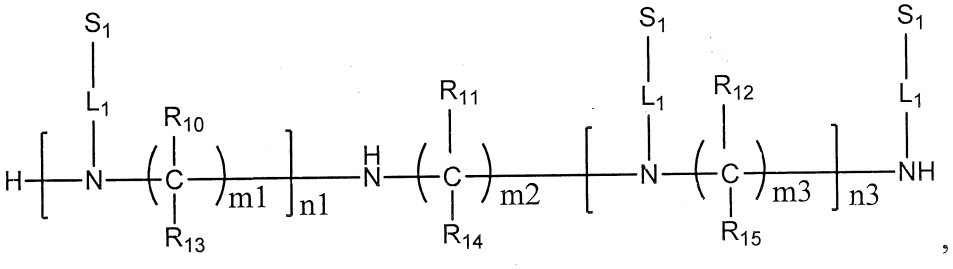
Theo một số phương án, R_6 là nhóm như được thể hiện bởi công thức B7 hoặc B8:



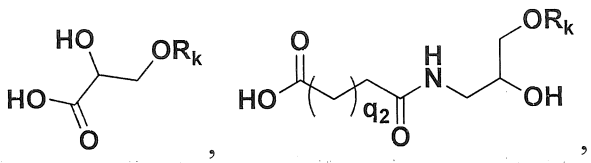
(B7) (B8)

trong đó q_2 là như được định nghĩa nêu trên.

Trong trường hợp này, hợp chất thể hiện trong công thức (313) có thể được điều chế bằng phương pháp điều chế sau bao gồm: cho hợp chất như được thể hiện bằng công thức (314) tiếp xúc với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (A-1) hoặc (A-2) trong dung môi hữu cơ dưới điều kiện phản ứng amit hóa với sự có mặt của chất ngưng tụ amit hóa và bazơ hữu cơ của amin bậc ba, và phân lập:



Công thức (314)



(A-1) (A-2)

trong đó các định nghĩa và tùy chọn của n1, n3, m1, m2, m3, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, L_1, S_1, q_2 và R_k lần lượt như được mô tả bên trên.

Điều kiện phản ứng amit hóa có thể có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0 đến 100°C và thời gian phản ứng là 1 đến 48 giờ. Theo một số phương án, điều kiện phản ứng amit hóa có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 10-40°C và thời gian phản ứng là 2-16 giờ.

Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều dung môi rượu, dung môi epoxy, dung môi ete, dung môi haloalkan, dimetyl sulfoxit, N,N-dimetylformamit, và N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, dung môi rượu là một hoặc nhiều metanol, etanol và propanol, và trong các phương án khác, etanol. Theo một số phương án, dung môi epoxy là dioxan và/hoặc tetrahydrofuran. Theo một số phương án, dung môi ete là dietyl ete và/hoặc metyl tertbutyl ete. Theo một số phương án, dung môi haloalkan là một hoặc nhiều diclometan, triclometan và 1,2-dicloetan. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là diclometan. Lượng dung môi hữu cơ là 3-50 L/mol, và theo một số phương án, 3-20 L/mol, đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (314).

Theo một số phương án, chất để ngưng tụ amit hóa là benzotriazol-1-yl-oxytri pyrolidinophosphoni hexaflophosphat, 3-(dietoxyphosphoryloxy)- 1,2,3-benzo trizin-4(3H)-on, 4-(4,6-dimetoxytriazin-2-yl)-4-metylmorpholin hydroclorua, 2-etoxy-1-etoxycacbonyl-1,2-dihydroquinolin (EEDQ) hoặc O-benzotriazol -tetrametyluroni hexaflophosphat, và theo các phương án khác, 3-(dietoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on. Tỷ lệ mol của chất ngưng tụ amit hóa với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (314) có thể là 1:1 đến 10:1, và theo một số phương án, 2,5:1 đến 5:1.

Theo một số phương án, bazơ hữu cơ của amin bậc ba là trietylamin hoặc N,N-diisopropyletylamin, và theo một số phương án, N,N-diisopropyletylamin. Tỷ lệ mol của amin bậc ba với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (314) có thể là 3:1 đến 20:1, và theo một số phương án, 5:1 đến 10:1.

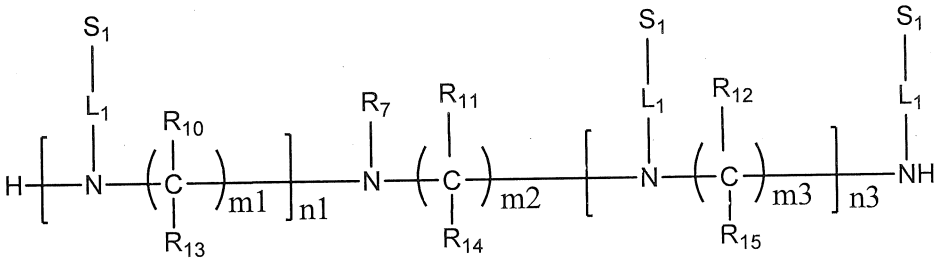
Hợp chất có công thức (A-1) và (A-2) có thể được điều chế bằng bất kỳ phương pháp thích hợp. Ví dụ, khi R_k là nhóm DMTr, hợp chất có công thức (A-1) có thể được điều chế bằng cách cho canxi glyxerat phản ứng với DMTrCl. Tương tự, hợp chất có công thức (A-2) có thể được điều chế bằng cách cho tiếp xúc 3-amino-1,2-propandiol với anhydrit vòng và sau đó cho phản ứng với DMTrCl, trong đó anhydrit vòng có thể có 4-13 nguyên tử cacbon, và theo một số phương án, 4-8 nguyên tử cacbon. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng hiểu rằng việc lựa chọn anhydrit vòng khác nhau tương ứng với các giá trị khác nhau đối với q_2 trong hợp chất có công thức (A-2). Ví dụ, khi anhydrit vòng là suxinic anhydrit, q_2=1; khi anhydrit vòng là glutaric anhydrit, q_2=2, và v.v..

Theo một vài biến thể, hợp chất có công thức (313) cũng có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất như được thể hiện bằng công thức (314) phản ứng liên tục với anhydrit vòng, 3-amino-1,2-propandiol, và DMTrCl. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng hiểu rằng các biến thể này sẽ không làm ảnh hưởng cấu trúc và chức năng của hợp chất có công thức (313), và các biến thể này có thể đạt được dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này trên cơ sở của phương pháp nêu trên.

Tương tự, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (313) có thể được phân lập từ hỗn hợp phản ứng bằng bất kỳ phương pháp phân lập thích hợp nào. Theo một số phương án, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (313) có thể được phân lập bằng cách loại bỏ dung môi qua quá trình bay hơi sau đó bằng kỹ thuật sắc ký, ví dụ, sử dụng hai bộ điều kiện sắc ký để phân lập: (1) tinh chế pha thường: 200-300 mesh lớp đệm silica gel, giải hấp gradien của ete dầu mỏ: etyl axetat: diclometan: N,N-dimetylformamit = 1:1:1:0,5-1:1:1:0,6; và (2) tinh chế pha đảo: lớp đệm pha đảo C18 và C8, giải hấp gradien của metanol: axetonitril = 0,1:1-1:0,1. Theo một số phương án,

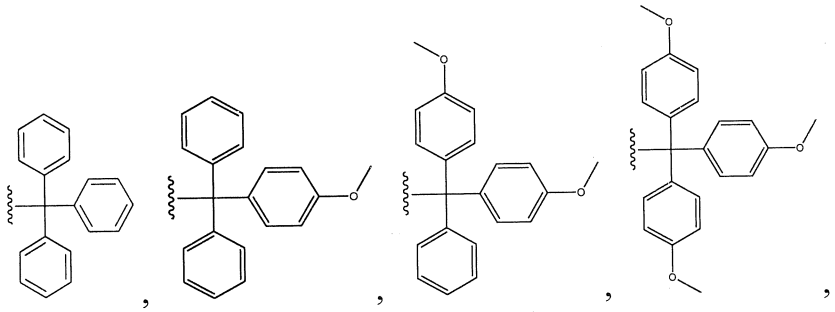
dung môi có thể được loại bỏ trực tiếp để thu được sản phẩm thô của hợp chất như được thể hiện bằng công thức (313), có thể được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo.

Theo một số phương án, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (314) có thể được điều chế bằng phương pháp điều chế sau bao gồm việc cho hợp chất như được thể hiện bằng công thức (315) tiếp xúc với axit haloaxetic trong dung môi hữu cơ dưới điều kiện phản ứng khử bảo vệ, và sau đó phân lập:



Công thức (315)

trong đó R_7 được chọn từ nhóm như được thể hiện bởi công thức (330), (331), (332) và (333), và theo một số phương án, R_7 có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (330):



Công thức (330) Công thức (331) Công thức (332) Công thức (333)

trong đó các định nghĩa và tùy chọn của n1, n3, m1, m2, m3, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, L_1 và S_1 lần lượt như được mô tả bên trên.

Axit haloaxetic có thể được chọn từ một hoặc nhiều axit dicloaxetic, axit tricloaxetic, axit monocloaxetic và axit trifloaxetic, và theo một số phương án, axit dicloaxetic.

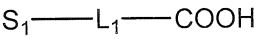
Điều kiện phản ứng khử bảo vệ có thể có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0-100°C và thời gian phản ứng là 0,1-24 giờ, và theo một số phương án có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 10-40°C và thời gian phản ứng là 0,5-16 giờ.

Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều dung môi epoxy, dung môi ete, dung môi haloalkan, dimetyl sulfoxit, N,N-dimetylformamit, và N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, dung môi epoxy là dioxan và/hoặc tetrahydrofuran. Theo một số phương án, dung môi ete là dietyl ete và/hoặc metyl tertbutyl ete. Theo một số phương án, dung môi haloalkan là một hoặc nhiều diclometan, triclometan và 1,2-dicloetan. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là diclometan. Lượng dung môi hữu cơ là 3-50 L/mol, và theo một số phương án, 5-20 L/mol, đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (315).

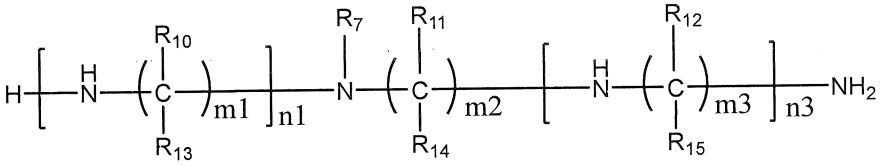
Tỷ lệ mol của axit haloaxetic với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (315) là 5:1 đến 100:1, và theo một số phương án, 10:1 đến 50:1.

Tương tự, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (314) có thể được phân lập từ hỗn hợp phản ứng bằng bất kỳ phương pháp phân lập thích hợp. Theo một số phương án, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (314) có thể được phân lập bằng cách loại bỏ dung môi thông qua quá trình bay hơi sau đó bằng kỹ thuật sắc ký, ví dụ, sử dụng hai bộ điều kiện sắc ký sau để phân lập, (1) tinh chế pha thường: 200-300 mesh lớp đệm silica gel, giải hấp gradien diclometan: metanol = 100:30-100:40; và (2) tinh chế pha đảo: lớp đệm pha đảo C18 và C8, giải hấp gradien của metanol: axetonitril = 0,1:1-1:0,1. Theo một số phương án, dung môi có thể được loại bỏ trực tiếp để thu được sản phẩm thô của hợp chất như được thể hiện bằng công thức (314), có thể được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo.

Hợp chất như được thể hiện bằng công thức (315) có thể được điều chế bằng phương pháp sau bao gồm cho tiếp xúc hợp chất như được thể hiện bằng công thức (317) với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (316) trong dung môi hữu cơ dưới điều kiện phản ứng ngưng tụ với sự có mặt của chất ngưng tụ amit hóa và bazơ hữu cơ của amin bậc ba, và phân lập:



Công thức (316),



Công thức (317),

trong đó các định nghĩa và tùy chọn của n1, n3, m1, m2, m3, R_7, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, L_1 và S_1 lần lượt như được mô tả bên trên.

Hợp chất có công thức (316) có thể là, như, hợp chất được bộc lộ trong J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 16958-16961. Ngoài ra, hợp chất có công thức (316) có thể được điều chế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này qua các phương pháp khác nhau. Ví dụ, một số hợp chất có công thức (316) có thể được điều chế theo phương pháp như được bộc lộ trong ví dụ của patent Mỹ số 8,106,022 B2, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một số phương án, điều kiện phản ứng ngưng tụ có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0-100°C và thời gian phản ứng là 0,1-24 giờ. Theo một số phương án, điều kiện phản ứng ngưng tụ có nhiệt độ phản ứng là 10-40°C và thời gian phản ứng là 0,5-16 giờ.

Tỷ lệ mol của hợp chất như được thể hiện bằng công thức (316) với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (317) có thể là 2:1 đến 10:1, và theo một số phương án, 2,5:1 đến 5:1.

Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều axetonitril, dung môi epoxy, dung môi ete, dung môi haloalkan, dimetyl sulfoxit, N,N-dimetylformamit và N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, dung môi epoxy là dioxan và/hoặc tetrahydrofuran. Theo một số phương án, dung môi ete là dietyl ete và/hoặc metyl tertbutyl ete. Theo một số phương án, dung môi haloalkan là một hoặc nhiều diclometan, triclometan và 1,2-dicloetan. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là axetonitril. Lượng dung môi hữu cơ có thể là 3-50 L/mol, và theo một số phương án, 5-20 L/mol, đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (317).

Chất ngưng tụ amit hóa là benzotriazol-1-yl-oxytripyrolidinophosphoni hexaflophosphat, 3-(dietoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT), O-benzotriazol-tetrametyluroni hexaflophosphat hoặc 4-(4,6-dimetoxytriazin-2-yl)-4-metylmorpholin hydroclorua, và theo một số phương án, là 4-(4,6-dimetoxytriazin-2-yl)-4-metylmorpholin hydroclorua. Tỷ lệ mol của chất ngưng tụ amit hóa với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (317) là 2:1 đến 10:1, và theo một số phương án, là 2,5:1 đến 5:1.

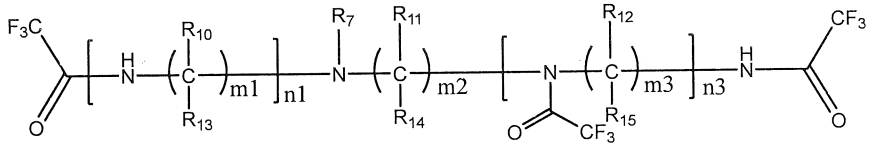
Bazơ hữu cơ của amin bậc ba là N-metylmorpholin, trietylamin hoặc N,N-diisopropyletylamin, và theo một số phương án, N-metylmorpholin. Tỷ lệ mol của amin bậc ba với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (317) có thể là 3:1 đến 20:1, và theo một số phương án, là 5:1 đến 10:1.

Tương tự, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (315) có thể được phân lập từ hỗn hợp phản ứng bằng phương pháp phân lập thích hợp. Theo một số phương án, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (315) được phân lập bằng cách loại bỏ dung môi qua quá trình bay hơi sau đó bằng kỹ thuật sắc ký, ví dụ, sử dụng hai bộ điều kiện sắc ký sau để phân lập, (1) tinh chế pha thường: 200-300 mesh lớp đệm silica gel, giải hấp gradien diclometan: metanol = 100:5-100:7; (2) tinh chế pha đảo: Lớp đệm pha đảo C18 và C8, giải hấp gradien của metanol: axetonitril = 0,1:1-1:0,1. Theo một số phương án, dung môi được loại bỏ trực tiếp để thu được sản phẩm thô của hợp chất như được thể hiện bằng công thức (315), có thể được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức (317) phản ứng với lượng vừa đủ của một hợp chất có công thức (316) trong một mẻ để thu được hợp chất mong muốn có công thức (315), trong đó toàn bộ gốc S_1-L_1 là giống nhau. Theo một số phương án, hợp chất có công thức (317) phản ứng với hợp chất khác nhau có công thức (316) trong các mẻ như mong muốn, nghĩa là, hợp chất có công thức (316) có L_1 và/hoặc S_1 khác nhau, để thu được hợp chất có công thức (315) có hai hoặc nhiều loại S_1 và/hoặc L_1 trong đó. Ví dụ, 1 eq của hợp chất có công thức (317) có thể được tiếp xúc đầu tiên với 2 eq của hợp chất thứ nhất có công thức (316) để gắn các gốc S_1-L_1 đầu tiên với hai nhóm amin đầu tận thứ nhất trong hợp chất có công thức (317), và sau đó tiếp xúc với (n3+n1-1) eq

của hợp chất có công thức thứ hai (316) để gắn các gốc S_1-L_1 thứ hai với nhóm amin (n3+n1-1) thứ hai trong hợp chất có công thức (317), trong đó định nghĩa và phạm vi của n3 và n1 là như được mô tả ở trên.

Theo một số phương án, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (317) có thể được điều chế bằng phương pháp sau bao gồm cho hợp chất như được thể hiện bằng công thức (318) tiếp xúc với dung dịch metylamin nước dưới điều kiện phản ứng khử bảo vệ với sự có mặt của dung môi hữu cơ, và phân lập:



Công thức (318),

trong đó các định nghĩa và tùy chọn của n1, n3, m1, m2, m3, R_7, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} lần lượt như được mô tả bên trên.

Điều kiện phản ứng khử bảo vệ có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0-150°C và thời gian phản ứng là 5-72 giờ, và theo một số phương án có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 20-80°C và thời gian phản ứng là 10-30 giờ.

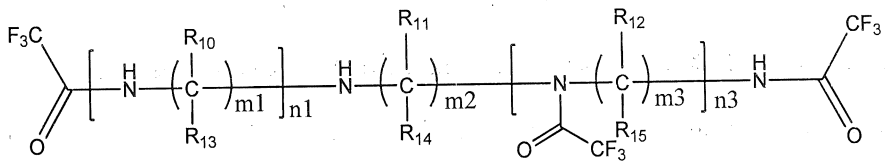
Dung môi hữu cơ được chọn từ rượu, theo một số phương án, là một trong số metanol, etanol và isopropanol, và theo một số phương án, metanol. Lượng dung môi hữu cơ có thể là 1-20 L/mol, và theo một số phương án, là 1,5-10 L/mol, đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (318).

Nồng độ của dung dịch nước metylamin có thể là 30%-40% khối lượng, và tỷ lệ mol của metylamin với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (318) có thể là 10:1 đến 500:1, và theo một số phương án, 50:1 đến 200:1.

Tương tự, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (317) có thể được phân lập từ hỗn hợp phản ứng sử dụng phương pháp phân lập thích hợp bất kỳ. Theo một số phương án, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (317) có thể được phân lập bằng cách loại bỏ dung môi qua quá trình bay hơi sau đó bằng kỹ thuật sắc ký, ví dụ, sử dụng hai bộ điều kiện sắc ký sau để phân lập, (1) tinh chế pha thường: 200-300 mesh lớp đệm

silica gel, giải hấp gradien diclometan: metanol: amoniac chứa nước (25% khối lượng) = 1:1:0,05-1:1:0,25; và (2) tinh chế pha đảo: lớp đệm pha đảo C18 và C8, giải hấp gradien của metanol: axetonitril = 0,1:1-1:0,1. Theo một số phương án, dung môi có thể được loại bỏ trực tiếp để thu được sản phẩm thô của hợp chất như được thể hiện bằng công thức (317), có thể được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo.

Hợp chất như được thể hiện bằng công thức (318) có thể được điều chế bằng phương pháp sau đây bao gồm cho hợp chất như được thể hiện bằng công thức (319) tiếp xúc với triphenylclometan (TrCl), diphenyletylphenylclometan, phenyldietylphenylclometan hoặc trietylphenylclometan (theo một số phương án, với triphenylclometan (TrCl)) dưới điều kiện phản ứng thế với sự có mặt của dung môi hữu cơ, và phân lập:



Công thức (319)

trong đó các định nghĩa và tùy chọn của n1, n3, m1, m2, m3, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} lần lượt như được mô tả bên trên.

Điều kiện phản ứng thế có thể có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0-100°C và thời gian phản ứng là 5-72 giờ, và theo một số phương án có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 10-40°C và thời gian phản ứng là 10-30 giờ.

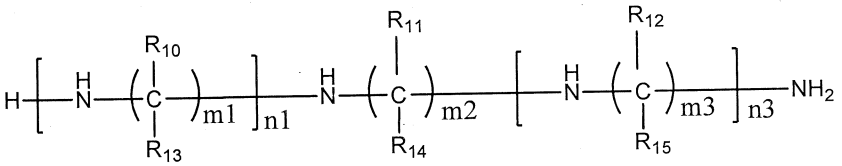
Triphenylclometan (TrCl), diphenyletylphenylclometan, phenyldietyl phenylclometan hoặc trietylphenylclometan có sẵn trên thị trường. Tỷ lệ mol của triphenylclometan (TrCl), diphenyletylphenylclometan, phenyldietylpheny lclometan hoặc trietylphenylclometan với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (319) có thể là 1:1 đến 10:1, và theo một số phương án, 1:1 đến 3:1.

Dung môi hữu cơ có thể là một hoặc nhiều dung môi epoxy, dung môi ete, dung môi haloalkan, dimetyl sulfoxit, N,N-dimetylformamit, và N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, dung môi epoxy là dioxan và/hoặc tetrahydrofuran. Theo một

số phương án, dung môi ete là dietyl ete và/hoặc metyl tertbutyl ete. Theo một số phương án, dung môi haloalkan là một hoặc nhiều diclometan, triclometan và 1,2-dicloetan. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là diclometan. Lượng dung môi hữu cơ có thể là 3-50 L/mol, và theo một số phương án, 5-20 L/mol, đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (319).

Tương tự, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (318) có thể được phân lập từ hỗn hợp phản ứng bằng bất kỳ phương pháp phân lập thích hợp. Theo một số phương án, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (318) có thể được phân lập bằng cách loại bỏ dung môi qua quá trình bay hơi sau đó bằng kỹ thuật sắc ký, ví dụ, sử dụng hai bộ điều kiện sắc ký sau để phân lập, (1) tinh chế pha thường: 200-300 mesh lớp đệm silica gel, giải hấp gradien của metanol: diclometan = 0,01:1-0,5:1 hoặc giải hấp gradien của metanol: diclometan: etyl axetat: ete dầu mỏ = 0,1:1:1:1 - 1:1:1:1; và (2) tinh chế pha đảo: lớp đệm pha đảo C18 và C8, giải hấp gradien của metanol: axetonitril = 0,1:1-1:0,1. Theo một số phương án, dung môi có thể được loại bỏ trực tiếp để thu được sản phẩm thô của hợp chất như được thể hiện bằng công thức (318), có thể được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo.

Theo một số phương án, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (319) có thể được điều chế bằng phương pháp sau đây bao gồm cho hợp chất như được thể hiện bằng công thức (320) tiếp xúc với etyl trifloaxetat trong dung môi hữu cơ dưới điều kiện phản ứng thế, và phân lập:



Công thức (320)

trong đó các định nghĩa và tùy chọn của n1, n3, m1, m2, m3, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} lần lượt như được mô tả bên trên.

Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều axetonitril, dung môi epoxy, dung môi ete, dung môi haloalkan, dimetyl sulfoxit, N,N-dimetylformamit,

và N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, dung môi epoxy là dioxan và/hoặc tetrahydrofuran. Theo một số phương án, dung môi ete là dietyl ete và/hoặc metyl tertbutyl ete. Theo một số phương án, dung môi haloalkan là một hoặc nhiều diclometan, triclometan và 1,2-dicloetan. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là axetonitril. Lượng dung môi hữu cơ là 1-50 L/mol, và theo một số phương án, 1-20 L/mol, đối với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (320).

Điều kiện phản ứng thế có thể có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0-100°C và thời gian phản ứng là 5-72 giờ, và theo một số phương án có nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 10-40°C và thời gian phản ứng là 10-30 giờ.

Hợp chất như được thể hiện bằng công thức (320) có thể có sẵn trên thị trường, hoặc thu được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này qua các phương pháp đã biết. Ví dụ, trong trường hợp m1=m2=m3=3, n1=1, n3=2, và toàn bộ R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} là H, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (320) có sẵn trên thị trường từ Alfa Aesar Inc.

Tỷ lệ mol của etyl trifloaxetat với hợp chất như được thể hiện bằng công thức (320) có thể là 2:1 đến 10:1, và theo một số phương án, 3:1 đến 5:1.

Tương tự, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (319) có thể được phân lập từ hỗn hợp phản ứng sử dụng phương pháp phân lập thích hợp bất kỳ. Theo một số phương án, hợp chất như được thể hiện bằng công thức (319) có thể được phân lập bằng cách loại bỏ dung môi qua quá trình bay hơi sau đó bằng kỹ thuật sắc ký, ví dụ, sử dụng hai bộ điều kiện sắc ký sau để phân lập: (1) tinh chế pha thường: 200-300 mesh lớp đệm silica gel, giải hấp gradien của metanol: diclometan = 0,01:1 - 0,5:1 hoặc giải hấp gradien của metanol: diclometan: etyl axetat: ete dầu mỏ = 0,1:1:1:1 - 1:1:1:1; và (2) tinh chế pha đảo: Lớp đệm pha đảo C18 và C8, giải hấp gradien của metanol: axetonitril = 0,1:1-1:0,1. Theo một số phương án, dung môi có thể được loại bỏ trực tiếp để thu được sản phẩm thô của hợp chất như được thể hiện bằng công thức (319), có thể được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo.

Liên hợp siARN thứ nhất hoặc thứ hai theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với tá dược dược dụng khác, có thể là một hoặc nhiều chế phẩm công thức hoặc hợp chất thông thường khác trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cụ thể là, đề cập đến việc mô tả nêu trên của dược phẩm theo sáng chế.

Sử dụng siARN được biến đổi, dược phẩm, thể liên hợp siARN thứ nhất và thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất việc sử dụng siARN, dược phẩm, thể liên hợp siARN thứ nhất và/hoặc thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế trong việc sản xuất thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh lý gây ra bởi việc nhiễm virut viêm gan B (HBV).

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý gây ra bởi việc nhiễm virut viêm gan B (HBV), bao gồm việc sử dụng lượng hữu hiệu của siARN, dược phẩm, thể liên hợp siARN thứ nhất và/hoặc thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế cho bệnh nhân.

Theo các phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp ức chế sự biểu hiện của gen HBV ở tế bào viêm gan bị nhiễm HBV mạn tính, bao gồm bước cho siARN, dược phẩm, thể liên hợp siARN thứ nhất và/hoặc thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế tiếp xúc với tế bào viêm gan bị nhiễm HBV mạn tính.

Tình trạng bệnh lý hoặc bệnh gây ra bởi việc nhiễm virut viêm gan B (HBV) được chọn từ bệnh gan mạn tính, chứng viêm gan mạn tính, bệnh xơ gan mạn tính, và bệnh tăng sinh.

Có thể đạt được mục đích điều trị bệnh viêm gan B dựa trên cơ chế can thiệp ARN (ARNi) bằng cách sử dụng siARN và/hoặc dược phẩm, thể liên hợp siARN thứ nhất và/hoặc thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế cho bệnh nhân cần điều trị. Do đó, siARN và/hoặc dược phẩm và các thể liên hợp siARN theo sáng chế có thể được sử dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm gan B, hoặc để bào chế thuốc để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh viêm gan B.

Như được sử dụng trong phần mô tả này, thuật ngữ "sử dụng/dùng" để chỉ việc phân phối siARN được biến đổi, dược phẩm, thể liên hợp siARN thứ nhất và/hoặc thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế vào trong cơ thể đối tượng bằng phương pháp hoặc đường dùng mà ít nhất đặt một phần siARN được biến đổi, dược phẩm, thể liên hợp siARN thứ nhất và/hoặc thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế tại vị trí mong muốn để tạo ra tác dụng mong muốn. Đường sử dụng thích hợp cho các phương pháp theo sáng chế bao gồm sử dụng tại chỗ và sử dụng toàn thân. Nhìn chung, sử dụng tại chỗ tạo ra sự phân phối siARN biến đổi, dược phẩm, thể liên hợp siARN thứ nhất và/hoặc thể liên hợp siARN thứ hai nhiều hơn đến vị trí cụ thể so với toàn thân của đối tượng; trong khi sử dụng toàn thân tạo ra sự phân phối siARN được biến đổi, dược phẩm, thể liên hợp siARN thứ nhất và/hoặc thể liên hợp siARN thứ hai gần như đến toàn thân của đối tượng. Xem xét rằng sáng chế nhằm mục đích tạo ra phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị chứng rối loạn mỡ máu, theo một số phương án, chế độ sử dụng có khả năng phân phối thuốc đến gan được sử dụng.

Việc sử dụng cho đối tượng có thể đạt được bằng các con đường thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm nhưng không giới hạn ở, đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa, như sử dụng trong tĩnh mạch, sử dụng trong cơ, sử dụng dưới da, sử dụng qua da, sử dụng trong khí quản (sol khí), sử dụng qua phổi, sử dụng qua mũi, sử dụng qua trực tràng và sử dụng tại chỗ (bao gồm sử dụng trong má và sử dụng dưới lưỡi). Tần suất sử dụng có thể là 1 lần hoặc nhiều lần mỗi ngày, mỗi tuần, cách tuần, ba tuần, mỗi tháng, hoặc mỗi năm.

Liều của siARN, dược phẩm, thể liên hợp siARN thứ nhất và/hoặc thể liên hợp siARN thứ hai theo sáng chế có thể là liều thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật, mà có thể được xác định theo các thông số khác nhau, đặc biệt là tuổi, cân nặng và giới tính của đối tượng. Độc tính và hiệu quả có thể được đo ở các dịch nuôi cấy tế bào hoặc động vật thí nghiệm bằng các quy trình dược lý chuẩn, ví dụ, bằng cách xác định LD50 (liều gây chết mà gây chết 50% quần thể) và ED50 (liều mà có thể gây ra 50% cường độ đáp ứng tối đa ở đáp ứng định lượng, và gây cho 50% số đối tượng thí nghiệm có đáp ứng

tích cực trong đáp ứng định tính). Khoảng liều cho người có thể thu được dựa trên số liệu thu được từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu trên động vật.

Khi sử dụng dược phẩm hoặc thể liên hợp siARN theo sáng chế, ví dụ, cho chuột C57BL/6J hoặc C3H/HeNCrIVr đực hoặc cái 6-12 tuần tuổi và 18-25 g khối lượng cơ thể, và tính toán dựa trên lượng siARN trong dược phẩm hoặc thể liên hợp siARN: (i) đối với thể liên hợp siARN thứ nhất và/hoặc thể liên hợp siARN thứ hai, liều dùng siARN của nó có thể là 0,001-100 mg/kg khối lượng cơ thể, và theo các phương án khác là 0,01-50 mg/kg khối lượng cơ thể, và theo các phương án khác nữa là 0,05-20 mg/kg khối lượng cơ thể, và còn theo các phương án khác nữa là 0,1-10 mg/kg khối lượng cơ thể; (ii) đối với dược phẩm được tạo thành bằng siARN và chất mang dược dụng, liều dùng siARN của nó có thể là 0,001-50 mg/kg khối lượng cơ thể, và theo các phương án khác là 0,01-10 mg/kg khối lượng cơ thể, và theo các phương án khác nữa là 0,05-5 mg/kg khối lượng cơ thể, và còn theo phương án khác nữa là 0,1-3 mg/kg khối lượng cơ thể.

Hơn nữa, bằng cách đưa siARN và/hoặc dược phẩm và/hoặc thể liên hợp siARN theo sáng chế vào trong tế bào viêm gan bị nhiễm HBV mạn tính, mục đích ức chế sự biểu hiện của gen HBV trong tế bào viêm gan bị nhiễm HBV mạn tính cũng có thể đạt được bằng cơ chế can thiệp ARN. Theo một số phương án được ưu tiên, các tế bào này là các tế bào HepG2.2.15.

Trong trường hợp mà sự biểu hiện của gen HBV ở các tế bào bị ức chế bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả bởi sáng chế, lượng siARN trong siARN, dược phẩm, thể liên hợp siARN thứ nhất và/hoặc thể liên hợp siARN thứ hai được cung cấp thường là lượng đủ để làm giảm sự biểu hiện của gen đích và dẫn đến nồng độ ngoại bào là 1 pM đến 1 μM, hoặc từ 0,01 nM đến 100 nM, hoặc từ 0,05 nM đến 50 nM hoặc từ 0,05 nM đến khoảng 5 nM trên bề mặt của các tế bào đích. Lượng cần thiết để đạt được nồng độ tại chỗ này sẽ thay đổi tùy theo các yếu tố khác nhau, bao gồm phương pháp phân phối, vị trí phân phối, số lượng các lớp tế bào giữa vị trí phân phối và các tế bào hoặc mô đích, con đường phân phối (tại chỗ hoặc toàn thân), v.v.. Nồng độ tại vị trí phân phối có thể cao hơn đáng kể so với nồng độ trên bề mặt của tế bào hoặc mô đích.

Bộ kit

Sáng chế đề xuất bộ kit bao gồm lượng có hiệu quả của ít nhất một trong số siARN được biến đổi, dược phẩm, thể liên hợp siARN thứ nhất và/hoặc thể liên hợp siARN thứ hai.

Theo một số phương án, các bộ kit được bộc lộ ở đây cung cấp siARN biến đổi trong một vật chứa. Theo một số phương án, bộ kit theo sáng chế bao gồm vật chứa chứa tá dược dược dụng. Theo một số phương án, bộ kit theo sáng chế cũng bao gồm các thành phần bổ sung, như chất ổn định hoặc chất bảo quản. Theo một số phương án, kit này bao gồm ít nhất một chất trị liệu bổ sung trong vật chứa khác với vật chứa mà chứa siARN được biến đổi theo sáng chế. Theo một số phương án, kit này bao gồm hướng dẫn trộn siARN được biến đổi với các chất mang và/hoặc các chất phụ trợ dược dụng hoặc các thành phần khác (nếu có).

Trong bộ kit theo sáng chế, siARN được biến đổi và các chất mang và/hoặc các chất phụ trợ dược dụng cũng như siARN được biến đổi, dược phẩm, thể liên hợp siARN thứ nhất và/hoặc thể liên hợp siARN thứ hai và/hoặc thể liên hợp, và/hoặc các chất phụ trợ dược dụng có thể được cung cấp ở dạng bất kỳ, ví dụ, ở dạng lỏng, dạng khô, hoặc dạng đông khô. Theo một số phương án, siARN được biến đổi và các chất mang và/hoặc các chất phụ trợ dược dụng cũng như dược phẩm và/hoặc thể liên hợp và các chất phụ trợ dược dụng tùy chọn gần như là tinh khiết và/hoặc vô trùng. Theo một số phương án, nước vô trùng có thể được cung cấp trong bộ kit theo sáng chế.

Hiệu quả có lợi

Theo một số phương án, siARN, chế phẩm siARN hoặc thể liên hợp siARN được đề xuất ở đây có thể có độ ổn định cao hơn, độc tính thấp hơn, và/hoặc hoạt tính *in vivo* cao hơn. Theo một số phương án, siARN, chế phẩm siARN hoặc thể liên hợp siARN theo sáng chế thể hiện phần trăm ức chế sự biểu hiện gen HBV bằng ít nhất 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95% *in vivo*. Theo một số phương án, siARN, chế phẩm siARN hoặc thể liên hợp siARN theo sáng chế thể hiện phần trăm ức chế sự biểu hiện gen HBV ở gan bằng ít nhất 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%,

hoặc 95% *in vivo*. Theo một số phương án, siARN, chế phẩm siARN hoặc thể liên hợp siARN theo sáng chế thể hiện phần trăm ức chế sự biểu hiện gen HBV ở gan trong các mô hình động vật bằng ít nhất 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95% *in vivo*. Theo một số phương án, siARN, chế phẩm siARN hoặc liên hợp siARN theo sáng chế thể hiện phần trăm ức chế sự biểu hiện kháng nguyên bề mặt HBV bằng ít nhất 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95% *in vivo*. Theo một số phương án, oligonucleotit sợi kép, chế phẩm hoặc thể liên hợp oligonucleotit theo sáng chế thể hiện tác dụng xa đích không đáng kể. Tác dụng xa đích có thể là, ví dụ ức chế sự biểu hiện bình thường của gen mà không phải là gen đích. Được coi là nếu liên kết/ức chế sự biểu hiện của gen ngoài đích là thấp hơn 50%, 40%, 30%, 20%, hoặc 10% so với liên kết/ức chế của hoạt tính đích, thì tác dụng xa đích là không đáng kể.

Theo một số phương án, thể liên hợp siARN được đề xuất ở đây có độc tính thấp hơn ở cấp độ động vật.

Theo một số phương án, thể liên hợp siARN được đề xuất ở đây có thể vẫn chưa phân giải trong huyết tương người trong tối đa 72 giờ, cho thấy độ ổn định vượt trội trong huyết tương người.

Theo một số phương án, thể liên hợp siARN được đề xuất ở đây có thể vẫn chưa phân giải trong huyết tương khỉ cynomolgus trong tối đa 72 giờ, cho thấy độ ổn định vượt trội trong huyết tương khỉ.

Theo một số phương án, thể liên hợp siARN được đề xuất ở đây có thể vẫn chưa phân giải trong lysosom lysat có nguồn gốc từ người hoặc chuột cống trong ít nhất 24 giờ, cho thấy độ ổn định thỏa đáng.

Theo một số phương án, thể liên hợp siARN được đề xuất ở đây có thể được làm giàu một cách đặc hiệu và đáng kể trong gan và giữ độ ổn định, thể hiện mức độ gắn đích cao.

Theo một số phương án, trong một số thí nghiệm với các thời điểm thử nghiệm khác nhau, thể liên hợp siARN được đề xuất ở đây thể hiện hoạt tính ức chế cao chống lại sự biểu hiện của mARN của HBV ở chuột nhất *in vivo*.

Theo một số phương án, thể liên hợp siARN được đề xuất ở đây thể hiện tác dụng ức chế kéo dài và có hiệu quả trên HBsAg huyết thanh ở các mô hình động vật khác nhau, thể hiện độ phụ thuộc liều đều đặn.

Theo một số phương án, thể liên hợp siARN được đề xuất ở đây không chỉ có hoạt tính *in intro* cao hơn, mà còn thể hiện tác dụng xa đích thấp.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả thêm bằng các ví dụ điều chế và ví dụ thử nghiệm, nhưng không bị giới hạn ở đó theo khía cạnh bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn cùng với các ví dụ. Trừ khi được quy định khác, các chất và các môi trường nuôi cấy được sử dụng trong các ví dụ sau đây tất cả đều có bán sẵn, và các quy trình được sử dụng như điện di axit nucleic và PCR thời gian thực đều được thực hiện theo các phương pháp được mô tả trong tài liệu Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)).

Trừ khi được quy định khác, tỉ lệ các chất phản ứng được cung cấp dưới đây đều được tính toán theo tỷ lệ thể tích (thể tích/thể tích).

Chuột nhắt chuyển gen HBV C57BL/6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri/J: được mua từ Department of Laboratory Animal Science, Peking University Health Science Center. Chuột nhắt có S/COV>10 được chọn trước khi thí nghiệm; sau đây đôi khi còn được gọi là chuột nhắt mô hình 44Bri;

Chuột nhắt chuyển gen HBV: được đặt tên là M-Tg HBV, được mua từ Department of Animal, Shanghai Public Health Center. Các phương pháp tạo ra chuột nhắt chuyển gen được mô tả bởi Ren J. et al., trong J. Medical Virology. 2006, 78:551-560; sau đây đôi khi còn được gọi là mô hình M-Tg;

Chuột nhắt chuyển gen AAV-HBV: được tạo ra theo phương pháp đã biết trong tài liệu (Xiaoyan Dong et al., Chin J Biotech 2010, May 25; 26(5): 679−686) bằng cách sử dụng virut typ D (ayw), rAAV8-1.3HBV (được mua từ Beijing FivePlus Molecular Medicine Institute Co. Ltd., 1×10^{12} bộ gen virut (v.g.)/mL, số lô 2016123011). rAAV8-

1.3HBV được pha loãng đến 5×10^{11} v.g./mL bằng PBS vô trùng. 200 µL rAAV8-1.3HBV được pha loãng được tiêm vào trong mỗi con chuột, nghĩa là, 1×10^{11} v.g. trên mỗi con chuột. Máu ổ mắt (khoảng 100 µL) được thu từ tất cả các con chuột vào ngày 28 sau khi tiêm virut để thu gom huyết thanh để phát hiện HBsAg và ADN của HBV; sau đây còn được gọi là chuột nhắt mô hình AAV-HBV;

Chuột nhắt chuyển gen AAV-HBV nồng độ thấp: sử dụng gần như cùng phương pháp tạo mô hình như được mô tả ở trên, khác biệt ở chỗ virut được pha loãng đến 1×10^{11} v.g./mL bằng PBS vô trùng trước thí nghiệm. 100 µL virut được tiêm vào mỗi con chuột, nghĩa là, 1×10^{10} v.g. trên mỗi con chuột; sau đây đôi khi còn được gọi là chuột mô hình AAV-HBV nồng độ thấp;

Chuột chuyển gen HBV: C57BL/6-HBV, Tên chủng: B6-Tg HBV/Vst (1,28 bản sao, kiểu gen A), được mua từ Beijing Vitalstar Biotechnology Co., Ltd. Chuột nhắt có COI>10^4 được chọn trước các thí nghiệm; sau đây đôi khi còn được gọi là mô hình 1,28 bản sao.

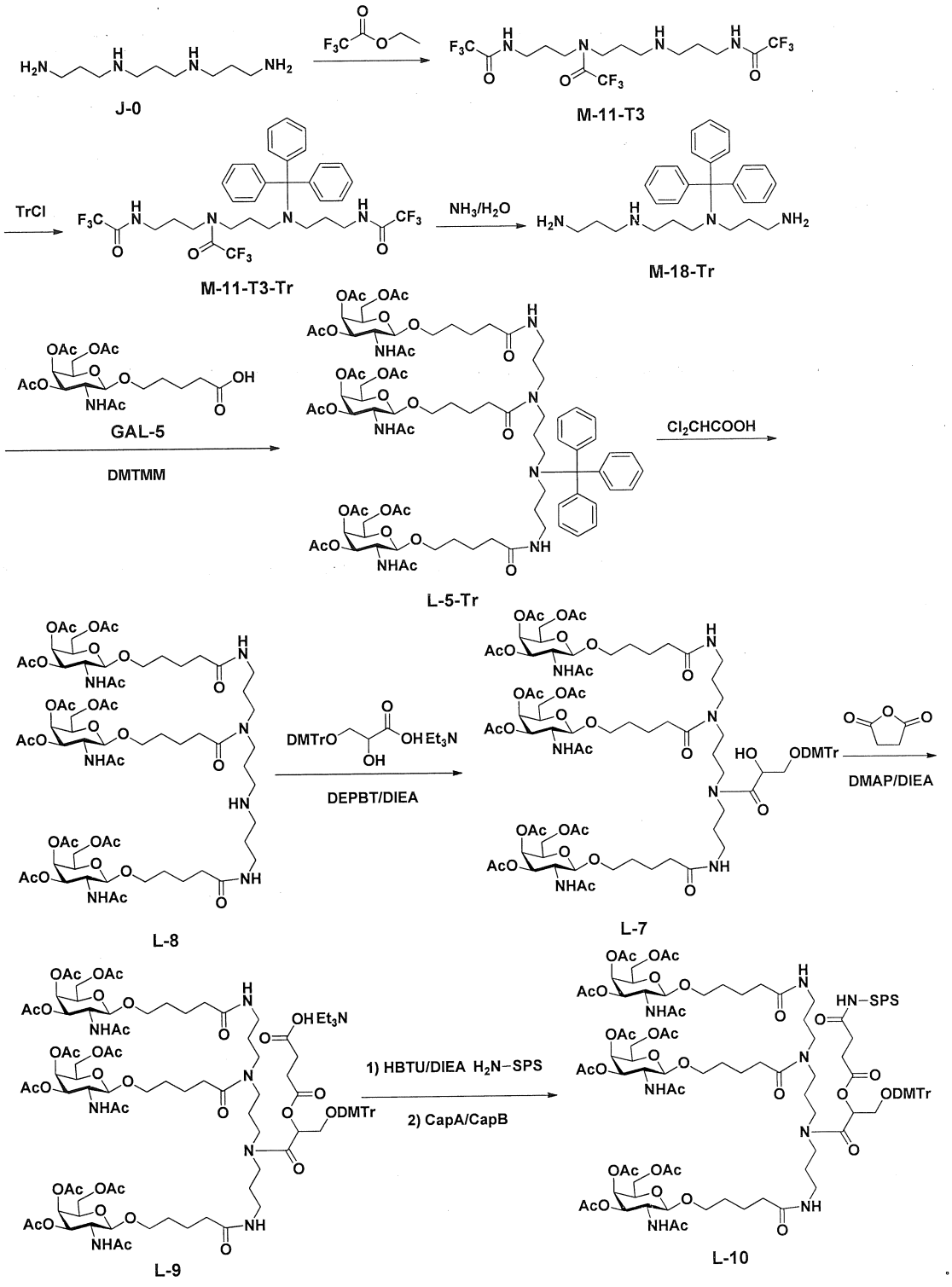
Ví dụ điều chế 1: Điều chế các thể liên hợp 1-11

Trong ví dụ điều chế này, thể liên hợp 1 (sau đây còn được gọi là thể liên hợp L10-siHBa1M1SVP), thể liên hợp 2 (sau đây còn được gọi là thể liên hợp L10-siHBa1M1SP), thể liên hợp 3 (sau đây còn được gọi là thể liên hợp L10-siHBa1M1SPsT), thể liên hợp 4 (sau đây còn được gọi là thể liên hợp L10-siHBa1M1SPs), thể liên hợp 5 (sau đây còn được gọi là L10-siHBa1M2S), thể liên hợp 6 (sau đây còn được gọi là L10-siHBa1M2S), thể liên hợp 7 (sau đây còn được gọi là L10-siHBa2M1S), thể liên hợp 8 (sau đây còn được gọi là L10-siHBa1M1S), thể liên hợp 9 (sau đây còn được gọi là L10-siHBa1M2S), thể liên hợp 10 (sau đây còn được gọi là L10-siHBa2M2S), và thể liên hợp 11 (sau đây còn được gọi là L10-siHBa2M1S) được tổng hợp. Các thể liên hợp mà là các thể liên hợp được tạo thành bằng cách liên hợp phân tử liên hợp L-9 tương ứng với siARN được đánh số là L10-siHBa1M1SVP, L10-siHBa1M1SP, L10-siHBa1M1SPsT, L10-siHBa1M1SPs, L10-siHBa1M2S, L10-siHBa1M2S, L10-siHBa2M1S, L10-siHBa1M1S, L10-siHBa1M2S), L10-siHBa2M2S,

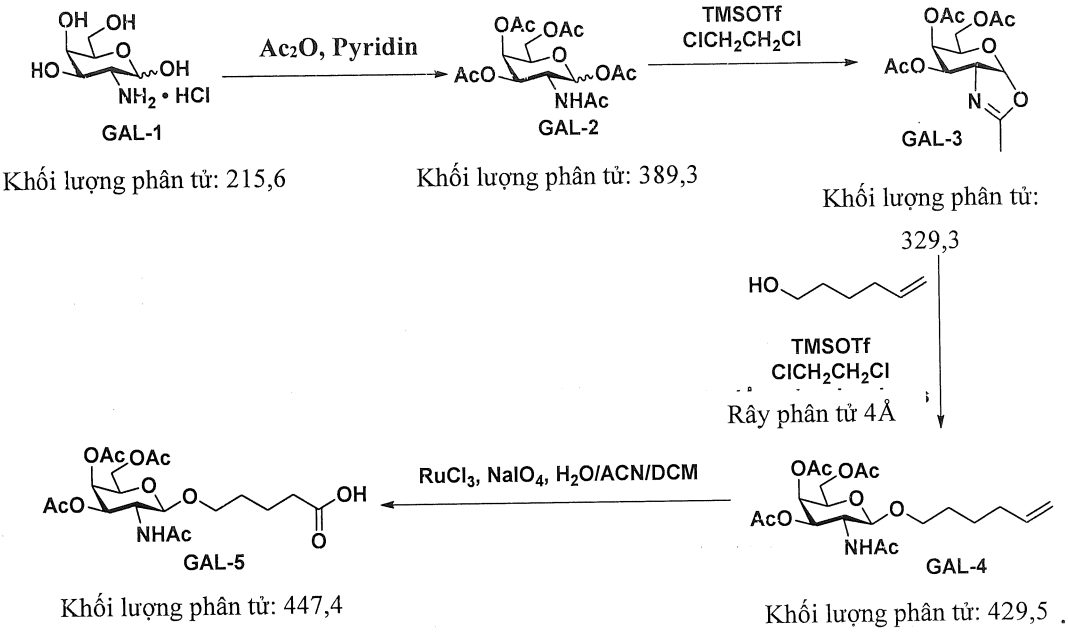
hoặc L10-siHBa2M1S. Trình tự siARN liên hợp trong các thể liên hợp được trình bày trong bảng 3.

(1-1) Tổng hợp hợp chất L-10:

Hợp chất L-10 được tổng hợp theo phương pháp sau:



(1-1-1) Tổng hợp GAL-5 (mảnh đầu tận của phân tử liên hợp)



(1-1-1a) Tổng hợp GAL-2

100,0 g **GAL-1** (N-axetyl-D-galactosamin hydroclorua, CAS số: 1772-03-8, được mua từ Ningbo Hongxiang Bio-Chem Co., Ltd., 463,8 mmol) được hòa tan trong 1000 ml pyridin khan, bổ sung 540 ml axetic anhydrit (được mua từ Enox Inc., 5565,6 mmol) vào trong bể nước đá để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1,5 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được rót vào 10L nước đá và đưa vào lọc hút dưới áp suất giảm. Phần cặn được rửa bằng 2L nước đá, và sau đó bổ sung bằng dung môi đã trộn chứa axetonitril/toluen (tỷ lệ thể tích/thể tích = 1:1) cho đến khi hòa tan hoàn toàn. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi để thu được 130,0 g sản phẩm **GAL-2** dưới dạng chất rắn màu trắng.

(1-1-1b) Tổng hợp GAL-3

GAL-2 (35,1 g, 90,0 mmol) thu được trong bước (1-1-1a) được hòa tan trong 213 ml 1,2-dicloetan khan, bổ sung 24,0 g TMSOTf (CAS số: 27607-77-8, được mua từ Macklin Inc., 108,0 mmol) vào trong bể nước đá và khí nitơ để phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm.

400 ml diclometan được bổ sung vào dung dịch phản ứng để pha loãng, lọc bằng diatomit, và sau đó bổ sung bằng 1L dung dịch natri bicacbonat nước bão hòa và khuấy đều. Pha hữu cơ được tách. Pha nước còn lại được chiết hai lần, mỗi lần bằng 300 ml

dicloetan, và toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp và được rửa bằng 300 ml dung dịch natri bicacbonat nước bão hòa và 300 ml nước muối bão hòa, tương ứng. Pha hữu cơ thu được từ việc rửa được tách và được làm khô bằng natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 26,9 g sản phẩm **GAL-3** dưới dạng xirô nhớt màu vàng nhạt.

(1-1-1c) Tổng hợp GAL-4

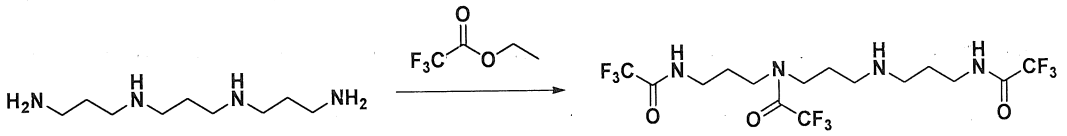
GAL-3 (26,9 g, 81,7 mmol) thu được trong bước (1-1-1b) được hòa tan trong 136 ml 1,2-dicloetan khan, bổ sung bằng 30 g bột rây phân tử 4Å khô sau đó bằng 9,0 g 5-hexen-1-ol (CAS số: 821-41-0, được mua từ Adamas-beta Inc., 89,9 mmol), và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. 9,08 ml TMSOTf (40,9 mmol) được bổ sung trong bể đá và khí nitơ để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Bột rây phân tử 4Å được loại bỏ bằng cách lọc. Phần lọc được bổ sung bằng 300 ml dicloetan để pha loãng, được lọc bằng diatomit, và sau đó bổ sung bằng 500 ml dung dịch natri bicacbonat nước bão hòa và khuấy bằng 10 phút để rửa. Pha hữu cơ được tách. Pha nước được chiết một lần bằng 300 ml dicloetan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp và được rửa bằng 300 ml dung dịch natri bicacbonat nước bão hòa và 300 ml nước muối bão hòa tương ứng. Pha hữu cơ thu được từ việc rửa được tách và được làm khô bằng natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 41,3 g sản phẩm **GAL-4** dưới dạng xirô màu vàng, được sử dụng trực tiếp trong phản ứng oxy hóa tiếp theo không cần tinh chế.

(1-1-1d) Tổng hợp GAL-5

GAL-4 (14,9 g, 34,7 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả trong bước (1-1-1c) được hòa tan trong dung môi đã trộn chứa 77 ml diclometan và 77 ml axetonitril, bổ sung bằng 103 ml nước khử ion hóa và 29,7 g natri periodat (CAS số: 7790-28-5, được mua từ Aladdin Inc., 138,8 mmol) tương ứng, và được khuấy trong bể đá trong 10 phút. Ruteni triclorua (CAS số: 14898-67-0, có sẵn từ Energy Chemical, 238 mg, 1,145 mmol) được bổ sung vào phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Dung dịch phản ứng thu được được pha loãng bằng cách bổ sung 300 ml nước trong khi khuấy, và điều chỉnh

đến độ pH bằng khoảng 7,5 bằng cách bổ sung natri bicacbonat bão hòa. Pha hữu cơ được tách và được loại bỏ. Pha nước được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 200 ml diclometan, và pha hữu cơ thu được từ việc chiết được loại bỏ. Pha nước thu được từ việc chiết được điều chỉnh đến độ pH bằng khoảng 3 bằng phần rắn axit xitric và được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 200 ml diclometan, và pha hữu cơ thu được được kết hợp và được làm khô bằng natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 6,5 g sản phẩm **GAL-5** dưới dạng chất rắn bọt trắng. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12,01 (br, 1H), 7,83 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 5,21 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 4,96 (dd, J = 11,2, 3,2 Hz, 1H), 4,49 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,07–3,95 (m, 3H), 3,92–3,85 (m, 1H), 3,74–3,67 (m, 1H), 3,48–3,39 (m, 1H), 2,20 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 2,11 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,90 (s, 3H), 1,77 (s, 3H), 1,55–1,45 (m, 4H).

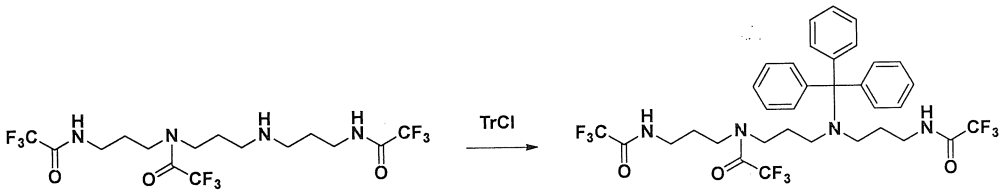
(1-1-2) Tổng hợp M-11-T3:



J-0 **M-11-T3**

J-0 (1,883 g, 10 mmol, được mua từ Alfa Aesar) được hòa tan trong 25 ml axetonitril, bổ sung bằng trietylamin (4,048 g, 40 mmol), và làm lạnh xuống 0°C trong bể nước đá. Etyl trifloaxetat (5,683 g, 40 mmol) được bổ sung vào phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 22 giờ. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không trong 18 giờ để thu được 5,342 g sản phẩm rắn thô M-11-T3, được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo không cần tinh chế thêm. MS m/z: C15H22F9N4O3, [M+H]+, tính toán: 477,35, đo: 477,65.

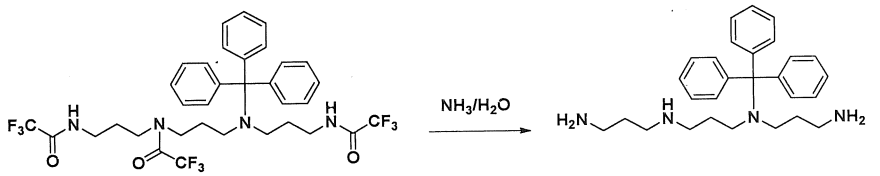
(1-1-3) Tổng hợp M-11-T3-Tr:



M-11-T3 **M-11-T3-Tr**

Sản phẩm thô M-11-T3 (5,342 g, 10 mmol) được hòa tan trong 50 ml diclometan. Dung dịch phản ứng thu được được bổ sung bằng TrCl (3,345 g, 12 mmol) và trietylamin (1,518 g, 15 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ. Dung dịch phản ứng được rửa hai lần, mỗi lần bằng 20 ml natri bicacbonat bão hòa và một lần bằng 20 ml nước muối bão hòa. Pha hữu cơ thu được được làm khô bằng natri sulfat khan và được lọc. Dung môi hữu cơ được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không qua đêm để thu được 7,763 g sản phẩm rắn thô M-11-T3-Tr. MS m/z: C34H36F9N4O3, [M+Na]+, tính toán: 741,25, đo: 741,53. Sản phẩm rắn thô M-11-T3-Tr sau đó được sử dụng trong bước tiếp theo để tổng hợp M-18-Tr không cần tinh chế.

(1-1-4) Tổng hợp M-18-Tr:

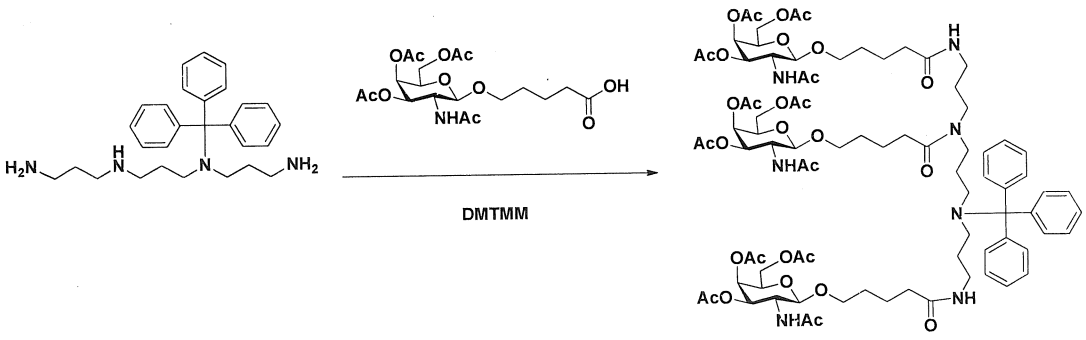


M-11-T3-Tr M-18-Tr

Sản phẩm thô M-11-T3-Tr (7,763 g, 10 mmol) thu được trong bước (1-1-3) được hòa tan trong 100 ml metanol, và bổ sung bằng 100 ml dung dịch metylamin nước (40% khối lượng) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 23 giờ. Các hạt không hòa tan được được loại bỏ bằng cách lọc. Dung môi được làm bay hơi dưới áp suất giảm, và bổ sung 200 ml dung dịch đã trộn chứa DCM: metanol trong tỷ lệ thể tích 1:1 vào phần cặn, được rửa bằng 50 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha nước được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 50 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan và được lọc. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không qua đêm, và được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh). Cột được nạp bằng ete dầu mỏ và bổ sung bằng 1% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel, và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan: metanol: amoniac nước (25% khối lượng) =1:1:0,05-1:1:0,25. Dịch rửa giải được kết hợp, dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong

bơm dầu chân không để thu được 2,887g sản phẩm tinh khiết M-18-Tr. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ7,47–7,39 (m, 6H), 7,32–7,24 (m, 6H), 7,19–7,12 (m, 3H), 2,60–2,47 (m, 4H), 2,46–2,19 (m, 13H), 1,70–1,55 (m, 4H), 1,40 (p, J=6,8 Hz, 2H). MS m/z: C28H39N4, [M+H]+, tính toán: 431,65, đo: 432,61.

(1-1-5) Tổng hợp L-5-Tr:

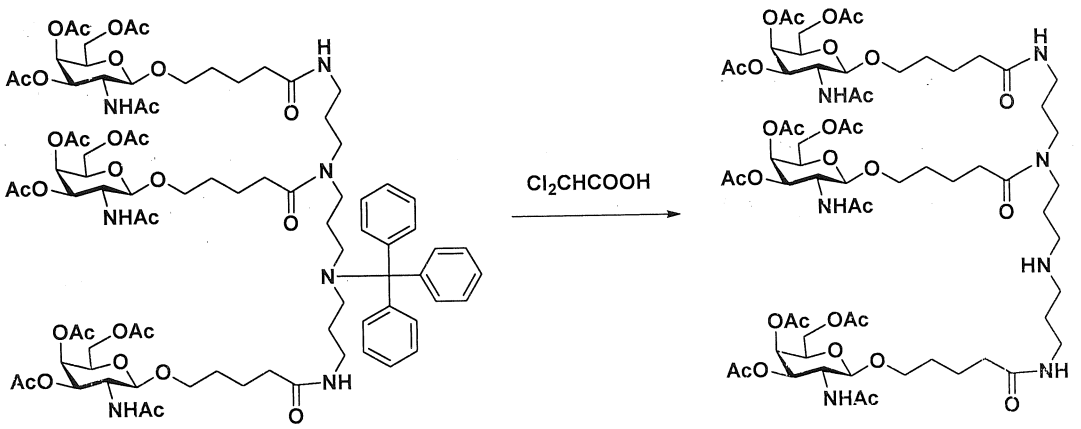


M-18-Tr L-5-Tr

M-18-Tr (2,02 g, 4,69 mmol) thu được trong bước (1-1-4) và GAL-5 (6,93 g, 15,48 mmol) thu được trong bước (1-1-1) được trộn và được hòa tan trong 47 ml axetonitril, và bổ sung bằng N-metylmorpholin (3,13 g, 30,96 mmol) và 4-(4,6-dimetoxytriazin-2-yl)-4-metylmorpholin hydroclorua (DMTMM, 4,28 g, 15,48 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được pha loãng bằng 200 ml diclometan. Pha hữu cơ được rửa bằng 100 ml dung dịch natri bicacbonat bão hòa và 100 ml nước muối bão hòa, được làm khô bằng natri sulfat khan, và được lọc. Sau đó dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh). Cột được nạp bằng ete dầu mỏ, bổ sung bằng 1% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel, và được rửa giải bằng giải hấp gradien của diclometan: metanol=100:5-100:7. Dịch rửa giải được kết hợp, và được làm bay hơi đến khô dưới áp suất giảm để thu được 7,49 g sản phẩm tinh khiết L-5-Tr. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ7,83–7,10 (m, 4H), 7,67–7,60 (m, 1H), 7,44–7,34 (m, 6H), 7,33–7,24 (m, 6H), 7,20–7,15 (m, 3H), 5,22 (s, 3H), 4,97 (d, J = 11,3 Hz, 3H), 4,49 (d, J = 8,4 Hz, 3H), 4,06–3,07 (m, 9H),3,95–3,83 (m, 3H), 3,77–3,64 (m, 3H), 3,45–3,35 (m, 3H), 3,12–2,87 (m, 8H), 2,30–2,15 (m, 3H), 2,11–1,98 (m, 22H), 1,95–1,84 (m,

11H), 1,81–1,61 (m, 14H), 1,54–1,36 (m, 14H).MS m/z: C85H119N7O30, [M+H]+, tính toán: 1718,81, đo: 1718,03.

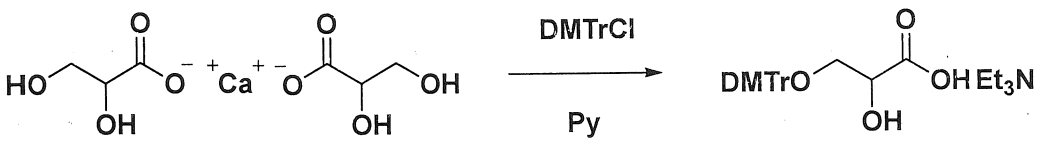
(1-1-6) Tổng hợp L-8:



L-5-Tr L-8

L-5-Tr (5,94 g, 3,456 mmol) thu được trong bước (1-1-5) được hòa tan trong 69 ml diclometan, và bổ sung bằng axit dicloaxetic (13,367 g, 103,67 mmol) để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được pha loãng bằng cách bổ sung 100 ml diclometan, được rửa và điều chỉnh đến pH 7-8 bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã tách được chiết 6 lần, mỗi lần bằng 30 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan, và được lọc. Sau đó dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh). Cột được bổ sung bằng 10% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel và được cân bằng bằng 1‰ khối lượng trietylamin, và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan: metanol = 100:30-100:40. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 4,26 g sản phẩm tinh khiết L-8. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7,84 (d, J = 9,0 Hz, 3H), 7,27–7,23 (m, 1H), 7,13–7,18 (m, 1H), 5,22 (d, J = 3,1 Hz, 3H), 4,97 (dd, J = 11,3, 3,1 Hz, 3H), 4,48 (d, J = 8,4 Hz, 3H), 4,09–3,98 (m, 9H), 3,88 (dd, J = 19,3, 9,3 Hz, 3H), 3,75–3,66 (m, 3H), 3,44–3,38 (m, 3H), 3,17–3,30 (m, 4H), 3,10–2,97 (m, 4H), 2,35–2,20 (m, 6H), 2,15–2,08 (m, 9H), 2,07–1,98 (m, 13H), 1,94–1,87 (m, 9H), 1,81–1,74 (m, 9H), 1,65–1,42 (m, 18H).MS m/z: C85H119N7O30, [M+H]+, tính toán: 1477,59, đo: 1477,23.

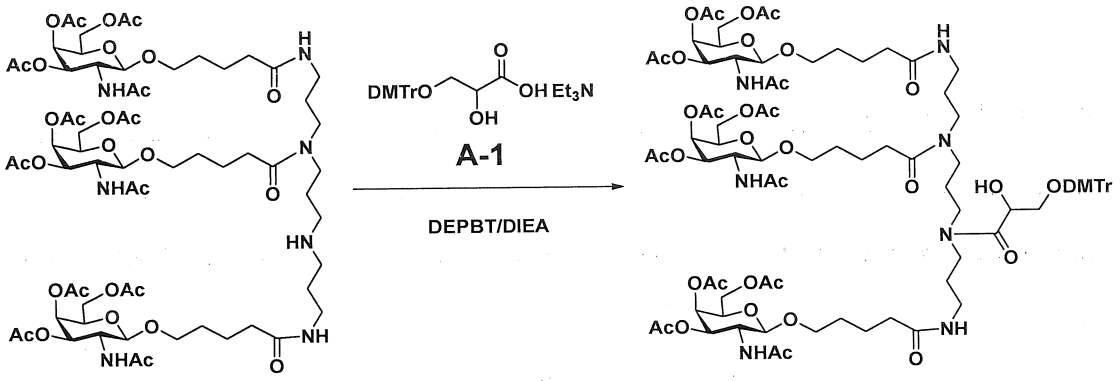
(1-1-7a) Tổng hợp A-1



A-1

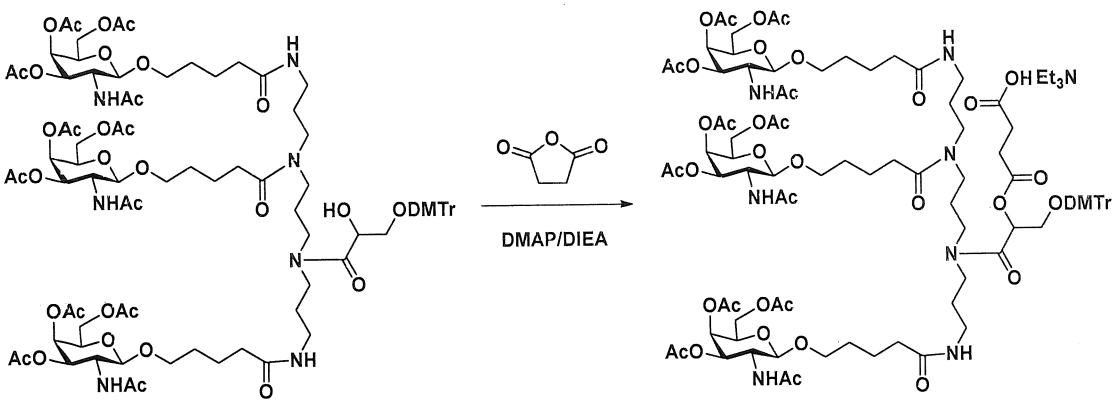
DMTrCl (4,4'-dimetoxytrityl clorua, 38,12 g, 112,5 mmol) được hòa tan trong 450 ml pyridin khan, và bổ sung bằng canxi DL-glyxerat hydrat (12,88 g, 45,0 mmol) để phản ứng ở nhiệt độ 45°C trong 22 giờ. Dung dịch phản ứng được lọc. Phần cặn được rửa bằng 200 ml DCM, và phần lọc được cô đặc đến khô dưới áp suất giảm. Phần cặn được tái hòa tan trong 500 ml diclometan và được rửa 2 lần, mỗi lần bằng 200 ml trietylamin phosphat 0,5 M (pH = 7-8). Pha nước đã tách được chiết hai lần, mỗi lần bằng 200 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan, và được lọc. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh) được rửa giải bằng giải hấp gradien của ete dầu mỏ: etyl axetat: diclometan: metanol =1:1:1:0,35 - 1:1:1:0,55. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn được tái hòa tan trong 500 ml diclometan, và được rửa 1 lần bằng 200 ml trietylamin phosphat 0,5 M. Pha nước đã tách được chiết hai lần, mỗi lần bằng 200 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan, và được lọc. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm (áp suất giảm trong bơm dầu chân không) đến khô qua đêm để thu được 20,7 g sản phẩm A-1 dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,46 (ddd, J = 6,5, 2,3, 1,1 Hz, 1H), 7,40–7,28 (m, 7H), 6,89–6,81 (m, 4H), 4,84 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 4,36–4,24 (m, 1H), 4,29 (s, 6H), 3,92 (dd, J=12,4, 7,0 Hz, 1H), 3,67 (dd, J=12,3, 7,0 Hz, 1H), 2,52 (q, J=6,3 Hz, 6H), 1,03 (t, J=6,3 Hz, 9H). MS m/z: C24H23O6, [M-H]-, tính toán: 407,15, đo: 406,92.

(1-1-7b) Tổng hợp L-7:



L-8 (2,262 g, 1,532 mmol) thu được trong bước (1-1-6) và A-1 (2,342 g, 4,596 mmol) thu được trong bước (1-1-7a) được trộn và được hòa tan trong 16 ml diclometan, bổ sung bằng 3-(dietoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT, 1,375 g, 4,596 mmol), và cũng bổ sung bằng diisopropyletylamin (1,188 g, 9,191 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ 25°C trong 2 giờ. Pha hữu cơ được rửa bằng 10 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã tách được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp và được rửa bằng 10 ml nước muối bão hòa, và pha nước đã tách được chiết hai lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan, và pha hữu cơ thu được được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan và được lọc. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không qua đêm để thu được 4,900 g sản phẩm thô. Sản phẩm thô được đưa vào quá trình tinh chế cột. Cột được nạp đầy 120 g silica gel pha thường (200-300 mesh), bổ sung bằng 20 ml trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel, được cân bằng bằng ete dầu mỏ chứa 1% khối lượng trietylamin, và được rửa giải bằng giải hấp gradien của ete dầu mỏ: etyl axetat: diclometan: N,N-dimetylformamit=1:1:1:0,5 - 1:1:1:0,6. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 2,336 g sản phẩm tinh khiết L-7. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ7,90–7,78 (m, 4H), 7,75–7,64 (m, 1H), 7,38–7,18 (m, 9H), 6,91 – 6,83 (m, 4H), 5,25–5,10 (m, 4H), 4,97 (dd, J=11,2, 3,2 Hz, 3H), 4,48–4,30 (m, 4H), 4,02 (s, 9H), 3,93–3,84 (m, 3H), 3,76–3,66 (m, 9H), 3,45–3,35 (m, 3H), 3,24–2,98 (m, 10H), 2,30–2,20 (m, 2H), 2,11–1,88 (m, 31H), 1,80–1,40 (m, 28H).MS m/z: C90H128N7O35, [M-DMTr]+, tính toán: 1564,65, đo: 1564,88.

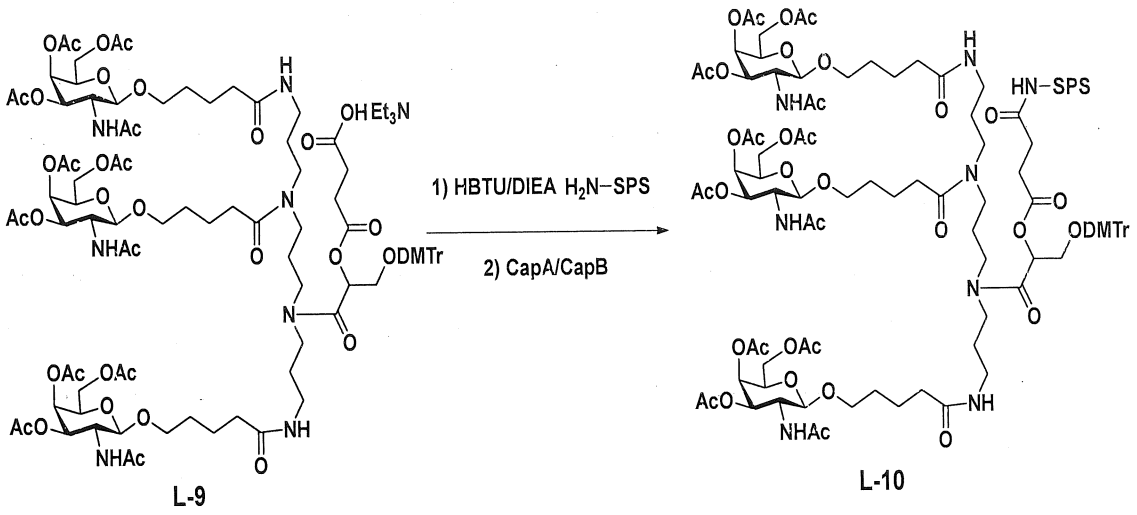
(1-1-8) Tổng hợp phân tử liên hợp L-9:



L-7 L-9

L-7 (2,300 g, 1,26 mmol) thu được trong bước (1-1-7b), suxinic anhydrit (0,378 g, 3,78 mmol) và 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 0,462 g, 3,78 mmol) được trộn và được hòa tan trong 13 ml diclometan, cũng bổ sung bằng DIPEA (0,814 g, 6,30 mmol), và được khuấy ở nhiệt độ 25°C trong 24 giờ. Dung dịch phản ứng được rửa bằng 5 ml trietylamin phosphat 0,5 M. Pha nước được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 5 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, và dung môi được làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 2,774 g sản phẩm thô. Sản phẩm thô được đưa vào quá trình tinh chế cột. Cột được nạp đầy 60 g silica gel pha thường (200-300 mesh), bổ sung bằng 1% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel, được cân bằng bằng diclometan và được rửa giải bằng giải hấp gradien của 1‰ khối lượng diclometan chứa trietylamin: metanol=100:18-100:20. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 1,874 g sản phẩm tinh khiết của phân tử liên hợp L-9. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8,58 (d, J=4,2 Hz, 1H), 7,94–7,82 (m, 3H), 7,41–7,29 (m, 5H), 7,22 (d, J = 8,1 Hz, 5H), 6,89 (d, J=8,3 Hz, 4H), 5,49–5,37 (m, 1H), 5,21 (d, J = 3,0 Hz, 3H), 4,97 (d, J=11,1 Hz, 3H), 4,49 (d, J=8,2 Hz, 3H), 4,02 (s, 9H), 3,88 (dd, J=19,4, 9,4 Hz, 3H), 3,77–3,65 (m, 9H), 3,50–3,39 (m, 6H), 3,11–2,90 (m, 5H), 2,61–2,54 (m, 4H), 2,47–2,41 (m, 2H), 2,26–2,17 (m, 2H), 2,15–1,95 (m, 22H), 1,92–1,84 (m, 9H), 1,80–1,70 (m, 10H), 1,65–1,35 (m, 17H), 1,31–1,19 (m, 4H), 0,96 (t, J=7,1 Hz, 9H). MS m/z: C94H132N7O38, [M-DMTr]+, tính toán: 1664,72, đo: 1665,03.

(1-1-9) Tổng hợp hợp chất L-10:



Trong bước này, hợp chất L-10 được điều chế bằng cách liên kết phân tử liên hợp L-9 với giá đỡ pha rắn.

Phân tử liên hợp L-9 (0,233 g, 0,1126 mmol) thu được trong bước (1-1-8), O-benzotriazol-tetrametyluroni hexaflophosphat (HBTU, 0,064 g, 0,1689 mmol) và diisopropyletylamin (DIEA, 0,029 g, 0,2252 mmol) được trộn và được hòa tan trong 19 ml axetonitril, và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Nhựa aminometyl (0,901 g, 100-200 mesh, tải nạp amino: 400 µmol/g, được mua từ Tianjin Nankai HECHENG S&T Co., Ltd.) được bổ sung vào dịch lỏng phản ứng. Phản ứng được thực hiện trên máy rung ở nhiệt độ 25°C và 220 rpm/phút trong 15 giờ, sau đó lọc. Phần cặn được rửa 2 lần, mỗi lần bằng 30 ml DCM, 3 lần, mỗi lần bằng 30 ml axetonitril, và 1 lần bằng 30 ml etyl ete, và được làm khô trong 2 giờ bằng bơm dầu chân không. Sau đó phản ứng gắn mũ được thực hiện bằng cách bổ sung nguyên liệu ban đầu (CapA, CapB, 4-dimetylaminopyridin (DMAP) và axetonitril) theo tỷ lệ tích điện thể hiện trong bảng 2. Phản ứng được thực hiện trên máy rung ở nhiệt độ 25°C và 200 rpm/phút trong 5 giờ. Dịch lỏng phản ứng được lọc. Phần cặn được rửa 3 lần, mỗi lần bằng 30 ml axetonitril, dung môi được làm bay hơi đến khô, và hỗn hợp được làm khô qua đêm dưới áp suất giảm bằng bơm dầu chân không để thu được 1,100 g hợp chất L-10 (nghĩa là, phân tử liên hợp L-9 được liên kết với giá đỡ pha rắn), bằng việc tải nạp 90,8 µmol/g.

Bảng 2: Tỷ lệ tích điện của phản ứng gắn mũ

Nguyên liệu ban đầu	Lượng	Mức độ	Số lô	Nhà sản xuất
CapA	20 ml	——	——	——
CapB	2,3 ml	——	——	——
DMAP	0,01 g	độ tinh khiết phân tích	I1422139	Aladdin
Axetonitril	2,3 ml	độ tinh khiết quang phổ	O15161001	CINC (Shanghai) Co., Ltd

Trong bảng bên trên, CapA và CapB là dung dịch của các chất gắn mũ. CapA là dung dịch của 20% thể tích của N-metylimidazol trong hỗn hợp chứa pyridin/axetonitril, trong đó tỷ lệ thể tích của pyridin với axetonitril là 3:5. CapB là dung dịch của 20% thể tích của axetic anhydrit trong axetonitril.

(1-2) Tổng hợp chuỗi có nghĩa của các thể liên hợp 1-11

Monome nucleosit được liên kết lần lượt theo hướng 3' đến 5' theo sự sắp xếp trình tự của nucleotit trong chuỗi có nghĩa bằng phương pháp tổng hợp pha rắn phosphoramidit, bắt đầu chu kỳ từ hợp chất L-10 được điều chế trong bước nêu trên. Liên kết của mỗi monome nucleosit được bao gồm bốn bước phản ứng của khử bảo vệ, liên kết, gắn mũ, và oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa. Trong đó, khi 2 nucleotit được liên kết qua liên kết phosphoeste, bốn bước phản ứng của khử bảo vệ, liên kết, gắn mũ, và oxy hóa được bao gồm trong quá trình liên kết monome nucleosit sau; và khi hai nucleotit được liên kết qua liên kết phosphorothioat, bốn bước phản ứng của khử bảo vệ, liên kết, gắn mũ, và lưu huỳnh hóa được bao gồm trong quá trình liên kết monome nucleosit sau. Điều kiện tổng hợp được đưa ra như sau.

Monome nucleosit được cung cấp trong dung dịch axetonitril 0,1 M. Điều kiện đối với phản ứng khử bảo vệ trong mỗi bước là giống nhau, nghĩa là, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C, thời gian phản ứng là 70 giây, dung dịch chứa axit dicloaxetic trong diclometan (3% thể tích/thể tích) làm chất khử bảo vệ, và tỷ lệ mol của axit dicloaxetic với nhóm bảo vệ trên giá đỡ pha rắn của 4,4'-dimetoxytrityl là 5:1.

Điều kiện đối với phản ứng liên kết trong mỗi bước là giống nhau, có nhiệt độ là 25°C, tỷ lệ mol của trình tự axit nucleic được liên kết với giá đỡ pha rắn với monome nucleosit là 1:10, tỷ lệ mol của trình tự axit nucleic được liên kết với giá đỡ pha rắn với

chất liên kết là 1:65, thời gian phản ứng là 600 giây, và dung dịch axetonitril 0,5 M chứa 5-etylthio-1H-tetrazol làm chất liên kết.

Điều kiện để phản ứng gắn mũ trong mỗi bước là giống nhau, có nhiệt độ là 25°C và thời gian phản ứng là 15 giây, hỗn hợp đã trộn chứa Cap A và Cap B trong tỷ lệ mol là 1:1 làm chất gắn mũ, và tỷ lệ mol của chất gắn mũ với trình tự axit nucleic được liên kết với giá đỡ pha rắn là 1:1:1 (anhydrit: N-metylimidazol: trình tự axit nucleic được liên kết với giá đỡ pha rắn).

Điều kiện đối với phản ứng oxy hóa trong mỗi bước là giống nhau, có nhiệt độ là 25°C, thời gian phản ứng là 15 giây, và nước iot 0,05 M làm chất oxy hóa; và tỷ lệ mol của iot với trình tự axit nucleic được liên kết với giá đỡ pha rắn trong bước liên kết là 30:1. Phản ứng được thực hiện trong dung môi hỗn hợp trong đó tỷ lệ của tetrahydrofuran: nước: pyridin là 3:1:1.

Điều kiện đối với phản ứng lưu huỳnh hóa trong mỗi bước là giống nhau, có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25°C, thời gian phản ứng là 300 giây, và xanthan hydrua làm chất lưu huỳnh hóa; tỷ lệ mol của chất lưu huỳnh hóa với trình tự axit nucleic được liên kết với giá đỡ pha rắn trong bước liên kết là 120:1. Phản ứng được thực hiện trong dung môi hỗn hợp trong đó tỷ lệ của axetonitril: pyridin là 1:1.

Điều kiện để cắt và khử bảo vệ như sau: bổ sung trình tự nucleotit đã tổng hợp được liên kết với giá đỡ vào 25% khối lượng amoniac nước để phản ứng trong 16 giờ ở nhiệt độ 55°C, và amoniac nước với lượng là 0,5 ml/μmol. Chất lỏng được loại bỏ, và phần cặn được cô trong chân không đến khô.

Tinh chế và khử muối: tinh chế axit nucleic đạt được bằng cách sử dụng cột sắc ký ion điều chế (Source 15Q) với giải hấp gradien của NaCl. Đặc biệt là, chất rửa giải A: natri phosphat 20 mM (pH 8,1), dung môi: nước/axetonitril = 9:1 (thể tích/thể tích); chất rửa giải B: natri clorua 1,5 M, natri phosphat 20 mM (pH 8,1), dung môi: nước/axetonitril = 9:1 (thể tích/thể tích); giải hấp gradien: chất rửa giải A: chất rửa giải B = 100:0 - 50:50. Dịch rửa giải được kết hợp, kết hợp và khử muối bằng cách sử dụng

cột sắc ký pha đảo. Điều kiện cụ thể bao gồm sử dụng cột Sephadex (lớp đệm: Sephadex-G25) để khử muối và nước khử ion hóa để giải hấp.

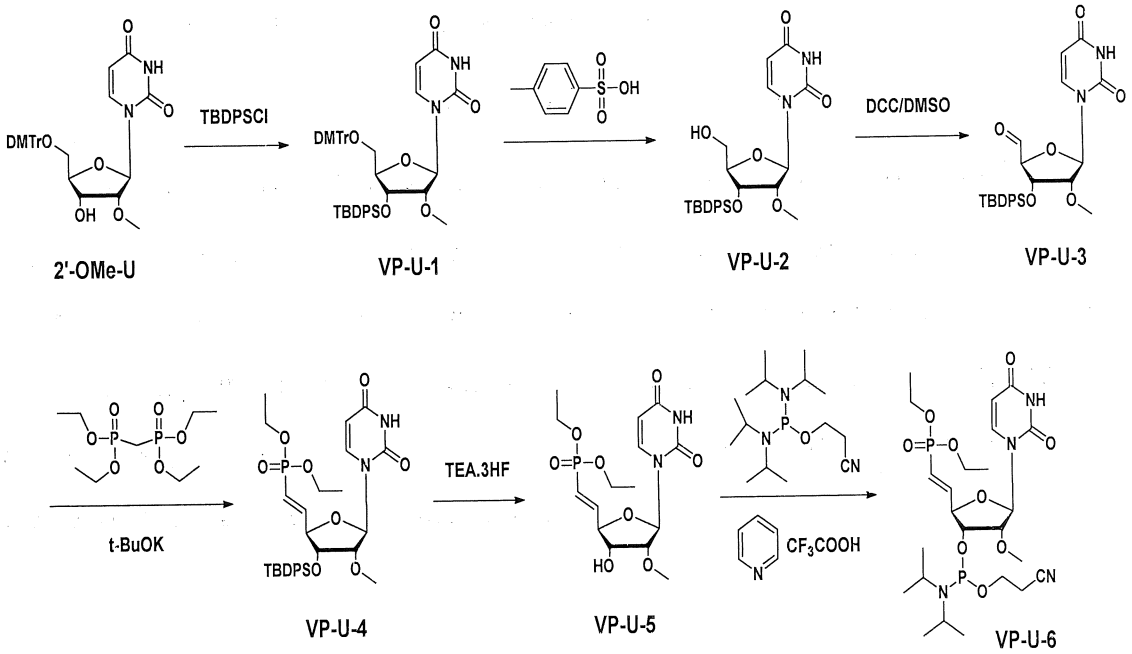
Phát hiện: độ tinh khiết được xác định bằng kỹ thuật sắc ký trao đổi ion (IEX-HPLC); và khối lượng phân tử được phân tích bằng sắc ký lỏng-phổ khối (LC-MS).

(1-3) Tổng hợp chuỗi đối nghĩa của các thể liên hợp 1-11

(1-3A) Điều chế chuỗi đối nghĩa của thể liên hợp 1, 6 và 11

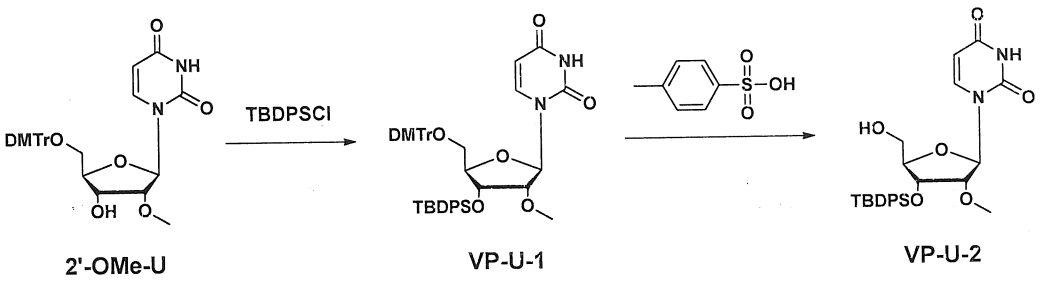
Chuỗi đối nghĩa (AS) của các thể liên hợp 1 và 2 được tổng hợp bằng cách bắt đầu chu kỳ sử dụng giá đỡ pha rắn phổ biến (UnyLinker™ loaded NittoPhase®HL Solid Supports, Kinovate Life Sciences Inc.) theo tổng hợp phosphoramidit pha rắn. Phản ứng khử bảo vệ, liên kết, gắn mũ, oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa, cắt, khử bảo vệ, tinh chế và khử muối trong phương pháp tổng hợp pha rắn được tiến hành dưới điều kiện tương tự như điều kiện trong tổng hợp chuỗi có nghĩa.

Trong đó, vinyl phosphat và 2'-metoxy biến đổi uridin monome (VP-Um) được tổng hợp theo phương pháp sau:



(1-3-1) Tổng hợp VP-U-2

Phân tử VP-U-2 được tổng hợp theo phương pháp sau:

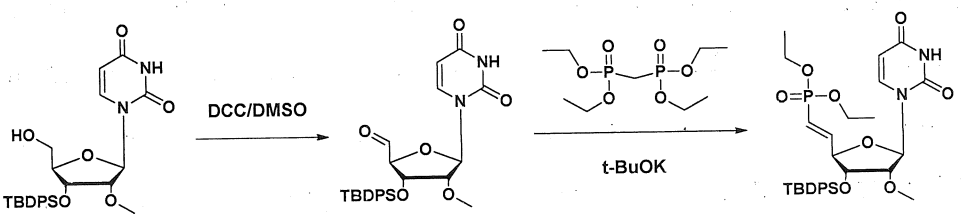


Uraxil nucleosit biến đổi 2'-metoxy (2'-OMe-U, 51,30 g, 91,6 mmol), tertbutyl diphenylclosilan (TBDPSCl, 50,35 g, 183,2 mmol), và imidazol (12,47 g, 183,2 mmol) được trộn và được hòa tan trong 450 ml N,N-dimetylformamit (DMF) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ. DMF được loại bỏ bằng cách làm bay hơi, và phần cặn được hòa tan trong 600 ml diclometan và được rửa bằng 300 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã tách được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 300 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, được rửa bằng 5% axit oxalic cho đến khi độ pH của pha nước là <5. Dung môi được làm bay hơi đến khô để thu được sản phẩm thô của VP-U-1, được sử dụng trực tiếp trong tổng hợp VP-U-2 tiếp theo.

Sản phẩm thô VP-U-1 được hòa tan trong 100 ml diclometan, và sau đó khuấy bằng 10 phút trong bể đá. 450 ml dung dịch axit p-toluensulfonic 2% (bằng dung môi đã trộn của metanol và diclometan với tỷ lệ thể tích là 3:7) được làm lạnh trước trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C được bổ sung vào phản ứng trong 10 phút. Phản ứng được dập tắt bằng cách bổ sung 200 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha hữu cơ thu được được rửa bằng cách bổ sung dung dịch natri bicacbonat bão hòa đến độ pH=8. Pha nước được kết hợp và được chiết 2 lần, mỗi lần bằng 200 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp và được rửa một lần bằng 200 ml nước muối bão hòa. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi, và phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh). Cột được nạp bằng ete dầu mỏ và được rửa giải bằng giải hấp gradien của ete dầu mỏ: etyl axetat: diclometan: metanol = 1:1:1:0,05 - 1:1:1:0,25. Dịch rửa giải được kết hợp, dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không để thu được tổng số 40,00 g sản phẩm tinh khiết VP-U-2. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,96 (d, J=7,8 Hz, 1H), 7,64 (dtd, J=5,1, 4,0, 2,2 Hz, 4H), 7,41–7,30 (m, 6H), 6,79 (d, J=4,7 Hz, 1H), 5,73 (d,

J=7,6 Hz, 1H), 4,94 (t, J=7,0 Hz, 1H), 4,12 (td, J=4,6, 3,9 Hz, 1H), 4,05 (dd, J=4,8, 4,0 Hz, 1H), 3,96 (t, J=4,7 Hz, 1H), 3,68 (ddd, J=11,8, 7,0, 4,6 Hz, 1H), 3,57–3,46 (m, 1H), 3,39 (s, 3H), 1,05 (s, 8H). MS m/z: C26H33N2O6Si, [M+H]+, tính toán: 497,21, Đo: 497,45.

(1-3-2) Tổng hợp VP-U-4:

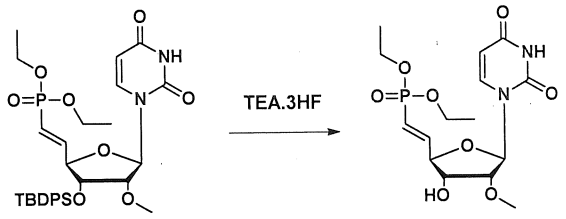


VP-U-2 VP-U-3 VP-U-4

VP-U-2 (19,84 g, 40,0 mmol), dixyclohexylcarbodiimit (DCC, 16,48 g, 80,0 mmol), pyridin (4,20 g, 53,2 mmol), và axit trifloaxetic (6,61 g, 53,2 mmol) được trộn và được hòa tan trong 200 ml dimetyl sulfoxit (DMSO) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ. Tetraetyl metylendiphosphat (21,44 g, 74,4 mmol) được hòa tan riêng trong 120 ml THF, được làm lạnh trong bể đá, bổ sung bằng t-BuOK (11,36 g, 101,2 mmol) ở nhiệt độ của bể đá để phản ứng trong 10 phút, được làm ấm đến nhiệt độ phòng để phản ứng trong 0,5 giờ và bổ sung vào dung dịch phản ứng nêu trên trong khoảng 1 giờ. Phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ bể đá trong 1 giờ và sau đó được làm ấm đến nhiệt độ phòng để phản ứng trong 18 giờ. Phản ứng được dập tắt bằng cách bổ sung nước. Pha nước đã tách được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 200 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp và được rửa một lần bằng 200 ml nước muối bão hòa. Dung môi được làm bay hơi đến khô, và phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh). Cột được nạp bằng ete dầu mỏ và được rửa giải bằng giải hấp gradien của ete dầu mỏ: etyl axetat = 1:1-1:4. Dịch rửa giải được kết hợp, dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không để thu được toàn bộ 14,00 g sản phẩm tinh khiết VP-U-4. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,96 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,64 (dtd, J = 5,1, 4,0, 2,2 Hz, 4H), 7,41 – 7,30 (m, 6H), 6,82 – 6,71 (m, 2H), 5,90 (ddd, J = 25,9, 15,0, 1,0 Hz, 1H), 5,73 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 4,36 – 4,21 (m, 3H), 4,18 (t, J = 4,9 Hz, 1H), 4,05 (ddq, J = 9,7, 8,5, 6,9 Hz, 2H), 3,87 (t, J = 4,8 Hz,

1H), 3,39 (s, 3H), 1,32 (td, J = 6,9, 0,7 Hz, 6H), 1,05 (s, 8H). MS m/z: C31H42N2O8PSi, [M+H]+, tính toán: 629,24, đo: 629,51.

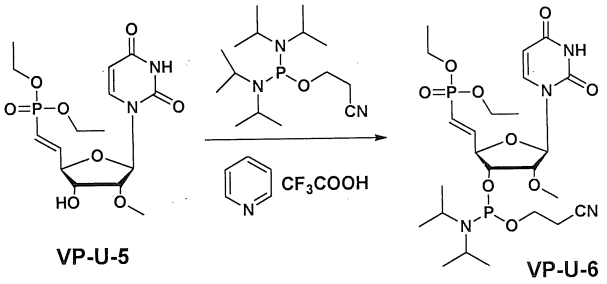
(1-3-3) Tổng hợp VP-U-5:



VP-U-4 VP-U-5

VP-U-4 (14,00 g, 22,29 mmol) được hòa tan trong 100 ml tetrahydrofuran, bổ sung bằng trietylamin trihydroflorua (17,96 g, 111,45 mmol), và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ để phản ứng hoàn toàn. Dung môi được làm bay hơi trực tiếp đến khô và phần cặn được hòa tan trong dichorometan; các bước bay hơi và hòa tan nêu trên được lặp lại bổ sung 2 lần, mỗi lần bằng 50 ml diclometan, để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh). Cột được nạp bằng ete dầu mỏ và được rửa giải bằng giải hấp gradien của ete dầu mỏ: etyl axetat: diclometan: metanol = 1:1:1:0,05 - 1:1:1:0,25. Dịch rửa giải được kết hợp, dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không để thu được toàn bộ 6,70 g sản phẩm tinh khiết VP-U-5. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,96 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,77 (dd, J = 15,0, 6,2 Hz, 1H), 5,99 – 5,82 (m, 2H), 5,73 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 5,27 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 5,10 (dd, J = 5,3, 4,7 Hz, 1H), 4,29 (ddq, J = 9,8, 8,6, 7,0 Hz, 2H), 4,17 (ddd, J = 6,2, 5,2, 1,0 Hz, 1H), 4,12 – 3,98 (m, 3H), 3,39 (s, 2H), 1,32 (td, J = 6,9, 0,6 Hz, 6H). MS m/z: C15H24N2O8P, [M+H]+, tính toán: 391,13, đo: 391,38.

(1-3-4) Tổng hợp VP-U-6:

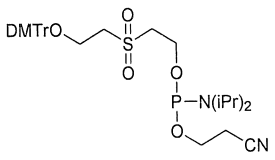


VP-U-5 VP-U-6

VP-U-5 (391 mg, 1,0 mmol), pyridin trifloaxetat (0,232 g, 1,2 mmol), N-metylimidazol (0,099 g, 1,2 mmol), và bis(diisopropylamino)(2-xyanoetoxy) phosphin (0,452 g, 1,5 mmol) được bổ sung vào 10 ml diclometan khan dưới khí argon để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 5 giờ. Dung môi được làm bay hơi đến khô, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột (200-300 mesh silica gel pha thường, bằng cách giải hấp gradien diclometan: axetonitril (chứa 0,5% khối lượng trietylamin) = 3:1 - 1:3). Dịch rửa giải được kết hợp và được cô để loại bỏ dung môi để thu được toàn bộ 508 mg sản phẩm đích VP-U-6. 31P NMR (161 MHz, DMSO-d6) δ 150,34, 150,29, 17,07, 15,50. MS m/z: C24H41N4O9P2, [M+H]+, tính toán: 591,23, đo: 591,55. Được chỉ ra rằng VP-U-6 là sản phẩm đích VP-Um, có liên quan đến chuỗi ARN tổng hợp làm monome nucleosit.

(1-3B) Điều chế chuỗi đối nghĩa của thể liên hợp 2 và 10

Chuỗi đối nghĩa của các thể liên hợp 2 và 10 chỉ khác với chuỗi đối nghĩa của các thể liên hợp 1 và 11 trong biến đổi nucleotit đầu tận 5' thứ nhất. Trong quá trình điều chế chuỗi đối nghĩa theo phương pháp tổng hợp phosphoramidit pha rắn, sau khi liên kết 2'-metoxy biến đổi uridin monome làm monome nucleosit cuối cần được liên kết, monome có công thức (CPR-I) (được mua bởi Suzhou GenePharma Inc. làm Cat#13-2601-XX) được liên kết với đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa bằng bốn bước phản ứng của khử bảo vệ, liên kết, gắn mũ, và oxy hóa, để tạo thành biến đổi 5'-phosphat este.



(CPR-I)

Trong quá trình tổng hợp, giá đỡ pha rắn phổ biến được sử dụng, các điều kiện của khử bảo vệ, liên kết, gắn mũ, oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóphản ứng, chia cắt và khử bảo vệ, tinh chế và khử muối là tương đương các điều kiện được sử dụng trong tổng hợp chuỗi có nghĩa.

(1-3C) Điều chế chuỗi đối nghĩa của các thể liên hợp 3, 4 và 9

Quy trình tổng hợp tương tự để tổng hợp chuỗi đối nghĩa của thể liên hợp 2 và 19 được sử dụng, ngoại trừ điều kiện phản ứng oxy hóa nêu trên được thay thế bằng điều kiện phản ứng lưu huỳnh hóa trong liên kết CPR-I monome, nhờ đó thu được chuỗi đối nghĩa của thể liên hợp 3, 4 và 9 bằng biến đổi 5'-phosphorothioat.

(1-3D) Điều chế chuỗi đối nghĩa của các thể liên hợp 5, 7 và 8

Chuỗi đối nghĩa (AS) của các thể liên hợp 5, 7 và 8 được tổng hợp bằng cách bắt đầu chu kỳ sử dụng giá đỡ pha rắn phổ biến (UnyLinker™ loaded NittoPhase®HL Solid Supports, Kinovate Life Sciences Inc.) theo tổng hợp phosphoramidit pha rắn. Phản ứng khử bảo vệ, liên kết, gắn mũ, oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa, chia cắt, khử bảo vệ, tinh chế và khử muối trong phương pháp tổng hợp pha rắn, được tiến hành dưới các điều kiện tương tự như các điều kiện trong tổng hợp chuỗi có nghĩa.

(1-4) Tổng hợp thể liên hợp 1-11

Đối với thể liên hợp 1, chuỗi S và chuỗi AS được hòa tan tương ứng trong nước để tiêm để thu được dung dịch chứa 40 mg/m. Chúng được trộn ở tỷ lệ đẳng mol, gia nhiệt ở nhiệt độ 50°C trong 15 phút, và sau đó được làm lạnh ở nhiệt độ phòng, sao cho chúng có thể tạo thành cấu trúc được tạo chuỗi kép thông qua liên kết hydro. Thể liên hợp được pha loãng đến nồng độ là 0,2 mg/mL bằng nước siêu tinh khiết (điều chế bằng dụng cụ nước siêu tinh khiết Milli-Q, với điện trở suất là 18,2MΩ*cm (25°C)). Khối lượng phân tử được đo bằng thiết bị LC-MS (được mua từ Waters Corp., kiểu: LCT Premier). Khi giá trị đo phù hợp với các giá trị tính toán, được xác nhận rằng thể liên hợp 1 đã tổng hợp là trình tự axit nucleic được tạo chuỗi 2 lần đã thiết kế cần được quan tâm bằng phân tử liên hợp L-9.

Chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa tương ứng của các thể liên hợp 2-11 như được tổng hợp bên trên được bắt cặp theo phương pháp tương tự, để tạo thành cấu trúc chuỗi kép; và khối lượng phân tử của các thể liên hợp được đo như sau:

Thể liên hợp 2: Giá trị tính toán S: 7516,37, AS: 7065,58;

Giá trị đo: S: 7516,6, AS: 7064,5;

Thể liên hợp 3: Giá trị tính toán S: 7504,34, AS: 7139,68;

Giá trị đo: S: 7515,6, AS: 7138,9;

Thể liên hợp 4: Giá trị tính toán S: 7516,37, AS: 7081,64;

Giá trị đo: S: 7515,6,AS: 7080,9;

Thể liên hợp 5: Giá trị tính toán S: 7504,34, AS: 6961,52;

Giá trị đo: S: 7503,4, AS: 6960,9;

Thể liên hợp 6: Giá trị tính toán S: 7504,34, AS: 7037,51;

Giá trị đo: S: 7503,6, AS: 7036,9;

Thể liên hợp 7: Giá trị tính toán S: 8218,83, AS: 7703,05;

Giá trị đo: S: 8218, AS: 7702,5;

Thể liên hợp 8: Giá trị tính toán S: 7516,37, AS: 6985,58;

Giá trị đo: S: 7516,5, AS: 6984,9;

Thể liên hợp 9: Giá trị tính toán S: 7504,34, AS: 7041,52;

Giá trị đo: S: 7503,6, AS: 7040,8;

Thể liên hợp 10: Giá trị tính toán S: 7504,34, AS: 7057,58,

Giá trị đo: S: 7503,6, AS: 7057;

Giá trị đo phù hợp với giá trị tính toán, chỉ ra rằng liên hợp đã tổng hợp được liên hợp siARN với trình tự đích.

Liên hợp 1-11 có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (3).

Ví dụ điều chế 2: Điều chế các thể liên hợp 12-26 và thể liên hợp so sánh 1

Dự kiến rằng thể liên hợp đối tượng có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong ví dụ điều chế 1, ngoại trừ: 1) siARN có các trình tự thể hiện trong bảng 1 lần lượt tương ứng với liên hợp 12-26 và thể liên hợp so sánh 1; và 2) trong trường hợp mà trình tự đích chứa nucleotit không biến đổi, trong số các điều kiện cắt và khử bảo vệ, sau khi xử lý bằng amoniac chứa nước, sản phẩm được hòa tan trong N-

metylpyrolidon với lượng là 0,4 ml/µmol, sau đó bằng cách bổ sung 0,3 ml/µmol trietylamin và 0,6 ml/µmol trietylamin trihydroflorua, đối với lượng chuỗi đơn axit nucleic, do đó loại bỏ việc bảo vệ 2'-TBDMS trên riboza.

Trình tự thể liên hợp siARN trong các thể liên hợp được thể hiện trong bảng 3. Trong đó, siARN được bao gồm trong liên hợp so sánh 1 là siARN đối chứng âm (sau đây còn được gọi là NC) thể hiện không có tác dụng ức chế đối với gen HBV.

Bảng 3: Thể liên hợp siARN

Ví dụ	Số thứ tự	Hướng trình tự 5'-3'		SEQ ID NO
Thể liên hợp 1	L10-siHBa1M1SVP	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	41
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	42
Thể liên hợp 2	L10-siHBa1M1SP	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	43
		Chuỗi đối nghĩa	P-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	44
Thể liên hợp 3	L10-siHBa1M1SPsT	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	45
		Chuỗi đối nghĩa	Ps-TmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	46
Thể liên hợp 4	L10-siHBa1M1SPs	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	47
		Chuỗi đối nghĩa	Ps-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	48

Thể liên hợp 5	L10-siHBa1M2S	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	49
		Chuỗi đối nghĩa	UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	50
Thể liên hợp 6	L10-siHBa1M2SVP	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	51
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	52
Thể liên hợp 7	L10-siHBa2M1S	Chuỗi có nghĩa	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	53
		Chuỗi đối nghĩa	UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	54
Thể liên hợp 8	L10-siHBa1M1S	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	55
		Chuỗi đối nghĩa	UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	56
Thể liên hợp 9	L10-siHBa1M2SPs	Chuỗi có nghĩa	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	57
		Chuỗi đối nghĩa	Ps-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	58
Thể liên hợp 10	L10-siHBa2M2SP	Chuỗi có nghĩa	GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	59
		Chuỗi đối nghĩa	P-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	60
Thể liên hợp 11	L10-siHBa2M1SVP	Chuỗi có nghĩa	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	61
		Chuỗi đối	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUm	62

		nghĩa	GmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	
Thể liên hợp 12	L10-siHBa1	Chuỗi có nghĩa	CCUUGAGGCAUACUUCAAA	63
		Chuỗi đối nghĩa	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU	64
Thể liên hợp 13	L10-siHBa2	Chuỗi có nghĩa	GACCUUGAGGCAUACUUCAAA	65
		Chuỗi đối nghĩa	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCGG	66
Thể liên hợp 14	L10-siHBa1M1	Chuỗi có nghĩa	CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	67
		Chuỗi đối nghĩa	UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	68
Thể liên hợp 15	L10-siHBa1M2	Chuỗi có nghĩa	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	69
		Chuỗi đối nghĩa	UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	70
Thể liên hợp 16	L10-siHBa2M1	Chuỗi có nghĩa	GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	71
		Chuỗi đối nghĩa	UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	72
Thể liên hợp 17	L10-siHBa2M2	Chuỗi có nghĩa	GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	73
		Chuỗi đối nghĩa	UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	74
Thể liên hợp 18	L10-siHBa2M2S	Chuỗi có nghĩa	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	75

		Chuỗi đối nghĩa	UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	76
Thể liên hợp 19	L10-siHBa1M1VP	Chuỗi có nghĩa	CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	77
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	78
Thể liên hợp 20	L10-siHBa1M2VP	Chuỗi có nghĩa	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	79
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	80
Thể liên hợp 21	L10-siHBa2M1VP	Chuỗi có nghĩa	GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	81
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	82
Thể liên hợp 22	L10-siHBa2M2VP	Chuỗi có nghĩa	GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	83
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	84
Thể liên hợp 23	L10-siHBa2M2SVP	Chuỗi có nghĩa	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	85
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	86
Thể liên hợp 24	L10-siHBa1M5SVP	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	87
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	88

Thể liên hợp 25	L10-siHBa1M3SVP	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGmAmGfGmCfAmUfAmCmUmUmCmAmAmAm	89
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	90
Thể liên hợp 26	L10-siHBa1M4SVP	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	91
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	92
Thể liên hợp 27	P10-siHBa1M1SVP	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	93
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	94
Thể liên hợp 28	R5-siHBa1M1SVP	Chuỗi có nghĩa	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	95
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	96
Thể liên hợp 29	LA5-siHBa1M1SVP	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	97
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	98
Thể liên hợp 30	LB5-siHBa1M1SVP	Chuỗi có nghĩa	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	99
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	100
Thể liên hợp 31	V8-siHBa1M1SVP	Chuỗi có nghĩa	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	101

		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	102
Thể liên hợp 32	W8-siHBa1M1SVP	Chuỗi có nghĩa	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	103
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	104
Thể liên hợp 33	X8-siHBa1M1SVP	Chuỗi có nghĩa	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	105
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	106
Thể liên hợp 34	Z5-siHBa1M1SVP	Chuỗi có nghĩa	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	107
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	108
Thể liên hợp 35	FIN-siHBa2	Chuỗi có nghĩa	GACCUUGAGGCAUACUUCAAA	109
		Chuỗi đối nghĩa	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCGG	110
Thể liên hợp 36	FIN-siHBa2M5SVP	Chuỗi có nghĩa	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	111
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	112
Thể liên hợp 37	FIN-siHBa2M3SVP	Chuỗi có nghĩa	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGmCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	113
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	114
Thể liên hợp 38	FIN-siHBa2M4SVP	Chuỗi có	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	115

		nghĩa		
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	116
Thể liên hợp 39	FIN-siHBa2M1SVP	Chuỗi có nghĩa	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	117
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	118
Thể liên hợp 40	FIN-siHBa2M2SVP	Chuỗi có nghĩa	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	119
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	120
Thể liên hợp 41	FIN-siHBa3M2SVP	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	121
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsCm	122
Thể liên hợp 42	FIN-siHBa3M2S	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	123
		Chuỗi đối nghĩa	UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsCm	124
Thể liên hợp 43	FIN-siHBa1	Chuỗi có nghĩa	CCUUGAGGCAUACUUCAAA	125
		Chuỗi đối nghĩa	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU	126
Thể liên hợp 44	FIN-siHBa1M2SVP	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	127
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmG	128

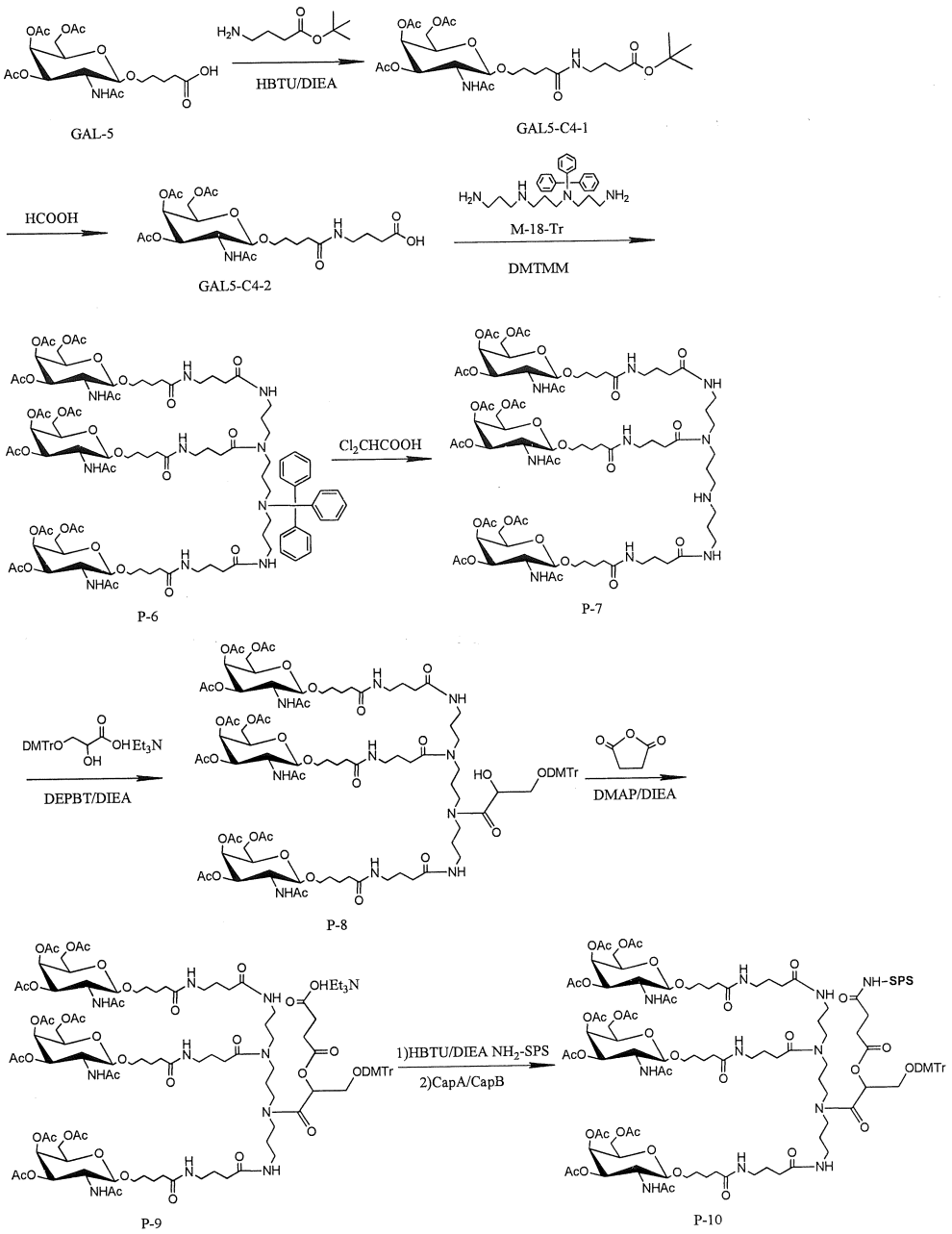
			mCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsU m	
Thể liên hợp 45	FIN-siHBa1M2S	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUm AmCmUmUmCmAmAmAm	129
		Chuỗi đối nghĩa	UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmG mCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsU m	130
Thể liên hợp 46	FIN-siHBa1M1SVP	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmU mAmCmUmUmCmAmAmAm	131
		Chuỗi đối nghĩa	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUm GmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsU m	132
Thể liên hợp 47	FIN-siHBa2M1S	Chuỗi có nghĩa	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfC fAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	133
		Chuỗi đối nghĩa	UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUm GmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCm sGmsGm	134
Thể liên hợp 48	FIN-siHBa1M1S	Chuỗi có nghĩa	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmU mAmCmUmUmCmAmAmAm	135
		Chuỗi đối nghĩa	UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUm GmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsU m	136
Thể liên hợp 49	FIN-X2M2	Chuỗi có nghĩa	CmCmUmUmGAGGCmAUmACmU mUmCmAAAdT-S-dT	137
		Chuỗi đối nghĩa	UfUmUfGAAGUfAUGCCUfCAAG GdT-S-dT	138
Thể liên hợp so sánh 1	L10-NC	Chuỗi có nghĩa	UUCUCCGAACGUGUCACGU	139
		Chuỗi đối nghĩa	ACGUGACACGUUCGGAGAAUU	140
Thể liên hợp so sánh 2	AD-66810	Chuỗi có nghĩa	GmsUmsGmUmGfCmAfCfUfUmCm GmCmUmUmCmAmCmAm	141

		Chuỗi đối nghĩa	UmsGfsUmGmAmAfGmCfGfAmAm GmUmGfCmAfCmAmCmsUmsUm	142

Ví dụ điều chế 3 Điều chế P10-siHBa1M1SVP (thể liên hợp 27)

(3-1) Tổng hợp hợp chất P-10

Hợp chất P-10 được tổng hợp theo quy trình sau:



(3-1-1) Tổng hợp GAL5-C4-1

GAL-5 (13,43 g, 30,0 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả trong bước (1-1-1) nêu trên, t-butyl 4-aminobutyrat hydroclorua (5,87 g, 30,0 mmol), O-

benzotriazol-tetrametyluroni hexaflophosphat (13,65 g, 36,0 mmol) và diisopropyletylamin (11,63 g, 90,0 mmol) được bổ sung vào 40 ml N,N-dimetylformamit, được hòa tan đồng nhất và sau đó được khuấy ở nhiệt độ phòng để phản ứng trong 5 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được bổ sung bằng 300 ml dung dịch natri bicacbonat nước bão hòa, được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 200 ml etyl axetat. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp và được rửa 1 lần bằng 200 ml nước muối bão hòa. Pha hữu cơ được tách và được làm khô bằng natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm đến khô để thu được 30,3 g sản phẩm thô GAL5-C4-1 dưới dạng dầu, được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo.

(3-1-2) Tổng hợp GAL5-C4-2

Sản phẩm thô GAL5-C4-1 (30,3 g, 30 mmol) thu được trong bước (3-1-1) được hòa tan trong 180 ml axit formic và được khuấy ở nhiệt độ phòng để phản ứng trong 16 giờ. Dung môi được làm bay hơi đến khô. Phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột (200-300 mesh silica gel pha thường, bằng cách giải hấp gradien diclometan: metanol = 100:18-100:20). Dịch rửa giải được kết hợp và được cô để loại bỏ dung môi để thu được toàn bộ 14,84 g sản phẩm đích GAL5-C4-2.

(3-1-3) Tổng hợp P-6:

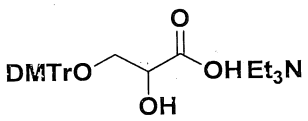
M-18-Tr (2,02 g, 4,69 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả trong bước (1-1-4) và GAL5-C4-2 (8,24 g, 15,48 mmol) thu được trong bước (3-1-2) được trộn và được hòa tan trong 47 ml axetonitril, bổ sung bằng N-metylmorpholin (3,13 g, 30,96 mmol) sau đó bằng 4-(4,6-dimetoxytriazin-2-yl)-4-metylmorpholin hydroclorua (DMTMM, 4,28 g, 15,48 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được pha loãng bằng 20 ml diclometan. Pha hữu cơ thu được được rửa bằng 10 ml dung dịch natri bicacbonat bão hòa và 10 ml nước muối bão hòa, tương ứng. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan, và được lọc. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô, được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh). Cột được nạp bằng ete dầu mỏ, bổ sung bằng 1% khối lượng trietylamin để

trung hòa độ axit của silica gel, và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan: metanol = 100:5-100:7. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được toàn bộ 8,27 g sản phẩm tinh khiết P-6.

(3-1-4) Tổng hợp P-7:

P-6 (6,82 g, 3,456 mmol) thu được trong bước (3-1-3) nêu trên được hòa tan trong 69 ml diclometan, và bổ sung bằng axit dicloaxetic (13,367 g, 103,67 mmol) để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được pha loãng bằng cách bổ sung 100 ml diclometan, được rửa và điều chỉnh đến pH 7-8 bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã tách được chiết 6 lần, mỗi lần bằng 30 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan, và được lọc. Sau đó dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh). Cột được bổ sung bằng 10% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel, được cân bằng bằng 1‰ khối lượng trietylamin và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan: metanol = 100:30-100:40. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được toàn bộ 4,82 g P-7. MS m/z: C78H127N10O33, [M+H]+, tính toán: 1732,91, đo: 1735,73.

(3-1-5) Tổng hợp P-8:



(A-1)

P-7 (2,653 g, 1,532 mmol) và A-1 (2,342 g, 4,596 mmol) được trộn và được hòa tan trong 16 ml diclometan, và bổ sung bằng 3-dietoxyphosphoryl-1,2,3- benzotrizin 4(3H)-on (DEPBT) (1,375 g, 4,596 mmol) sau đó bằng diiso propyletylamin (1,188 g, 9,191 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ 25°C trong 2 giờ. Pha hữu cơ được rửa bằng 10 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã tách được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp và được rửa bằng 10 ml nước

muối bão hòa. Pha nước đã tách được chiết hai lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan, và thu được pha hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan và được lọc. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không qua đêm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được đưa vào quá trình tinh chế cột. Cột được nạp đầy 120 g silica gel pha thường (200-300 mesh), bổ sung bằng 20 ml trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel, được cân bằng bằng ete dầu mỏ chứa 1% khối lượng trietylamin và được rửa giải bằng giải hấp gradien của ete dầu mỏ: etyl axetat: diclometan: N,N-dimetylformamit = 1:1:1:0,5 - 1:1:1:0,6. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được toàn bộ 2,793 g sản phẩm tinh khiết P-8.

(3-1-6) Tổng hợp P-9:

P-8 (490 mg, 0,231 mmol), suxinic anhydrit (69 mg, 0,693 mmol) và 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 68 mg, 0,554 mmol) được trộn và được hòa tan trong 2,3 ml diclometan, và bổ sung bằng diisopropyletylamin (DIEA, 149 mg, 1,155 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ 25°C trong 21 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được bổ sung bằng 50 ml diclometan để pha loãng và sau đó được rửa bằng 100 ml trietylamin phosphat 0,5 M. Pha nước đã tách được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được đưa vào quá trình tinh chế cột. Cột được nạp đầy 80 g silica gel pha thường (200-300 mesh), bổ sung bằng 1% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel và được cân bằng bằng diclometan, và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan chứa 1‰ khối lượng trietylamin: metanol = 100:18-100:20. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được toàn bộ 200 mg sản phẩm tinh khiết P-9 phân tử liên hợp. MS m/z: C106H153N10O41, [M-DMTr]+, tính toán: 1921,05, đo: 1920,97.

(3-1-7) Tổng hợp P-10:

P-10 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong bước (1-1-9) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ: phân tử liên hợp P-9 được sử dụng để thay thế phân tử liên hợp L-9, nhờ đó thu được phân tử liên hợp P-9 được liên kết với giá đỡ pha rắn.

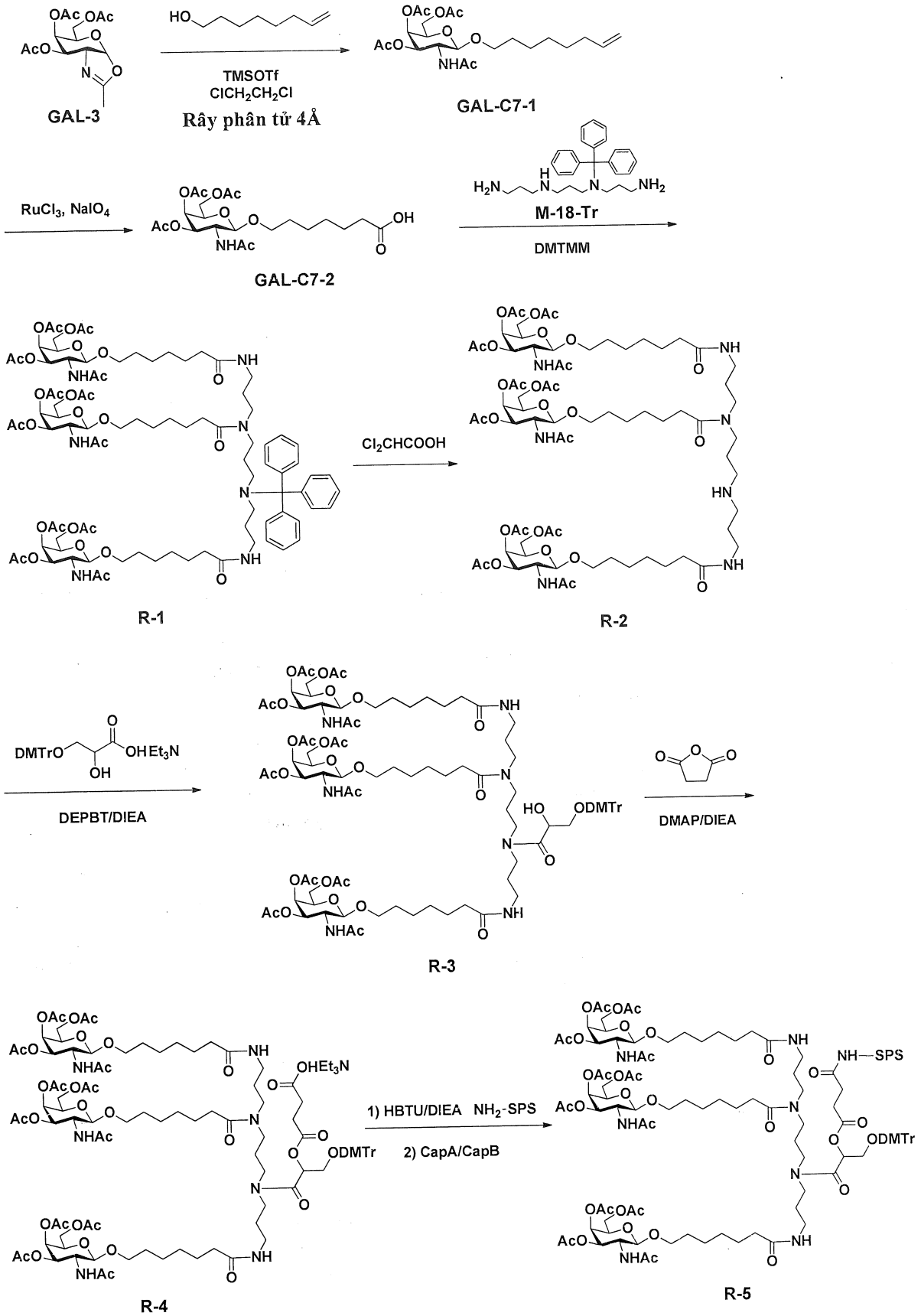
(3-2) Tổng hợp thể liên hợp P10-siHBa1M1SVP

Thể liên hợp 27 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong các bước (1-2), (1-3A) và (1-4) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ hợp chất P-10 được sử dụng để thay thế hợp chất L-10 để bắt đầu tổng hợp chuỗi có nghĩa. Dự kiến có thể thu được liên hợp P10-siHBa1M1SVP với cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (4).

Ví dụ điều chế 4: Điều chế thể liên hợp R5-siHBa1M1SVP (thể liên hợp 28)

(4-1) Tổng hợp hợp chất R-5

Hợp chất R-5 được tổng hợp bằng phương pháp sau:



(4-1-1) Tổng hợp GAL-C7-1

GAL-3 (26,4 g, 80,2 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả trong bước (1-1-1b) được hòa tan trong 134 ml 1,2-dicloetan khan, và bổ sung bằng 60 g bột rây phân tử 4Å sau đó bằng 7-octen-1-ol (11,3 g, 88,2 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Trimetylsilyl triflorometansulphonat (8,9 g, 40,1 mmol) được bổ sung trong bể đá và khí nitơ để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Bột rây phân tử 4Å được loại bỏ bằng cách lọc. 500 ml dung dịch natri bicacbonat nước bão hòa được bổ sung vào phần lọc để rửa. Pha hữu cơ được tách. Pha nước được chiết một lần bằng 100 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp và được rửa 1 lần bằng 250 ml nước muối bão hòa. Pha hữu cơ được tách và được làm khô bằng natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm đến khô để thu được 33,3 g sản phẩm GAL-C7-1 dưới dạng xirô màu vàng, được sử dụng trực tiếp trong phản ứng oxy hóa tiếp theo không cần tinh chế.

(4-1-2) Tổng hợp GAL-C7-2

GAL-C7-1 (33,3 g, 72,8 mmol) thu được trong bước (4-1-1) được hòa tan trong dung môi hỗn hợp 160 ml diclometan và 160 ml axetonitril, bổ sung bằng 216 ml nước và natri periodat rắn (62,3 g, 291,2 mmol) tương ứng, được khuấy trong bể nước đá trong 10 phút, và bổ sung bằng chất xúc tác ruteni triclorua (498 mg, 2,4 mmol). Phản ứng được làm ấm tự nhiên đến nhiệt độ phòng và khuấy bằng 23 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được pha loãng bằng cách bổ sung 200 ml nước trong khi khuấy, và điều chỉnh đến pH 7,5 bằng cách bổ sung natri bicacbonat bão hòa. Pha hữu cơ được keo hóa và được loại bỏ. Pha nước được chiết 3 lần, mỗi lần bằng diclometan. Pha hữu cơ thu được từ chất chiết được loại bỏ. Pha nước thu được từ việc chiết được điều chỉnh đến độ pH bằng khoảng 3 bằng chất rắn axit xitric và được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 200 ml diclometan, và pha hữu cơ thu được được kết hợp và được làm khô bằng natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột (200-300 mesh silica gel pha thường, bằng cách giải hấp gradien diclometan: metanol = 100:18 - 100:20) để thu được 22,4 g sản phẩm GAL-C7-2 dưới dạng chất rắn bọt trắng. MS m/z: C21H32NO11, $[M+H]^+$, tính toán: 476,50, đo: 475,94.

(4-1-3) Tổng hợp R-1:

M-18-Tr (2,02 g, 4,69 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả trong bước (1-1-4) và GAL-C7-2 (7,36 g, 15,48 mmol) được trộn và được hòa tan trong 47 ml axetonitril, bổ sung bằng N-metylmorpholin (3,13 g, 30,96 mmol) sau đó bằng 4-(4,6-dimetoxytriazin-2-yl)-4-metylmorpholin hydroclorua (DMTMM, 4,28 g, 15,48 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được pha loãng bằng 200 ml diclometan. Pha hữu cơ được rửa bằng 100 ml dung dịch natri bicacbonat bão hòa và 100 ml nước muối bão hòa, tương ứng. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan, và được lọc. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô, được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh). Cột được nạp bằng ete dầu mỏ, bổ sung bằng 1% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel, và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan: metanol = 100:5 - 100:7. Dịch rửa giải được kết hợp và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 7,82 g sản phẩm tinh khiết R-1.

(4-1-4) Tổng hợp R-2:

R-1 (6,23 g, 3,456 mmol) được hòa tan trong 69 ml diclometan, và bổ sung bằng axit dicloaxetic (13,367 g, 103,67 mmol) để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được pha loãng bằng cách bổ sung 100 ml diclometan, được rửa và điều chỉnh đến pH 7-8 bằng dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã tách được chiết 6 lần, mỗi lần bằng 30 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan, và được lọc. Sau đó dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh). Cột được bổ sung bằng 10% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel và được cân bằng bằng 1‰ khối lượng trietylamin, và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan: metanol = 100:30-100:40. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 4,49 g sản phẩm tinh khiết R-2.

(4-1-5) Tổng hợp R-3:

R-2 (2,391 g, 1,532 mmol) và A-1 (2,342 g, 4,596 mmol) được trộn và được hòa tan trong 16 ml diclometan, và bổ sung bằng 3-(dietoxyphosphoryloxy)-1,2,3 -benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT, 1,375 g, 4,596 mmol) sau đó bằng diiso propyletylamin (1,188 g, 9,191 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ 25°C trong 2 giờ. Pha hữu cơ được rửa bằng 10 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã tách được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan. Pha hữu cơ được rửa bằng 10 ml nước muối bão hòa. Pha nước đã tách được chiết hai lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan, và pha hữu cơ thu được được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan và được lọc. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không qua đêm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được đưa vào quá trình tinh chế cột. Cột được nạp đầy 120 g silica gel pha thường (200-300 mesh), bổ sung bằng 20 ml trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel và được cân bằng bằng ete dầu mỏ chứa 1% khối lượng trietylamin, và được rửa giải bằng giải hấp gradien của ete dầu mỏ: etyl axetat: diclometan: N,N-dimetylformamit = 1:1:1:0,5 - 1:1:1:0,6. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 2,642 g sản phẩm tinh khiết R-3.

(4-1-6) Tổng hợp R-4:

R-3 (795mg, 0,4074mmol), suxinic anhydrit (82 mg, 0,8148 mmol) và 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 100 mg, 0,8148 mmol) được trộn và được hòa tan trong 4 ml diclometan, và bổ sung bằng diisopropyletylamin (DIEA, 100mg, 0,8148 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ 25°C trong 18 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được rửa bằng 5 ml trietylamin phosphat 0,5 M. Pha nước được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 5 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được đưa vào quá trình tinh chế cột. Cột được nạp đầy 30 g silica gel pha thường (200-300 mesh), bổ sung bằng 1% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel và được cân bằng bằng diclometan, và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan chứa 1‰ khối lượng trietylamin: metanol = 100:18-100:20. Dịch rửa giải được kết hợp, và

dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 505 mg sản phẩm tinh khiết của phân tử liên hợp R-4.

(4-1-7) Tổng hợp R-5

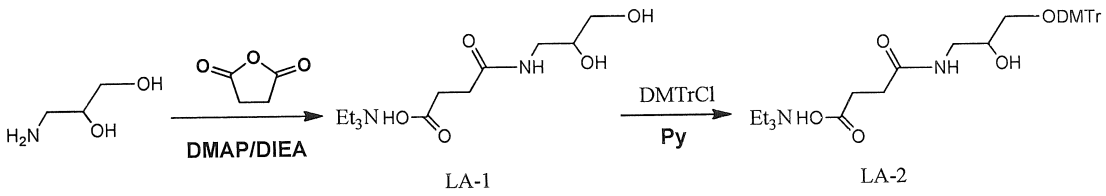
R-5 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong bước (1-1-9) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ: phân tử liên hợp R-4 được sử dụng để thay thế phân tử liên hợp L-9, nhờ đó thu được phân tử liên hợp R-4 được liên kết với giá đỡ pha rắn.

(4-2) Tổng hợp thể liên hợp R5-siHBa1M1SVP

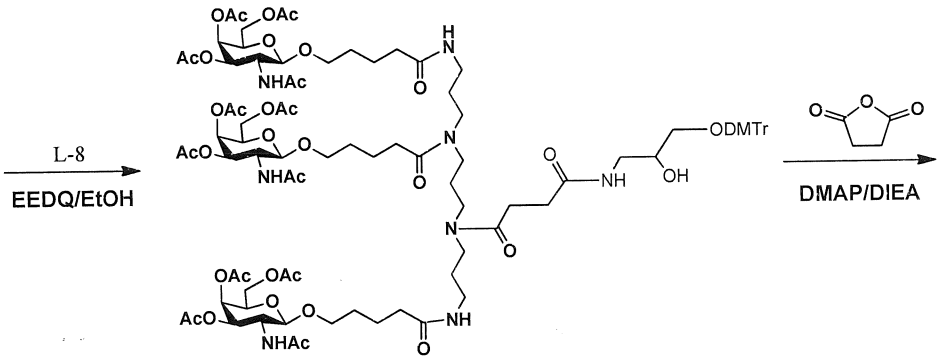
Thể liên hợp 28 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong các bước (1-2), (1-3A) và (1-4) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ hợp chất R-5 được sử dụng để thay thế hợp chất L-10 để bắt đầu tổng hợp chuỗi có nghĩa. Được dự kiến rằng thể liên hợp R5-siHBa1M1SVP với cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (7) có thể thu được.

Ví dụ điều chế 5: Điều chế LA5-siHBa1M1SVP (thể liên hợp 29)

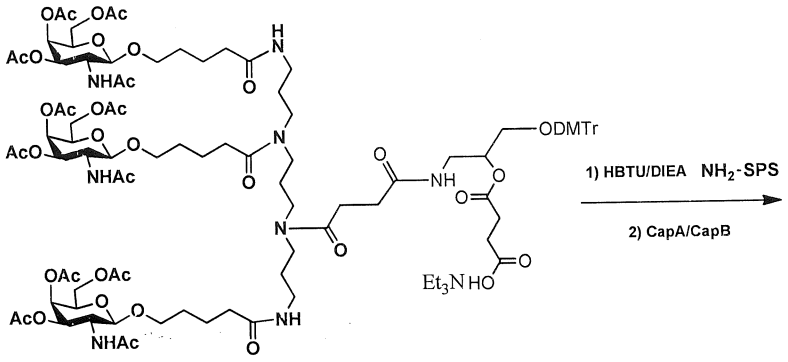
Được dự kiến rằng hợp chất LA-5 có thể được tổng hợp theo quy trình sau:



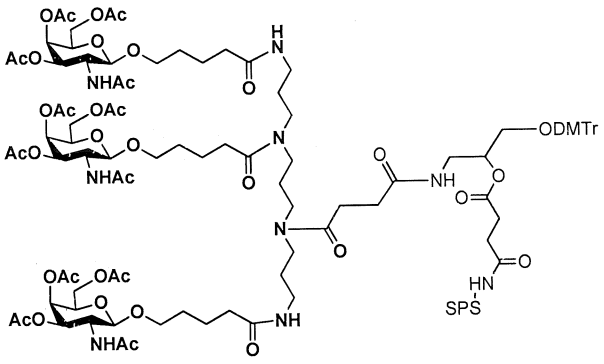
LA-1 LA-2



LA-3



LA-4



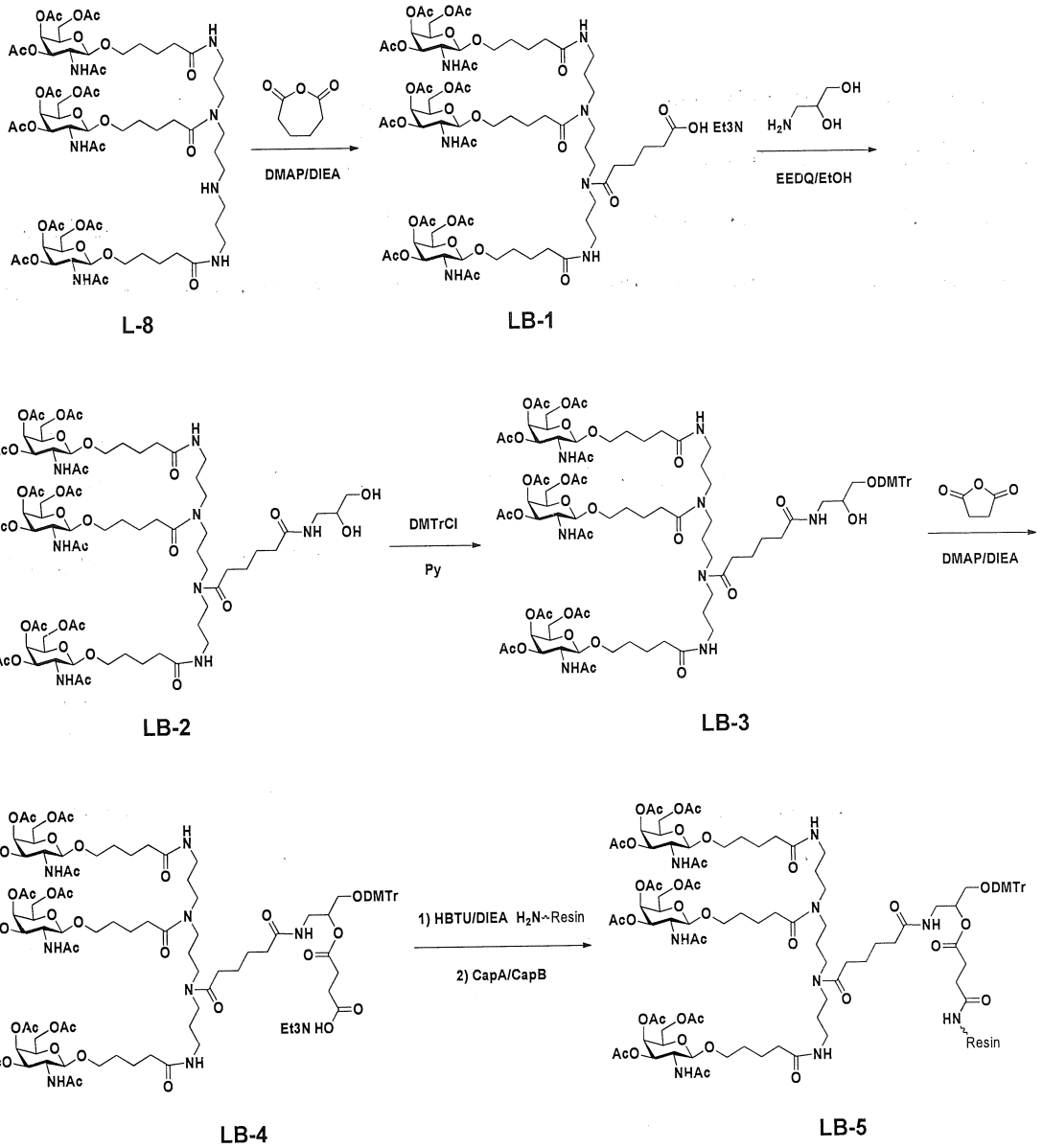
LA-5

Thể liên hợp 29 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong các bước (1-2), (1-3A) và (1-4) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ hợp chất LA-5 được sử dụng để thay thế hợp chất L-10 để bắt đầu tổng hợp chuỗi có nghĩa. Được dự kiến rằng thể liên hợp LA5-siHBa1M1SVP với cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (12) có thể thu được.

Ví dụ điều chế 6: Điều chế thể liên hợp LB5-siHBa1M1SVP (thể liên hợp 30)

(6-1) Tổng hợp hợp chất LB-5

Hợp chất LB-5 được tổng hợp theo quy trình sau:



(6-1-1) Tổng hợp LB-1:

L-8 (5,0g, 3,386mmol) thu được theo phương pháp được mô tả trong bước (1-1-6), adipic anhydrit (870 mg, 6,772 mmol) và 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 827 mg, 6,772 mmol) được trộn và được hòa tan trong 130 ml diclometan, và bổ sung bằng diisopropyletylamin (DIEA, 2,2 g, 16,931 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ 25°C trong 4 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được bổ sung bằng 70 ml diclometan

để pha loãng và sau đó được rửa bằng trietylamin phosphat 0,5 M. Pha nước đã tách được chiết 4 lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được đưa vào quá trình tinh chế cột. Cột được nạp đầy 120 g silica gel pha thường (200-300 mesh), bổ sung bằng 1% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel và được cân bằng bằng diclometan, và được rửa giải bằng giải hấp gradien của ete dầu mỏ: etyl axetat: diclometan: metanol = 1:1:1:0,2 - 1:1:1:1. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 4,267 g sản phẩm tinh khiết LB-1.

(6-1-2) Tổng hợp LB-2:

LB-1 (4,697 g, 2,753 mmol, tổ hợp của 2 mẻ) thu được theo phương pháp được mô tả trong bước (6-1-1), 3-amino-1,2-propandiol (313 mg, 3,442 mmol), 4-(4,6-dimetoxytriazin-2-yl)-4-metylmorpholin hydroclorua (DMTMM, 953mg, 3,442mmol) và N-metylmorpholin (700 mg, 6,884 mmol) được bổ sung liên tục vào hỗn hợp chứa 30 ml axetonitril và 3 ml metanol để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Dung môi được làm bay hơi đến khô, và phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột (200-300 mesh silica gel pha thường, bằng cách giải hấp gradien diclometan: metanol = 1:0,07 - 1:0,5). Dịch rửa giải được kết hợp và được cô để loại bỏ dung môi để thu được 3,27 g sản phẩm đích LB-2.

(6-1-3) Tổng hợp LB-3:

LB-2 (2,27 g, 1,353 mmol) được hòa tan trong 14 ml pyridin khan, và bổ sung bằng 4,4'-dimetoxytrityl clorua (688 mg, 2,03mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Phản ứng được dập tắt bằng cách bổ sung 150 ml metanol. Dung môi được làm bay hơi đến khô, và phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột (200-300 mesh silica gel pha thường, bằng cách giải hấp gradien diclometan: metanol = 1:0,05 - 1:0,2). Dịch rửa giải được kết hợp và được cô để loại bỏ dung môi để thu được 1,647 g sản phẩm đích LB-3.

(6-1-4) Tổng hợp LB-4:

LB-3 (822 mg, 0,415 mmol), suxinic anhydrit (83 g, 0,83 mmol) và 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 102 mg, 0,83 mmol) được trộn và được hòa tan trong 4 ml diclometan, bổ sung bằng DIEA (270 mg, 2,075 mmol), và được khuấy ở nhiệt độ 25°C để phản ứng qua đêm. Dung dịch phản ứng thu được được rửa bằng trietylamin phosphat 0,5 M 3 lần. Pha nước đã tách được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 2 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được đưa vào quá trình tinh chế cột. Cột được nạp đầysilica gel pha thường (200-300 mesh), bổ sung bằng 5% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel và được cân bằng bằng ete dầu mỏ, và được rửa giải bằng giải hấp gradien của 1‰ khối lượng diclometan chứa trietylamin: metanol = 100:5 - 100:20. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 787 mg sản phẩm tinh khiết phân tử liên hợp LB-4.

(6-1-5) Tổng hợp LB-5

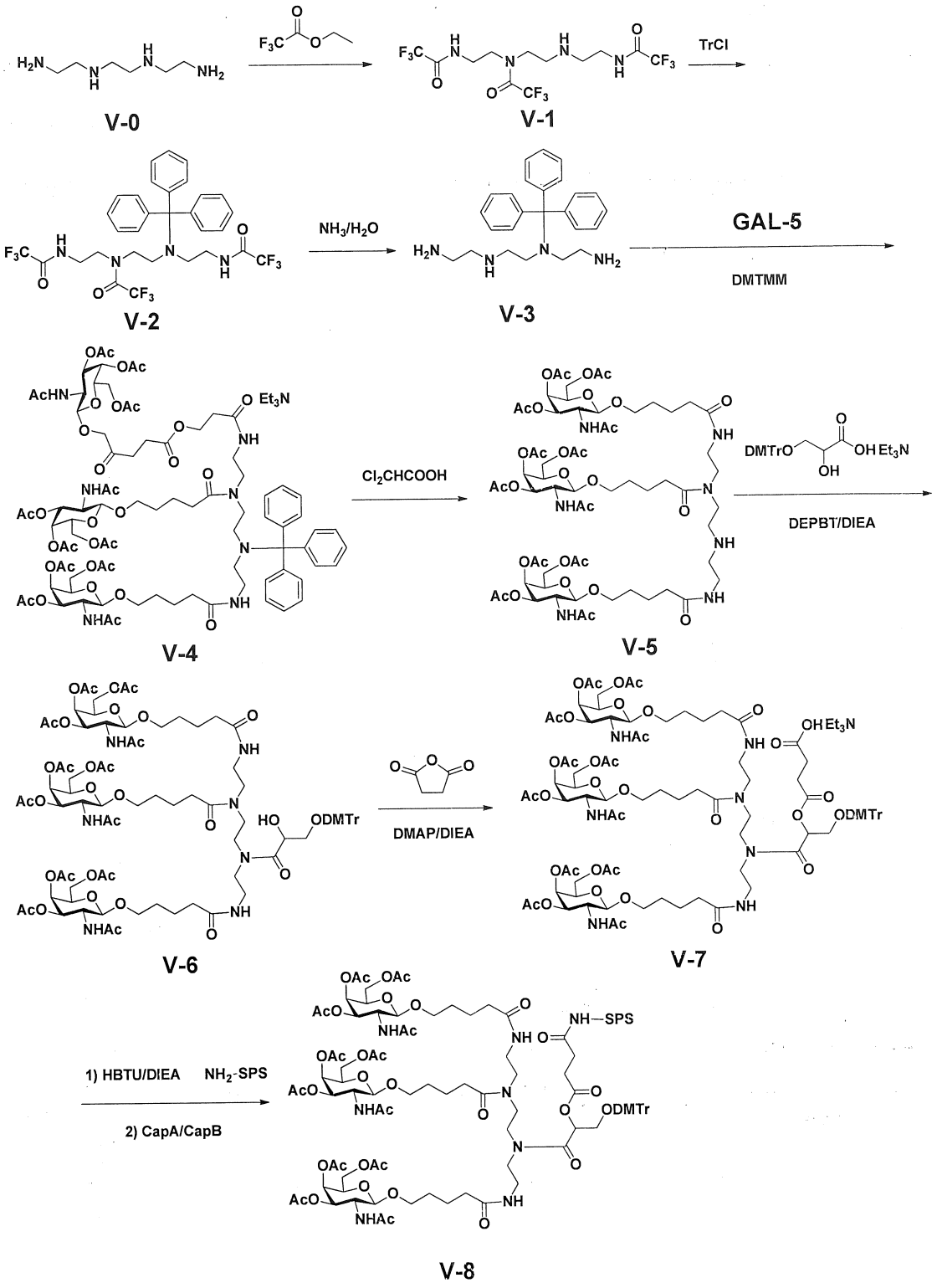
LB-5 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong bước (1-1-9) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ: phân tử liên hợp LB-4 được sử dụng để thay thế phân tử liên hợp L-9, nhờ đó thu được phân tử liên hợp LB-4 được liên kết với giá đỡ pha rắn.

(6-2) Tổng hợp thể liên hợp LB5-siHBa1M1SVP

Thể liên hợp 30 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong các bước (1-2), (1-3A) và (1-4) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ hợp chất LB-5 được sử dụng để thay thế hợp chất L-10 để bắt đầu tổng hợp chuỗi có nghĩa. Được dự kiến rằng thể liên hợp LB5-siHBa1M1SVP với cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (13) có thể thu được.

Ví dụ điều chế 7: Điều chế thể liên hợp V8-siHBa1M1SVP (thể liên hợp 31)

Được dự kiến rằng hợp chất V-8 có thể được tổng hợp theo quy trình sau:

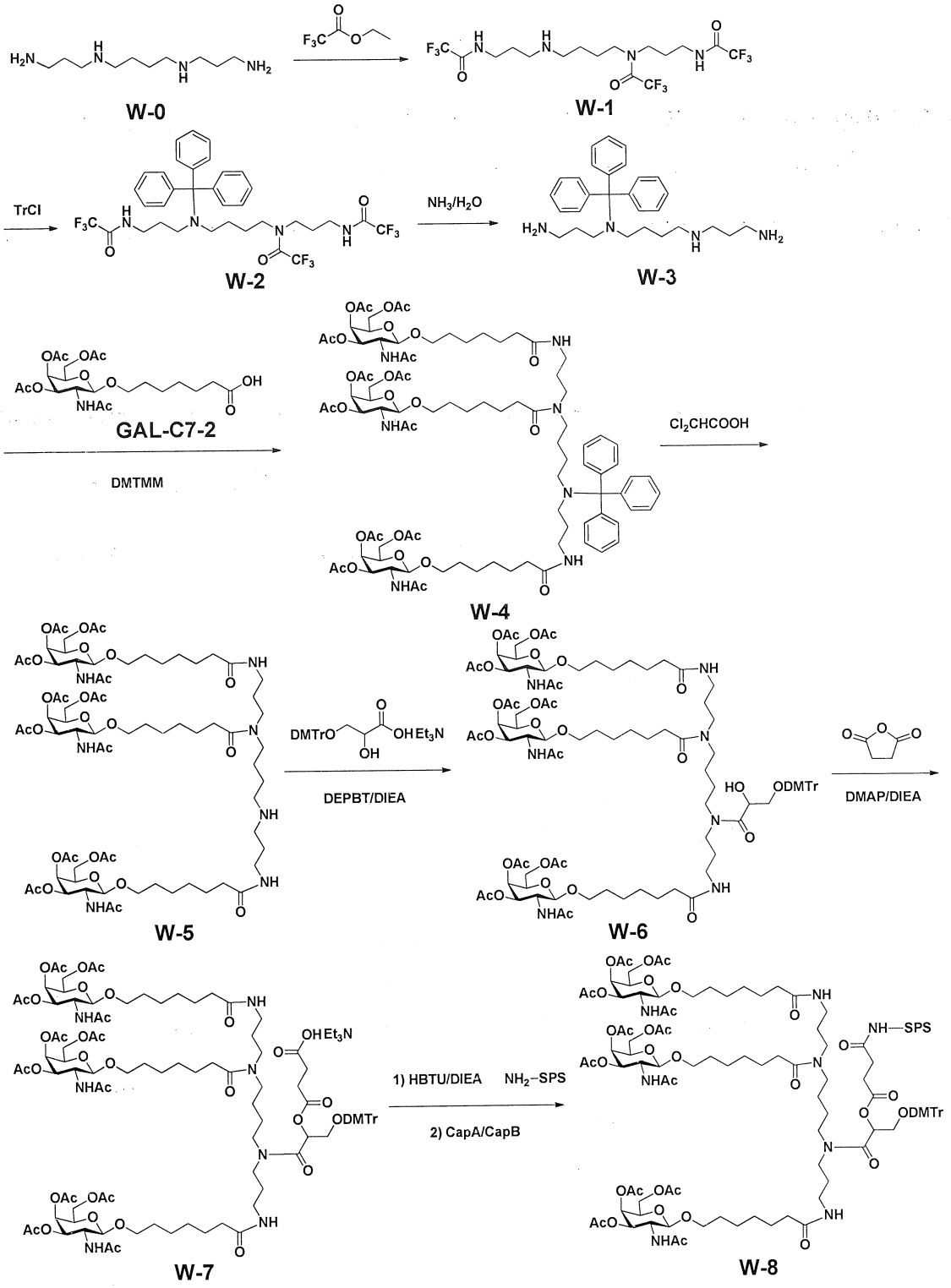


Thể liên hợp 31 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong các bước (1-2), (1-3A) và (1-4) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ hợp chất V-8 được sử dụng để thay thế hợp chất L-10 để bắt đầu tổng hợp chuỗi có nghĩa. Được dự kiến rằng thể liên hợp V8-siHBa1M1SVP với cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (14) có thể thu được.

Ví dụ điều chế 8: Điều chế thể liên hợp W8-siHBa1M1SVP (thể liên hợp 32)

(8-1) Tổng hợp hợp chất W-8

Hợp chất W-8 được tổng hợp theo quy trình sau:



(8-1-1) Tổng hợp W-1:

W-0 (2,024 g, 10 mmol) được hòa tan trong 25 ml axetonitril, bổ sung bằng trietylamin (4,048 g, 40 mmol), và được làm lạnh đến khoảng 0°C trong bể nước đá. Etyl trifloaxetat (5,683 g, 40 mmol) được bổ sung vào phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 22 giờ. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không trong 18 giờ để thu được 5,835 g sản phẩm rắn thô W-1.

(8-1-2) Tổng hợp W-2:

Sản phẩm thô W-1 (5,835 g, 10 mmol) được hòa tan trong 50 ml diclometan. Dung dịch phản ứng thu được được bổ sung bằng TrCl (3,345 g, 12 mmol) và trietylamin (1,518 g, 15 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được rửa hai lần, mỗi lần bằng 20 ml natri bicacbonat bão hòa và 1 lần bằng 20 ml nước muối bão hòa. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan và được lọc. Dung môi hữu cơ được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không qua đêm để thu được 8,012 g sản phẩm rắn thô W-2. Sản phẩm rắn thô W-2 được sử dụng trong phản ứng khử bảo vệ tiếp theo không cần xử lý.

(8-1-3) Tổng hợp W-3:

Sản phẩm thô W-2 (8,012 g, 10 mmol) được hòa tan trong 100 ml metanol, và bổ sung bằng 100 ml dung dịch metylamin nước (40% khối lượng) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ 50°C trong 23 giờ. Các hạt không hòa tan được được loại bỏ bằng cách lọc. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn được bổ sung bằng 200 ml dung dịch đã trộn chứa DCM: metanol theo tỷ lệ thể tích là 1:1, và pha hữu cơ thu được được rửa bằng 50 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã tách được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 50 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan và được lọc. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không qua đêm, và được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh). Cột được nạp bằng ete dầu mỏ, bổ sung bằng 1% khối lượng trietylamin để trung

hòa độ axit của silica gel, và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan: metanol: amoniac chứa nước (25% khối lượng) = 1:1:0,05 - 1:1:0,25. Dịch rửa giải được kết hợp. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không để thu được 3,062 g sản phẩm tinh khiết W-3.

(8-1-4) Tổng hợp W-4:

W-3 (0,675 g, 1,517 mmol) và GAL-C7-2 (2,60 g, 5,46 mmol) được trộn và được hòa tan trong 47 ml axetonitril, bổ sung bằng diisopropyletylamin (1,57 g, 12,14 mmol) sau đó bằng 3-(dietoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT, 1,816 g, 6,04 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2,5 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được pha loãng bằng 100 ml diclometan. Pha hữu cơ thu được được rửa bằng 80 ml dung dịch natri bicacbonat bão hòa và 80 ml nước muối bão hòa, tương ứng. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan, và được lọc. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô, được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh). Cột được nạp bằng ete dầu mỏ, bổ sung bằng 1% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel, và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan: metanol = 100:5 - 100:7. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 1,610 g sản phẩm tinh khiết W-4.

(8-1-5) Tổng hợp W-5:

W-4 (1,61 g, 0,886 mmol) được hòa tan trong 125 ml diclometan, và bổ sung bằng axit dicloaxetic (3,5 ml, 42,43 mmol) để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được trung hòa bằng cách bổ sung 150 ml pyridin. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh). Cột được bổ sung bằng 10% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel, được cân bằng bằng 1‰ khối lượng trietylamin và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan: metanol = 100:30 - 100:40. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được

loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 1,26 g sản phẩm tinh khiết W-5.

(8-1-6) Tổng hợp W-6:

W-5 (1,25 g, 0,793 mmol) và A-1 (1,21 g, 2,38 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả trong bước (1-1-7a) được trộn và được hòa tan trong 12 ml diclometan, và bổ sung bằng 3-(dietoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT, 0,712 g, 2,38 mmol) sau đó bằng diisopropyletylamin (0,615 g, 4,76 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ 25°C trong 3 giờ. Pha hữu cơ được rửa bằng 80 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã tách được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp và được rửa bằng 10 ml nước muối bão hòa. Pha hữu cơ thu được được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan và được lọc. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không qua đêm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được đưa vào quá trình tinh chế cột. Cột được nạp đầy 185 g silica gel pha thường (200-300 mesh), bổ sung bằng 20 ml trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel, được cân bằng bằng ete dầu mỏ chứa 1% khối lượng trietylamin và được rửa giải bằng giải hấp gradien của ete dầu mỏ: etyl axetat: diclometan: N,N-dimetylformamit = 1:1:1:0,1 - 1:1:1:0,7. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 1,57 g sản phẩm tinh khiết W-6.

(8-1-7) Tổng hợp W-7:

W-6 (1,238 g, 0,63 mmol), suxinic anhydrit (0,189 g, 1,89 mmol) và 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 0,231 g, 1,89 mmol) được trộn và được hòa tan trong 7 ml diclometan, và bổ sung bằng DIEA (0,407 g, 3,15 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ 25°C trong 24 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được rửa bằng 5 ml trietylamin phosphat 0,5 M. Pha nước đã tách được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 5 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được đưa vào quá trình tinh chế cột. Cột được nạp đầy 30 g silica gel pha thường (200-300 mesh), bổ sung

bằng 1% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel, được cân bằng bằng diclometan và được rửa giải bằng giải hấp gradien của 1‰ khối lượng diclometan chứa trietylamin: metanol = 100:18 - 100:20. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 1,033 g sản phẩm tinh khiết phân tử liên hợp W-7. MS m/z: C101H146N7O38, [M-DMTr]+, tính toán: 1763,92, đo: 1763,21.

(8-1-8) Tổng hợp W-8

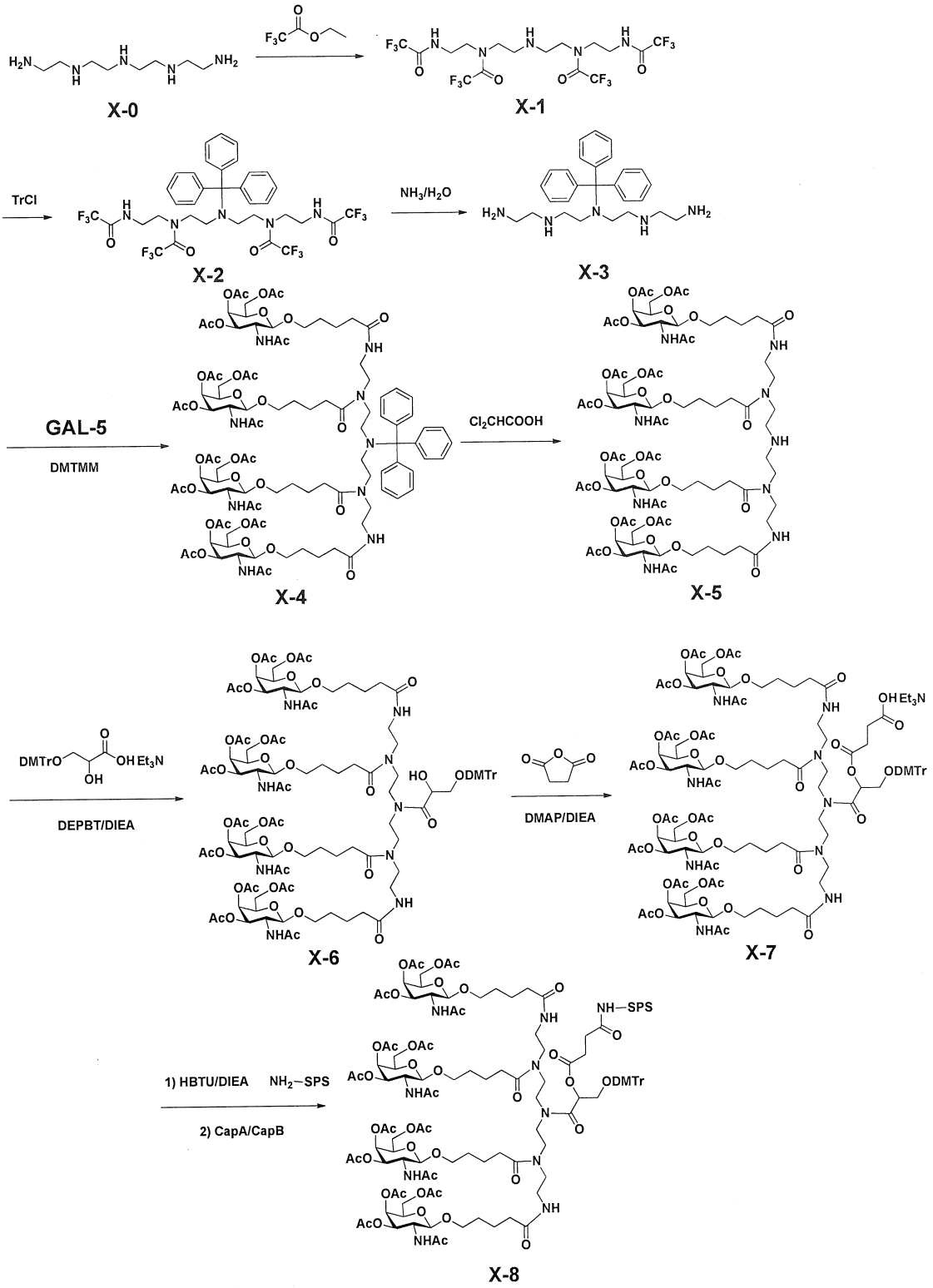
W-8 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong bước (1-1-9) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ: W-7 phân tử liên hợp được sử dụng để thay thế phân tử liên hợp L-9, nhờ đó thu được W-7 phân tử liên hợp được liên kết với giá đỡ pha rắn.

(8-2) Tổng hợp thể liên hợp W8-siHBa1M1SVP

Thể liên hợp 32 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong các bước (1-2), (1-3A) và (1-4) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ W-8 Hợp chất được sử dụng để thay thế hợp chất L-10 để bắt đầu tổng hợp chuỗi có nghĩa. Được dự kiến rằng thể liên hợp W8-siHBa1M1SVP với cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (15) có thể thu được.

Ví dụ điều chế 9: Điều chế thể liên hợp X8-siHBa1M1SVP (thể liên hợp 33)

Được dự kiến rằng hợp chất X-8 có thể được tổng hợp theo quy trình sau:

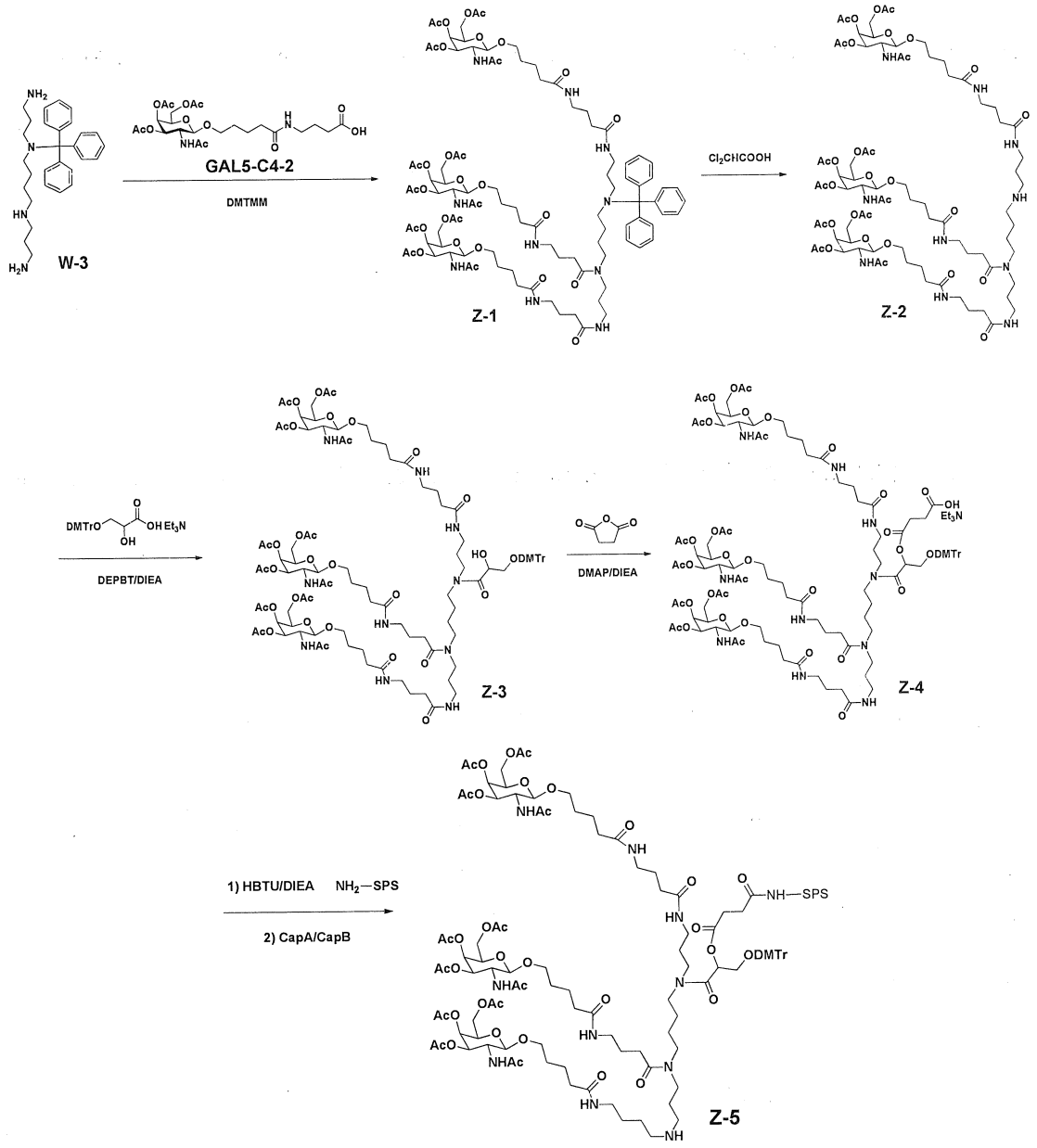


Thể liên hợp 33 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong các bước (1-2), (1-3A) và (1-4) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ hợp chất X-8 được sử dụng để thay thế hợp chất L-10 để bắt đầu tổng hợp chuỗi có nghĩa. Được dự kiến rằng thể liên hợp X8-siHBa1M1SVP với cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (21) có thể thu được.

Ví dụ điều chế 10: Điều chế thể liên hợp Z5-siHBa1M1SVP (thể liên hợp 34)

(10-1) Tổng hợp hợp chất Z-5

Hợp chất Z-5 được tổng hợp theo quy trình sau:



(10-1-1) Tổng hợp Z-1:

W-3 (1,50 g, 3,37 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả trong bước (8-1-3) và GAL5-C4-2 (7,18 g, 13,48 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả trong bước (3-1-2) được trộn và được hòa tan trong 34 ml diclometan, và bổ sung bằng diisopropyletylamin (3,48 g, 26,96 mmol) sau đó bằng 3-(dietoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT, 4,04 g, 13,48 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở

nhiệt độ phòng trong 4,5 giờ. Dung dịch lỏng thu được được pha loãng bằng 100 ml diclometan. Pha hữu cơ được rửa bằng 80 ml dung dịch natri bicacbonat bão hòa và 80 ml nước muối bão hòa, tương ứng. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, được làm khô bằng natri sulfat khan, và được lọc. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô, được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel pha thường (200-300 mesh). Cột được nạp bằng ete dầu mỏ, bổ sung bằng 1% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel, và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan: metanol = 30:1 - 15:1. Dịch rửa giải được kết hợp và được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 3,97 g sản phẩm tinh khiết Z-1. MS m/z: C98H143N10O33, [M+H]+, tính toán: 1987,98, đo: 1987,90.

(10-1-2) Tổng hợp Z-2:

Z-1 (3,97 g, 2,00 mmol) được hòa tan trong 250 ml diclometan, và bổ sung bằng axit dicloaxetic (10,941 g, 84,85 mmol) để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Pyridin được bổ sung để trung hòa dung dịch phản ứng thu được để trung hòa. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Cột được tải bằng 220 g 200-300 mesh silica gel pha thường, và bổ sung bằng 10% khối lượng pyridin để trung hòa độ axit của silica gel, được cân bằng bằng 1‰ khối lượng pyridin và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan: metanol = 10:1 - 2:1. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 3,49 g sản phẩm tinh khiết Z-2. MS m/z: C79H129N10O33, [M+H]+, tính toán: 1746,94, đo: 1746,90.

(10-1-3) Tổng hợp Z-3:

Z-2 (3,49 g, 2,0 mmol) và A-1 (3,06 g, 6,0 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả trong bước (1-1-7a) được trộn và được hòa tan trong 30 ml diclometan, và bổ sung bằng 3-(dietoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT, 1,80 g, 6,0 mmol) sau đó bằng diisopropyletylamin (1,55 g, 12,0 mmol) để phản ứng trong 3 giờ trong khi khuấy ở nhiệt độ 25°C. Dung dịch phản ứng thu được được bổ sung bằng 100 ml diclometan để pha loãng. Pha hữu cơ được rửa hai lần bằng 30 ml natri

bicacbonat bão hòa. Pha nước được chiết bằng 10 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp và được rửa bằng 50 ml nước muối bão hòa. Pha hữu cơ thu được được kết hợp và được làm khô bằng natri sulfat khan, và được lọc. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn được làm khô bằng bọt trong bơm dầu chân không qua đêm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được đưa vào quá trình tinh chế cột. Cột được nạp đầy 200 g silica gel pha thường (200-300 mesh), bổ sung bằng 20 ml trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel. Cột được cân bằng bằng ete dầu mỏ chứa 1% khối lượng trietylamin và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan: metanol = 25:1 - 15:1. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 2,2 g sản phẩm tinh khiết Z-3. MS m/z: C103H151N10O38, [M+H]+, tính toán: 2136,02, đo: 2136,20.

(10-1-4) Tổng hợp Z-4:

Z-3 (2,10 g, 0,983 mmol) được hòa tan trong 14,8 ml diclometan chứa DIEA (0,635g, 4,915 mmol), 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 240 mg, 1,966 mmol) được bổ sung vào dung dịch thu được và được khuấy cho đến khi dung dịch trong. Suxinic anhydrit (197 mg, 1,966 mmol) được bổ sung vào phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ 25°C trong 18 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được bổ sung bằng 50 ml diclometan để pha loãng, và được rửa bằng 80 ml trietylamin phosphat 0,5 M. Pha nước được chiết hai lần, mỗi lần bằng 50 ml diclometan. Toàn bộ pha hữu cơ được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được đưa vào quá trình tinh chế cột. Cột được nạp đầy 188 g silica gel pha thường (200-300 mesh), bổ sung bằng 1% khối lượng trietylamin để trung hòa độ axit của silica gel, được cân bằng bằng diclometan và được rửa giải bằng giải hấp gradien diclometan chứa 1‰ khối lượng trietylamin: metanol = 10:1 - 3:1. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 1,95 g sản phẩm tinh khiết phân tử liên hợp Z-4. MS m/z: C107H155N10O41, [M+H]+, tính toán: 1935,07, đo: 1935,29.

(10-1-5) Tổng hợp Z-5

Z-5 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong bước (1-1-9) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ: phân tử liên hợp Z-4 được sử dụng để thay thế phân tử liên hợp L-9, nhờ đó thu được phân tử liên hợp Z-4 được liên kết với giá đỡ pha rắn.

(10-2) Tổng hợp thể liên hợp Z5-siHB1M1SVP

Thể liên hợp 34 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như trong bước (1-2), (1-3A) và (1-4) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ hợp chất Z-5 được sử dụng để thay thế hợp chất L-10 để bắt đầu tổng hợp chuỗi có nghĩa. Được dự kiến rằng thể liên hợp Z5-siHB1M1SVP với cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (22) có thể thu được.

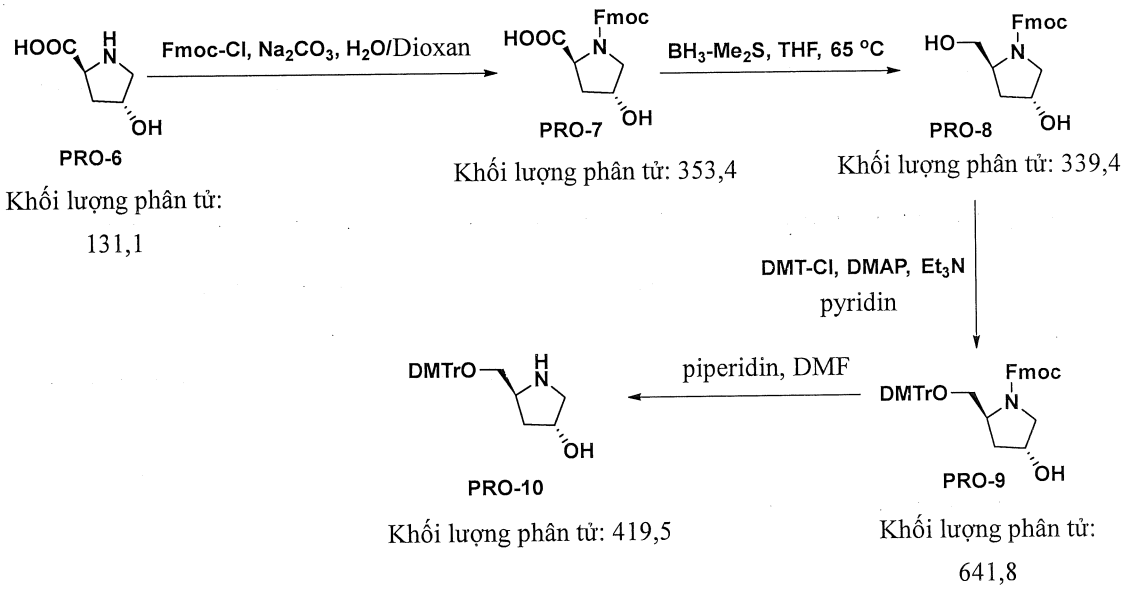
Ví dụ điều chế 11: Ví dụ điều chế này được sử dụng để minh họa điều chế các thể liên hợp 35-49

Trong ví dụ điều chế này, thể liên hợp 35-49 được tổng hợp. Trình tự thể liên hợp siARN trong các thể liên hợp được thể hiện trong bảng 3.

(11-1) Tổng hợp phân tử liên hợp FIN-2

Phân tử liên hợp FIN-2 được tổng hợp bằng cách tham chiếu đến phương pháp điều chế được mô tả trong Rajeev *et al.*, ChemBioChem 2015, 16, 903-908 theo quy trình sau:

(11-1-1) Tổng hợp PRO-10



(11-1-1a) Tổng hợp PRO-7

2,93 g **PRO-6** (L-hydroxyprolin, CAS số: 51-35-4, được mua từ Energy Chemical, 22,4 mmol) được hòa tan trong 22,5 ml 1,4-dioxan (CAS số: 123-91-1) và bổ sung bằng 34 ml (khối lượng/khối lượng) dung dịch Na_2CO_3 chứa nước 10% ở dạng huyền phù. 6,95 g Fmoc-Cl (9-fluorenylmetyl cloroformat, CAS số: 28920-43-6, được mua từ Energy Chemical, 26,8 mmol) được hòa tan trong 34 ml 1,4-dioxan, bổ sung vào huyền phù nêu trên trong bể đá, và được làm ấm tự nhiên đến nhiệt độ phòng để phản ứng qua đêm. Dung dịch phản ứng được rót vào 150 ml nước đá, và được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 100 ml metyl t-butyl ete, và pha hữu cơ thu được được loại bỏ. Pha nước còn lại được điều chỉnh đến pH ≤ 5 bằng axit clohydric được cô, được chiết 2 lần, mỗi lần bằng 100 ml etyl axetat. Pha hữu cơ thu được được kết hợp và được làm khô bằng natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 7,83 g sản phẩm **PRO-7** dưới dạng chất rắn bọt trắng. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,91 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 7,67 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,48–7,39 (m, 2H), 7,38–7,27 (m, 2H), 5,17 (s, 1H), 4,27 (s, 2H), 4,23–4,11 (m, 2H), 3,55–3,41 (m, 3H), 2,31–2,10 (m, 1H), 2,08–1,88 (m, 1H). HRMS (ESI) m/z tính toán. for $C_{20}H_{19}NO_5$ [M-H]- 352,1190, đo: 352,1033.

(11-1-1b) Tổng hợp PRO-8

7,83 g **PRO-7** (22,2 mmol) được hòa tan trong 80 ml THF (CAS số: 109-99-9), gia nhiệt đến 65°C trong bể dầu, bổ sung bằng 36,6 ml dung dịch chứa BH_3-Me_2S 2 mol/L trong THF (CAS số 13292-87-0, được mua từ J&K Scientific Ltd., 73,2 mmol) trong điều kiện hồi lưu, và được hồi lưu liên tục để phản ứng trong 3 giờ. Dung dịch phản ứng được rót, và phần rắn còn lại được hòa tan trong metanol. Metanol được bổ sung vào dung dịch phản ứng thu được, trong khi khuấy cho đến khi không có khí phát ra, được khuấy liên tục trong 30 phút. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng ete dầu mỏ 3 lần để thu được 7,1 g sản phẩm **PRO-8** dưới dạng chất rắn màu trắng. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,91 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 7,67 (d, J=7,2 Hz, 2H), 7,49–7,39 (m, 2H), 7,38–7,26 (m, 2H), 5,18 (dd, J = 6,1, 3,8 Hz, 1H), 4,28 (s, 2H), 4,23–4,13 (m, 2H), 3,55–3,38 (m, 2H), 2,32–

2,11 (m, 1H), 2,08–1,89 (m, 1H). HRMS (ESI) m/z, tính toán đối với $C_{20}H_{21}NO_4$ $[M+Na]^+$ 362,1368, đo: 362,1012.

(11-1-1c) Tổng hợp PRO-9

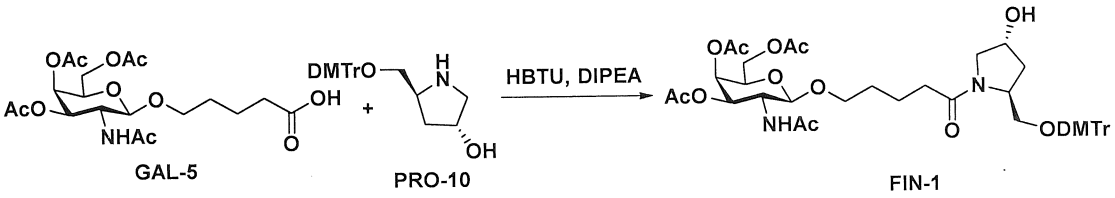
7,1 g **PRO-8** (21 mmol) được hòa tan trong 100 ml pyridin, và bổ sung bằng 14,2 g DMTr-Cl (4,4'-dimetoxytrityl clorua, 42 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 5 giờ. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Sản phẩm thô thu được được hòa tan trong etyl axetat và được lọc để loại bỏ tạp chất muối. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel. Để tinh chế, sản phẩm thô được hòa tan trong DCM được nạp lên cột silica gel được xử lý trước bằng pyridin để kiềm hóa cột. DMTr-Cl được rửa giải bằng DCM chứa 1% (thể tích/thể tích) pyridin, và sau đó sản phẩm được rửa giải bằng etyl axetat. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 8,2 g sản phẩm **PRO-9** dưới dạng chất rắn màu trắng. HRMS (ESI) m/z, tính toán đối với $C_{41}H_{39}NO_6$ $[M+Na]+$ 664,2675, đo: 664,2348; C18 RP-HPLC (Số lô: JJS160324-1); độ tinh khiết: 94,20%.

(11-1-1d) Tổng hợp PRO-10

8,2 g **PRO-9** (12,8 mmol) được hòa tan trong 64 ml DMF và bổ sung bằng 40 ml piperidin (384 mmol) để phản ứng trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Dung dịch phản ứng được rót vào 300 ml nước đá và được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 150 ml etyl axetat. Pha hữu cơ thu được được kết hợp và được rửa bằng 200 ml nước muối bão hòa, và pha hữu cơ thu được từ việc rửa được làm khô bằng natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel. Để tinh chế, sản phẩm thô được hòa tan trong DCM được nạp lên cột silica gel được xử lý trước bằng pyridin để kiềm hóa cột. Fmoc được rửa giải bằng DCM chứa 1% (thể tích/thể tích) pyridin, và sau đó sản phẩm được rửa giải bằng etyl axetat. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 4,65 g sản phẩm **PRO-10** dưới dạng chất rắn màu trắng. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,40 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,35 –

7,18 (m, 7H), 6,93 – 6,84 (m, 4H), 4,56 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 4,12 (s, 1H), 3,74 (s, 6H), 3,46 – 3,37 (m, 1H), 2,88 (ddd, J = 18,5, 10,0, 5,5 Hz, 2H), 2,75 (dd, J = 8,7, 5,8 Hz, 1H), 2,62 (dd, J = 11,0, 2,7 Hz, 1H), 1,74 – 1,65 (m, 1H), 1,40 (ddd, J = 12,9, 8,5, 5,9 Hz, 1H); HRMS (ESI) m/z tính toán đối với $C_{26}H_{29}NO_4$ $[M+Na]^+$ 442,1994, đo: 442,1999; C18 RP-HPLC (Số lô: JJS160329-1), độ tinh khiết: 97,07%.

(11-1-2) Tổng hợp FIN-1



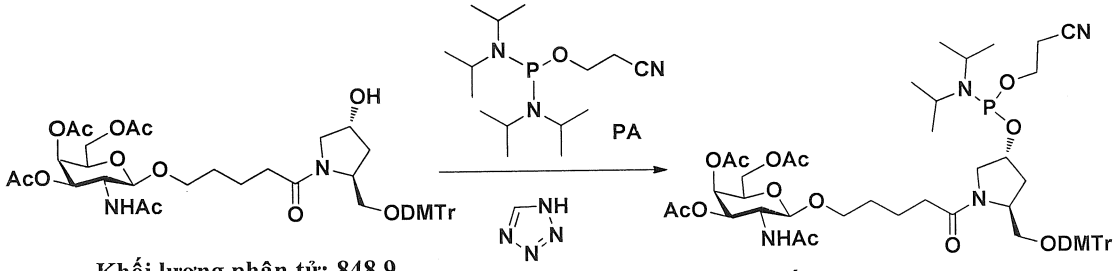
GAL-5 | PRO-10 | FIN-1

Khối lượng phân tử: 447,4 | **Khối lượng phân tử: 419,5** | **Khối lượng phân tử: 848,9**

GAL-5 (4,5 g, 10 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả trong bước (1-1-1) được hòa tan trong 40 ml DMF, bổ sung liên tục bằng 3,9 g DIEA (N,N-diisopropyletylamin, CAS số: 7087-68-5, được mua từ Aladdin Inc., 30 mmol) và 3,8 g HBTU (benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexaflophosphat, CAS số: 94790-37-2, được mua từ Aladdin Inc., 11 mmol), và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. **PRO-10** (4,2 g, 10 mmol) thu được trong bước (11-1-1d) được hòa tan trong 40 ml DMF, và sau đó bổ sung vào dung dịch phản ứng nêu trên. Dung dịch phản ứng thu được được làm khô bằng cách bổ sung natri sulfat khan và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng được rót vào 120 ml nước đá và được chiết 3 lần, mỗi lần bằng 60ml etyl axetat. Pha hữu cơ thu được được kết hợp, được rửa bằng 20 ml nước và 20 ml nước muối bão hòa, tương ứng. Pha hữu cơ thu được từ việc rửa được tách và được làm khô bằng natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng cột silica gel. Để tinh chế, mẫu được nạp lên cột silica gel được xử lý trước bằng pyridin để kiềm hóa cột, và được rửa giải bằng dung dịch diclometan (DCM) chứa 1% (thể tích/thể tích) trietylamin và 1% (thể tích/thể tích) metanol. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 6,5 g sản phẩm **FIN-1** dưới dạng chất rắn có bọt màu vàng nhạt. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,83 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 7,32 (t, J = 6,6 Hz, 4H), 7,20 (td, J = 8,9, 3,5 Hz, 5H), 6,93 – 6,84 (m, 4H), 5,21 (d,

J = 3,2 Hz, 1H), 5,04 – 4,90 (m, 2H), 4,49 (s, 1H), 4,40 (d, J = 4,4 Hz, 0,8H), 4,31 (d, J = 5,0 Hz, 0,2H), 4,15 (s, 1H), 4,03 (s, 3H), 3,93 (s, 1H), 3,74 (s, 7H), 3,59 (dt, J = 12,0, 6,0 Hz, 1H), 3,50 – 3,40 (m, 1H), 3,39 – 3,25 (m, 3H), 3,13 (dd, J = 8,9, 5,2 Hz, 1H), 3,00 (dq, J = 9,3, 5,3, 4,3 Hz, 1H), 2,22 (s, 2H), 2,07 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 1,90 (s, 4H), 1,74 (s, 3H), 1,50 (s, 3H), 1,36 (s, 1H). C18 RP-HPLC (Số lô: LJ160422), độ tinh khiết: 95,45%.

(11-1-3) Tổng hợp FIN-2



FIN-1 (3,0 g, 3,53 mmol) thu được trong bước (11-1-2) và axetonitril được gia nhiệt để khử nước đồng sôi, đưa vào hút làm khô dưới áp suất giảm, được hòa tan trong 10 ml DMF (được làm khô bằng cách ngâm trong rây phân tử), bổ sung bằng 2,13 g PA (bis(diisopropylamino)(2-xyanoetoxy)phosphin, Adamas Inc., số sản phẩm 11356B, 7,06 mmol)) và 346 mg tetrazol (CAS số: 288-94-8, được mua từ Aladdin Inc., 4,94 mmol) dưới khí nitơ, và được khuấy vào phản ứng ở nhiệt độ phòng. Phản ứng được bổ sung bằng 10 ml DMF và được khuấy liên tục để phản ứng trong 1 giờ. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột silica gel. Để tinh chế, sản phẩm thô được hòa tan trong DCM được nạp lên cột silica gel được xử lý trước bằng pyridin để kiềm hóa cột, và được rửa giải bằng etyl axetat. Dịch rửa giải được kết hợp, và dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 4,5 g sản phẩm thô dưới dạng xirô không màu. Sản phẩm thô được hòa tan hoàn toàn trong 50% (thể tích/thể tích) dung dịch axetonitril chứa nước và được tinh chế bằng cách sử dụng cột áp suất trung bình (C-18, 330 g, 300 Å) được xử lý trước bằng dung dịch chứa 1% (thể tích/thể tích) pyridin trong axetonitril để kiềm hóa cột. Đỉnh sản phẩm được kết hợp bằng giải hấp gradien và dung môi được

loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm để thu được 2,2 g sản phẩm phân tử liên hợp **FIN-2** dưới dạng bột màu trắng. ^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 148,04, 147,94, 147,62, 147,19, độ tinh khiết là ^{31}P NMR: 92%; độ tinh khiết là C18 RP-HPLC: 90,54%.

(11-2) Liên kết phân tử liên hợp FIN-2 với giá đỡ pha rắn

Nhóm liên hợp (FIN_FIN_FIN) được liên kết với đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa của ARN bằng cách liên kết phân tử liên hợp FIN-2 thu được trong bước (11-1-3) với giá đỡ pha rắn phổ biến (UnyLinker™ loaded NittoPhase®HL Solid Supports) bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp pha rắn axit nucleic thông qua 3 chu kỳ phản ứng.

Việc liên kết nhóm liên hợp FIN_FIN_FIN được thực hiện theo phương pháp mô tả trong Rajeev et al., Chem Bio Chem 2015, 16, 903-908. Đặc biệt là, nhóm hydroxy bảo vệ được loại bỏ ban đầu khỏi giá đỡ pha rắn phổ biến được đề cập nêu trên và sau đó giá đỡ pha rắn, sau đó được cho tiếp xúc và liên kết với phân tử liên hợp FIN-2 dưới điều kiện phản ứng liên kết với sự có mặt của chất liên kết, và phân tử liên hợp FIN được liên kết với giá đỡ pha rắn thu được sau phản ứng gắn mũ và oxy hóa. Ngoài ra, nhóm bảo vệ hydroxy DMTr được loại bỏ khỏi phân tử liên hợp FIN được liên kết với giá đỡ pha rắn, và giá đỡ pha rắn cũng được tiếp xúc và được liên kết với phân tử liên hợp FIN-2 khác, sau đó bằng phản ứng gắn mũ và oxy hóa. Bằng cách lặp lại các bước nêu trên của khử bảo vệ-liên kết-gắn mũ-oxy hóa, phân tử liên hợp FIN-2 thứ ba được liên kết, và sau đó nhóm liên hợp (FIN_FIN_FIN) được liên kết với giá đỡ pha rắn thu được.

Trong các phản ứng được mô tả nêu trên, các điều kiện phản ứng khử bảo vệ, liên kết, gắn mũ và oxy hóa cũng như lượng dung môi và chất tương tự như được sử dụng trong phương pháp tổng hợp pha rắn axit nucleic được mô tả nêu trên trong bước (1-2).

(11-3) Tổng hợp thể liên hợp 35-49

Thể liên hợp được điều chế bằng phương pháp tương tự như trong các bước (1-2) đến (1-4) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ: 1) hợp chất thu được trong bước (11-2) được sử dụng để bắt đầu tổng hợp chuỗi có nghĩa; và 2) siARN đã liên hợp có trình tự tương ứng với thể liên hợp 35-49 thể hiện trong bảng 3.

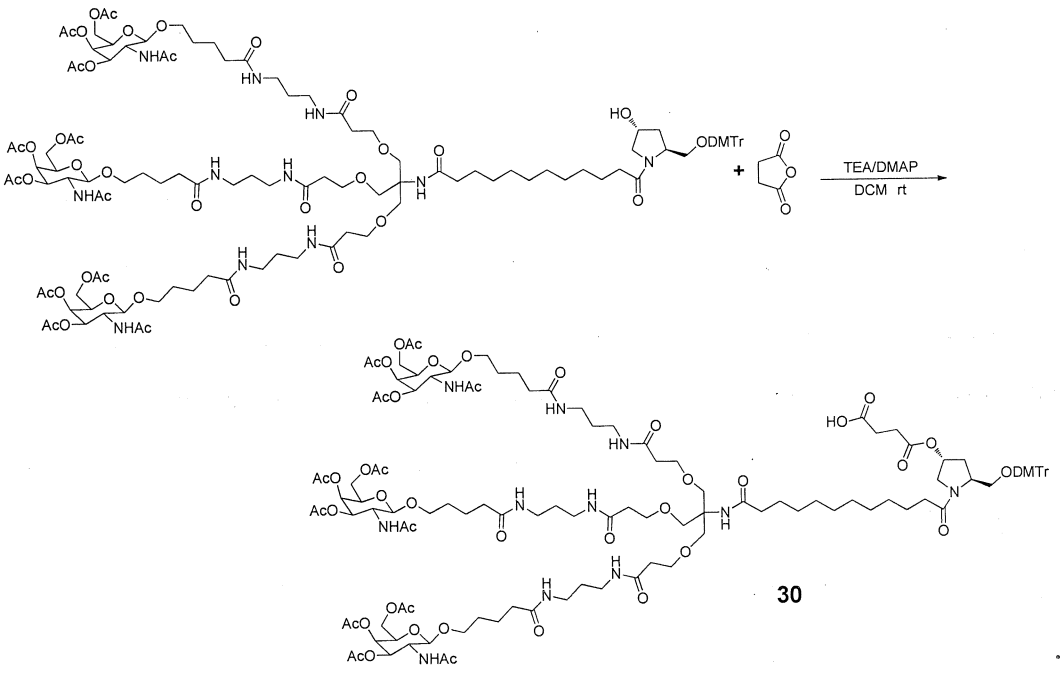
Khối lượng phân tử được đo bằng thiết bị LC-MS (sắc ký lỏng-phổ khối, được mua từ Waters Corp., mô hình: LCT Premier). Các kết quả thể hiện rằng giá trị đo phù hợp với giá trị tính toán, và nhờ đó được xác nhận rằng thể liên hợp được tổng hợp là hợp chất đã thiết kế cần quan tâm, có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (307).

Ví dụ điều chế 12: Điều chế thể liên hợp so sánh 2

Trong ví dụ điều chế này, thể liên hợp so sánh 2 được tổng hợp. Trình tự siARN đã liên hợp trong thể liên hợp này được thể hiện trong bảng 3. Thể liên hợp này có cấu trúc tương tự như hợp chất AD-66810 được mô tả trong patent Mỹ số 15/597,225.

(12-1) Tổng hợp phân tử liên hợp $(GalNAc)_3$

Hợp chất 30, nghĩa là, phân tử liên hợp chứa chất liên kết $-(L^A)_3$-trihydroxymetyl aminometan-L^B- được đề cập nêu trên và nhóm gắn đích phân tử N-axetylgalactosamin (trong đó mỗi L^A có thể được liên kết với một phân tử N-axetylgalactosamin sao cho một chất liên kết có thể được liên kết với ba phân tử N-axetylgalactosamin, được tổng hợp theo phương pháp điều chế được mô tả trong WO2014025805A1. Phân tử liên hợp này cũng có thể được gọi là phân tử liên hợp $(GaINAc)_3$, và cấu trúc của hợp chất 30 được thể hiện như sau:



(12-2) Liên kết phân tử liên hợp $(GalNAc)_3$ với giá đỡ pha rắn

Nhóm liên hợp $(GalNAc)_3$ được liên kết với giá đỡ pha rắn bằng phương pháp tương tự như trong bước (1-1-9) của ví dụ điều chế 1, nhờ đó thu được nhóm liên hợp $(GalNAc)_3$ được liên kết với giá đỡ pha rắn.

(12-3) Tổng hợp thể liên hợp so sánh 2

Thể liên hợp so sánh 2 được điều chế bằng phương pháp tương tự như trong bước (1-2), (1-3D) và (1-4) của ví dụ điều chế 1, ngoại trừ: 1) hợp chất thu được trong bước (12-2) được sử dụng để bắt đầu tổng hợp chuỗi có nghĩa; và 2) thể liên hợp siARN có trình tự thể hiện dưới số AD-66810 trong bảng 1.

Khối lượng phân tử được đo bằng sắc ký lỏng-phổ khối (LC-MS, được mua từ Waters Corp., mô hình: LCT Premier). Các kết quả thể hiện rằng giá trị đo phù hợp với giá trị tính toán, và nhờ đó được xác nhận rằng thể liên hợp được tổng hợp là hợp chất đã thiết kế đích, có cấu trúc được thể hiện bởi công thức (305).

Ví dụ thử nghiệm 1: Độc tính của thể liên hợp siARN theo sáng chế.

Trong chuột C57BL/6J, thể liên hợp 1 (0,9% khối lượng dung dịch nước NaCl, thể tích sử dụng là 10 mL/kg, nồng độ là 10 mg/mL và 20 mg/mL, trong đó mỗi nồng độ được sử dụng trong 6 con chuột: 3 con đực và 3 con cái) được sử dụng dưới da với mỗi con chuột, với liều đơn 100 mg/kg hoặc 200 mg/kg (dựa trên siARN). Quan sát lâm sàng liên tục được thực hiện trong quá trình điều trị, cho thấy không có động vật nào bị chết và không có triệu chứng lâm sàng liên quan đến đáp ứng thuốc bất lợi. 24 giờ sau khi sử dụng, mẫu máu được thực hiện để kiểm tra bệnh lý lâm sàng và chuột bị mổ. Các kết quả thể hiện rằng không có bất thường nào được tìm thấy trong thử nghiệm bệnh lý lâm sàng và tổng giải phẫu. Do đó, các kết quả nêu trên chỉ thể liên hợp theo sáng chế có độc tính tương đối thấp ở cấp độ động vật.

Ví dụ thử nghiệm 2: Thử nghiệm này minh họa độ ổn định của thể liên hợp siARN theo sáng chế.

Ví dụ thử nghiệm 2-1: Độ ổn định của thể liên hợp siARN theo sáng chế trong lysosom lysat *in vitro*.

Điều chế mẫu thử nghiệm được điều trị bằng lysosom lysat: thể liên hợp so sánh 2 và thể liên hợp 49, 36, 37, 38, 39, 43, 45 (mỗi thể liên hợp được cung cấp ở dạng 0,9% khối lượng dung dịch nước NaCl trong đó nồng độ siARN là 20 μM, 6 μl trong mỗi nhóm) được trộn kỹ riêng lẻ bằng 27,2 μL dung dịch nước natri xitrat (pH 5,0), 4,08 μL nước khử ion hóa và 2,72 μL Tritosome (được mua từ Xenotech Inc., Cat số R0610LT, số lô 1610069), và được ủ ở nhiệt độ không đổi là 37°C. 5 μL mẫu được lấy tại mỗi thời điểm là 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h và 48 h tương ứng, được bổ sung vào 15 μL ure 9 M để làm biến tính, và bổ sung bằng 4 μL 6 × đệm tải (được mua từ Solarbio Inc., Cat số 20160830), sau đó được bảo quản lạnh ngay lập tức trong buồng lạnh -80°C để dập tắt phản ứng. 0 h đại diện cho thời điểm khi mẫu được lấy ngay sau khi mẫu được thử nghiệm được trộn kỹ bằng lysosom lysat.

Điều chế mẫu đối chứng không được điều trị bằng mỗi lysosom lysat: 1,5 μL mỗi thể liên hợp nêu trên tại số mol bằng nhau (20 μM) được trộn kỹ bằng 7,5 μL dung dịch nước natri xitrat (pH 5,0) và 1 μL nước khử ion hóa, bổ sung vào 30 μL dung dịch ure 9 M để làm biến tính, và bổ sung bằng 8 μL 6×đệm tải, sau đó bảo quản lạnh ngay trong buồng lạnh -80°C để dập tắt phản ứng. Mẫu đối chứng đối với mỗi thể liên hợp được đánh dấu làm Con trong điện di đồ.

16% khối lượng gel polyacrylamit không bị biến tính được điều chế. 20 μL mỗi mẫu thử nghiệm và mẫu đối chứng được mô tả nêu trên được nạp lên gel để thực hiện điện di dưới 20 mA dòng không đổi trong 10 phút và sau đó dưới 40 mA dòng không đổi trong 30 phút. Sau khi hoàn thành điện di, gel được đặt trên máy rung và được nhuộm bằng chất màu Gelred (BioTium, Cat số 13G1203) trong 10 phút. Gel được đưa vào tạo ảnh, quan sát và sao chép. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 1.

Fig. 1 thể hiện kết quả phát hiện bán định lượng của độ ổn định *in vitro* của các thể liên hợp siARN đã thử nghiệm trong Tritosome. Các kết quả chỉ ra rằng thể liên hợp theo sáng chế có thể vẫn chưa phân giải trong thời gian dài trong Tritosome, cho thấy độ ổn định tốt.

Như được thấy từ các kết quả của Fig. 1, siARN với các biến đổi đặc hiệu theo sáng chế cho thấy độ ổn định thỏa đáng trong lysosom lysat.

Ví dụ thử nghiệm 2-2: Độ ổn định của thể liên hợp siARN trong lysosom lysat *in vitro*.

Độ ổn định được đo sử dụng phương pháp tương tự như trong ví dụ thử nghiệm 2-1, ngoại trừ mẫu được thử nghiệm là các thể liên hợp 1 và 6, trình tự 1 và 2, và đối chứng âm NS, và thời gian ủ bằng Tritosome là 0 h, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h và 8 h, tương ứng. Trong đó, trình tự của các trình tự 1 và 2 được thể hiện bên dưới và có thể thu được bằng phương pháp tổng hợp pha rắn thường xuyên được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này:

Trình tự 1:

Chuỗi có nghĩa: CCUUGAGGCAUACUUCAAA (SEQ ID No: 143)

Chuỗi đối nghĩa: UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUC (SEQ ID No: 144)

Trình tự 2:

Chuỗi có nghĩa:

CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm (SEQ ID No: 145)

Chuỗi đối nghĩa:

VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsCm (SEQ ID No: 146)

Các kết quả của điện di gel polyacrylamit không bị biến tính được thể hiện trong Fig.2.

Fig. 2 thể hiện kết quả phát hiện bán định lượng của độ ổn định *in vitro* của các thể liên hợp siARN đã thử nghiệm trong Tritosome. Các kết quả chỉ ra rằng thể liên hợp theo sáng chế có thể vẫn chưa phân giải trong thời gian dài trong Tritosome, cho thấy độ ổn định tốt.

Ví dụ thử nghiệm 2-3: Độ ổn định trong huyết tương người

Thể liên hợp 1 và 6, trình tự 2 và 3, và đối chứng âm NS (mỗi thể liên hợp được tạo ra dưới dạng 0,9% khối lượng dung dịch nước NaCl trong đó nồng độ của siARN là 20 μM, 12 μl đối với mỗi nhóm) được trộn riêng kỹ bằng 108 μL 90% huyết tương người (pha loãng trong PBS) và được ủ ở nhiệt độ không đổi là 37°C. 10 μL mẫu được thực hiện tại mỗi thời điểm 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h, 48 h và 72 h, tương ứng, và ngay lập tức bị đóng băng trong nitơ lỏng và bảo quản lạnh trong buồng lạnh -80°C. Sau khi lấy mẫu tại mỗi thời điểm, mỗi mẫu bảo quản lạnh được pha loãng 5 lần bằng 1×PBS (pH 7,4) và sau đó lấy một thể tích là 10 μL để sử dụng. Trong khi đó, mỗi mẫu được thử nghiệm được thực hiện ở số mol bằng nhau (2 μM, 2μL) và được trộn kỹ bằng 8 μL 1× PBS (pH 7,4), do đó thu được 10 μL mẫu không được điều trị bằng huyết tương người (đánh dấu là Con). 20% khối lượng gel polyacrylamit bị biến tính được điều chế. Mỗi mẫu bảo quản lạnh nêu trên được trộn bằng 4 μL đệm tải (dung dịch nước chứa EDTA 20 mM, 36% khối lượng glyxerol, và 0,06% khối lượng bromophenol xanh) và sau đó nạp lên gel nêu trên để thực hiện điện di dưới dòng không đổi 80 mA trong 60 phút. Sau khi hoàn thành điện di, gel được nhuộm bằng 1× Sybr Gold dye (Invitrogen, Cat số 11494) trong 15 phút sau đó bằng cách tạo ảnh. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 3. Trong đó, trình tự của trình tự 3 được thể hiện bên dưới và có thể thu được bằng phương pháp tổng hợp pha rắn sử dụng thường xuyên trong lĩnh vực kỹ thuật:

Trình tự 3:

Chuỗi có nghĩa:

CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm (SEQ ID No: 147)

Chuỗi đối nghĩa:

VPUmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm (SEQ ID No: 148)

Fig. 3 thể hiện kết quả phát hiện bán định lượng của độ ổn định *in vitro* của các thể liên hợp thử nghiệm trong huyết tương máu.

Như được nhìn thấy từ các kết quả của Fig. 3, trong huyết tương người, thể liên hợp theo sáng chế vẫn chưa phân giải lên đến 72 giờ, cho thấy độ ổn định rất tốt trong huyết tương người.

Ví dụ thử nghiệm 2-4: Độ ổn định của các thể liên hợp trong huyết tương khỉ

Thể liên hợp 1 và 6, và trình tự 2 và 3 (mỗi thể liên hợp được cung cấp ở dạng 0,9% khối lượng dung dịch nước NaCl trong đó nồng độ của siARN là 20 μM, 12 μl đối với mỗi nhóm) được trộn riêng kỹ bằng 108 μL 90% huyết tương khỉ cynomolgus (huyết tương khỉ, được mua từ HONGQUAN Bio, Cat số HQ70082, pha loãng trong PBS) và được ủ ở nhiệt độ không đổi là 37°C. 10 μL mẫu được thực hiện tại mỗi điểm 0 h, 2 h, 4 h, 6h, 8h, 24 h, 48 h và 72 h, tương ứng, và bị đóng băng ngay trong nitơ lỏng và bảo quản lạnh trong buồng lạnh -80°C. Sau khi lấy mẫu tại mỗi thời điểm, mỗi mẫu được pha loãng 5 lần bằng 1×PBS (pH 7,4) và sau đó lấy một lượng thể tích 10 μL để sử dụng. Trong khi đó, mỗi mẫu được thử nghiệm được thực hiện ở số mol bằng nhau (2 μM, 2μL) và được trộn kỹ bằng 8 μL 1× PBS (pH 7,4), nhờ đó thu được 10 μL mẫu không được điều trị bằng huyết tương khỉ (đánh dấu là Con). 20% khối lượng gel polyacrylamit bị biến tính được điều chế. Mỗi mẫu bảo quản lạnh được trộn toàn bộ bằng 4 μL đệm tải (dung dịch nước EDTA 20 mM, 36% khối lượng glyxerol, và 0,06% khối lượng bromophenol xanh) và sau đó nạp lên gel nêu trên để thực hiện điện di dưới dòng không đổi 80 mA trong 60 phút. Sau khi hoàn thành điện di, gel được nhuộm bằng 1× Sybr Gold dye (Invitrogen, Cat số 11494) trong 15 phút sau đó tạo hình. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 4.

Fig. 4 thể hiện kết quả phát hiện bán định lượng của độ ổn định *in vitro* của siARN thử nghiệm trong huyết tương khỉ.

Như được nhìn thấy từ các kết quả của Fig. 4, trong huyết tương khỉ cynomolgus, thể liên hợp siARNN theo sáng chế vẫn chưa phân giải lên đến 72 giờ, cho thấy độ ổn định rất tốt trong huyết tương khỉ.

Ví dụ thử nghiệm 2-5: Thử nghiệm này minh họa độ ổn định của thể liên hợp siARN theo sáng chế trong lysosom lysat *in vitro*.

Trình tự của đối chứng âm X2M2 được sử dụng trong ví dụ thử nghiệm này được thể hiện bên dưới:

Chuỗi có nghĩa:

5'-CmCmUmUmGAGGCmAUmACmUmUmCmAAAdT-S-dT-3' (SEQ ID No: 149)

Chuỗi đối nghĩa: 5'-UfUmUfGAAGUfAUGCCUfCAAGGdT-S-dT-3' (SEQ ID No: 150).

siARN này được tổng hợp bằng phương pháp phosphoramidit pha rắn. Đối chứng âm và thể liên hợp 2 được bào chế bằng 0,9% khối lượng dung dịch nước NaCl tương ứng thành dung dịch nước với nồng độ 20 μM (dựa trên nồng độ của siARN), được đánh dấu là X2M2 và thể liên hợp 2.

1) Phát hiện độ ổn định ở lysosom lysat có nguồn gốc từ chuột cống

Điều chế mẫu thử nghiệm được điều trị bằng lysosom lysat: 6 μl đối với mỗi thể liên hợp 2 và X2M2 (20μM) được trộn riêng kỹ bằng 27,2 μL natri xitrat dung dịch nước (pH 5,0), 4,08 μL nước khử ion hóa và 2,72 μL chuột lysosom lysat (Tritosome gan chuột, được mua từ Xenotech Inc., Cat số R0610.LT, Số lô 1610069, ở nồng độ cuối cùng của axit phosphataza là 0,2 mU/μL), và được ủ ở nhiệt độ không đổi là 37°C. 5 μL dung dịch hỗn hợp được thực hiện tại mỗi thời điểm là 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, và 24 h, tương ứng, bổ sung vào 15 μL dung dịch ure 9 M để làm biến tính, và bổ sung bằng 4 μL 6 × đệm tải (được mua từ Solarbio Inc., Cat số 20160830), sau đó bảo quản lạnh ngay trong buồng lạnh -80°C để dập tắt phản ứng. 0 h đại diện thời điểm khi mẫu được thực hiện ngay sau khi mẫu cần thử nghiệm được trộn kỹ bằng lysosom lysat.

Điều chế mẫu đối chứng không được điều trị bằng lysosom lysat: 1,5 μL cho mỗi thể liên hợp 2 và X2M2 (20 μM) tại số mol bằng nhau được trộn kỹ bằng 7,5 μL dung dịch nước natri xitrat (pH 5,0) và 1 μL nước khử ion hóa, bổ sung vào 30 μL dung dịch ure 9 M để làm biến tính, và bổ sung bằng 8 μL 6×đệm tải, sau đó bảo quản lạnh ngay trong buồng lạnh -80°C để dập tắt phản ứng. Đối với mỗi việc tạo ảnh điện di, mẫu đối chứng tương ứng được đánh dấu là M. 16% khối lượng gel polyacrylamit bị biến tính

được điều chế. 20 µL mỗi mẫu thử nghiệm và mẫu đối chứng được mô tả nêu trên được nạp lên gel để thực hiện điện di dưới dòng không đổi 20 mA trong 10 phút và sau đó dưới dòng không đổi 40 mA trong 30 phút. Sau khi hoàn thành điện di, gel được đặt trên máy rung và được nhuộm bằng Gelred dye (BioTium, Cat số 13G1203) trong 10 phút. Gel được tạo hình, quan sát và sao chép. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 5.

2) Phát hiện độ ổn định trong lysosom lysat ở người

Độ ổn định của X2M2 và thể liên hợp 2 trong lysosom lysat ở người được đo sử dụng phương pháp tương tự như trong 1), ngoại trừ chuột lysosom lysat được thay thế bằng lysosom lysat ở người (Lysosom gan người, được mua từ Xenotech Inc., Cat số R0610.L, Số lô 1610316). Các kết quả được thể hiện trong Fig.6.

Các kết quả của Fig. 5 và 6 chỉ ra rằng thể liên hợp siARN theo sáng chế có thể vẫn chưa đủ mức độ trong ít nhất 24 giờ trong cả lysosom lysat có nguồn gốc từ người và trong lysosom lysat chuột, cho thấy độ ổn định thỏa đáng.

Ví dụ thử nghiệm 3: Các kết quả của thử nghiệm dược động học của các thể liên hợp 1 và 6 ở chuột cống *in vivo*

Trong ví dụ thử nghiệm này, thể liên hợp 1 và 6 được sử dụng cho chuột cống trong mỗi nhóm thử nghiệm (10 chuột cống trong mỗi nhóm, 5 con đực và 5 con cái) bằng cách tiêm dưới da, tương ứng, với liều đơn 10 mg/kg và 50 mg/kg. Tiếp theo, nồng độ thuốc trong huyết tương, mô gan và mô thận của chuột cống được đo tại mỗi thời điểm.

Chuột cống SD sử dụng trong ví dụ thử nghiệm này được cung cấp bằng Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.

Thứ nhất, chuột cống SD được chia ngẫu nhiên thành nhóm theo khối lượng cơ thể và giới tính bằng cách sử dụng hệ thống dữ liệu PRISTIMA phiên bản 7.2.0, và sau đó sử dụng tương ứng bằng mỗi nhóm của các thể liên hợp theo liều lượng được thiết kế. Liều lượng thuốc đối với toàn bộ động vật được tính toán theo khối lượng cơ thể (sử dụng đơn (dưới da), liều lượng sử dụng là 10 mg/kg và 50 mg/kg, ở dạng là 0,9% dung dịch nước NaCl chứa 1mg/ml và 5 mg/ml thể liên hợp, và thể tích sử dụng là 10 mL/kg).

Toàn bộ máu của chuột cống được kết hợp từ tĩnh mạch cổ trước khi sử dụng và ở 5 phút (±30 giây), 30 phút (±1 phút), 1 giờ (±2 phút), 2 giờ (±2 phút), 6 giờ (±5 phút), 24 giờ (±10 phút), 48 giờ (±20 phút), 72 giờ (±20 phút), 120 giờ (±30 phút), và 168 giờ (±30 phút) sau khi sử dụng. Sau đó, toàn bộ mẫu máu được ly tâm ở 1800×g ở 2-8°C trong 10 phút để phân tách huyết tương. Khoảng 70 µL thể tích mẫu huyết tương được đặt trong một ống, và phần còn lại của mẫu được đặt trong ống khác, các ống được bảo quản lạnh ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -70°C đến -86°C để phát hiện. Mô gan và thận của chuột cống được kết hợp ở khoảng 24, 48, 72, 120, và 168 giờ sau khi sử dụng bằng phương pháp bao gồm gây tê chuột cống bằng pentobarbital natri theo khối lượng của nó (60 mg/kg, tiêm trong màng bụng), làm chết chuột cống bằng cách thu gom máu từ động mạch chủ bụng, và thực hiện tổng giải phẫu. Gan và thận của mỗi con chuột cống được lấy mẫu và được bảo quản trong 1 mL ống lạnh ở nhiệt độ dưới -68°C cho đến khi phát hiện và phân tích.

Nồng độ của các thể liên hợp 24 và 25 trong huyết tương, mô gan và thận của chuột cống được đo định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao với phát hiện huỳnh quang (HPLC-FLD) theo các bước đặc biệt sau:

(1) nghiền vụn mô cho đến khi khối lượng mô không nhiều hơn 80 mg thu được, sau đó bổ sung dung dịch phân giải mô và tế bào (nhà cung cấp: Epicentre, Cat số MTC096H) để điều chế chất đồng nhất mô là 66,7 mg/mL;

(2) đưa chất đồng nhất mô vào nghiền bằng sóng âm (150 W, 30 s) để phá vỡ tế bào;

(3) đối với mẫu mô, bổ sung 75 µL mẫu mô vào đĩa PCR có 96 giếng, bổ sung 5 µL proteinaza K (nhà cung cấp: Invitrogen, Cat số 25530-015) và 10 µL dung dịch nước đã trộn chứa 10% khối lượng axetonitril và 0,01% khối lượng Tween 20; đối với mẫu huyết tương, bổ sung 20 µL huyết tương vào đĩa PCR có 96 giếng, bổ sung 45 µL dung dịch phân giải mô và tế bào, 5 µL proteinaza K, và 20 µL dung dịch nước đã trộn chứa 10% khối lượng axetonitril và 0,01% khối lượng Tween 20;

(4) phong bế đĩa và đặt chúng trong thiết bị PCR (nhà cung cấp: Applied Biosystems, mô hình: hệ thống GeneAmp® PCR 9700) và ủ ở nhiệt độ 65°C trong 45 phút;

(5) sau khi hoàn thành việc ủ, bổ sung 10 µl dung dịch nước KCl 3 M (nhà cung cấp: Sigma-aldrich, Cat số 60135-250ML), lắc đều, và ly tâm ở 3200 rcf ở 4°C trong 15 phút;

(6) đối với các mẫu mô, bổ sung 80 µL dịch nổi bề mặt vào 120 µL dung dịch hỗn hợp lai giống (công thức: 0,5 mL đầu dò PNA 6 µM (nhà cung cấp: TAHE-PNA), 1 mL Trizma 200 mM/pH = 8, 5 mL dung dịch nước ure 8 M, 3,5 mL H_2O, 2 mL axetonitril);

đối với mẫu huyết tương, bổ sung 40 µL dịch nổi bề mặt vào 160 µL dung dịch hỗn hợp lai giống (công thức: 0,5 mL đầu dò PNA 6 µM, 1 mL Trizma 200 mM/pH = 8, 5 mL 8 M dung dịch nước ure, 7,5 mL H_2O, 2 mL axetonitril);

(7) phong bế đĩa và đặt chúng trong thiết bị PCR, ủ ở nhiệt độ 95°C trong 15 phút, sau đó đặt trên đá ngay trong 5 phút;

(8) chuyển mẫu sang đĩa có 96 giếng mới bằng đáy hình nón, lắc đều, và ly tâm ở 3200 rcf trong 1 phút;

(9) tiêm mẫu để phát hiện và phân tích định lượng bằng cách sử dụng HPLC-FLD (hệ pha lỏng nhà cung cấp: Thermo Fisher, mô hình sắc ký: ultimate 3000).

Các kết quả được phân tích có thể được tìm thấy trong các Fig. 7-14, trong đó Fig. 7-10 thể hiện đường cong chuyển hóa qua thời gian của nồng độ huyết tương PK/TK trong huyết tương ở chuột và PK/TK nồng độ mô trong gan và thận của chuột đối với thể liên hợp 1 với liều lượng 10 mg/kg hoặc 50 mg/kg, tương ứng; và Fig. 11-14 thể hiện đường cong chuyển hóa qua thời gian của nồng độ huyết tương PK/TK trong huyết tương ở chuột và nồng độ mô PK/TK trong gan và thận của chuột đối với thể liên hợp 6 với liều lượng 10 mg/kg hoặc 50 mg/kg, tương ứng.

Đặc biệt là,

Fig. 7 là đường cong chuyển hóa qua thời gian thể hiện nồng độ huyết tương PK/TK đối với thể liên hợp 1 với liều lượng 10 mg/kg trong huyết tương ở chuột.

Fig. 8 là đường cong chuyển hóa qua thời gian thể hiện nồng độ mô PK/TK đối với thể liên hợp 1 với liều lượng 10 mg/kg trong gan và thận của chuột.

Fig. 9 là đường cong chuyển hóa qua thời gian thể hiện nồng độ huyết tương PK/TK đối với thể liên hợp 1 với liều lượng 50 mg/kg trong huyết tương ở chuột.

Fig. 10 là đường cong chuyển hóa qua thời gian thể hiện nồng độ mô PK/TK đối với thể liên hợp 1 với liều lượng 50 mg/kg trong gan và thận của chuột.

Fig. 11 là đường cong chuyển hóa qua thời gian thể hiện nồng độ huyết tương PK/TK đối với thể liên hợp 6 với liều lượng 10 mg/kg trong huyết tương ở chuột.

Fig. 12 là đường cong chuyển hóa qua thời gian thể hiện nồng độ mô PK/TK đối với thể liên hợp 6 với liều lượng 10 mg/kg trong gan và thận của chuột.

Fig. 13 là đường cong chuyển hóa qua thời gian thể hiện nồng độ huyết tương PK/TK đối với thể liên hợp 6 với liều lượng 50 mg/kg trong huyết tương ở chuột.

Fig. 14 là đường cong chuyển hóa qua thời gian thể hiện nồng độ mô PK/TK đối với thể liên hợp 6 với liều lượng 50 mg/kg trong gan và thận của chuột.

Như được nhìn thấy từ các kết quả của các Fig. 7-14, nồng độ đối với thể liên hợp 1 và 6 trong huyết tương ở chuột bị giảm nhanh dưới giới hạn phát hiện trong nhiều giờ, trong khi nồng độ trong mô gan chuột cống được duy trì ở mức ổn định và tương đối cao qua ít nhất 168 giờ, ở liều lượng thấp (10 mg/kg) hoặc ở liều lượng tương đối cao (50 mg/kg). Điều này thể hiện rằng thể liên hợp siARN theo sáng chế có thể được làm giàu một cách cụ thể và đáng kể trong gan và vẫn ổn định, thể hiện mức độ gắn đích cao.

Ví dụ thử nghiệm 4 - Thử nghiệm này minh họa tác dụng ức chế của thể liên hợp siARN theo sáng chế với sự biểu hiện của HBV mARN *in vivo*.

Trong ví dụ thử nghiệm này, tác dụng ức chế của các thể liên hợp 5 và 7 với sự biểu hiện của HBV mARN trong chuột chuyển gen HBV C57BL/6J-Tg(Alb1HBV) 44Bri/J được nghiên cứu.

Hàm lượng HBsAg trong huyết thanh chuột được đo sử dụng bộ kit thử nghiệm kháng nguyên bề mặt virut viêm gan B (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym, ELISA) (Shanghai Kehua Bio-engineering Co., Ltd.). Chuột với S/COV>10 được lựa chọn và chia ngẫu nhiên thành nhóm (toàn bộ con cái, 4 con chuột trong mỗi nhóm) và đánh số tương ứng làm thể liên hợp 5 và thể liên hợp 7, và nhóm nước muối thường (NS) được bổ sung làm nhóm đối chứng. Liều lượng thuốc đối với toàn bộ động vật được tính toán theo khối lượng cơ thể (sử dụng đơn (dưới da), liều lượng sử dụng là 1 mg/kg và 0,1 mg/kg, dưới dạng là 0,9% dung dịch nước NaCl chứa 0,2 mg/ml và 0,02 mg/ml thể liên hợp, và thể tích sử dụng là 5 mL/kg). Động vật bị làm chết ở ngày 14 sau khi sử dụng. Gan được thu gom và giữ bằng ARN sau đó (Sigma Aldrich), và mô gan được đồng nhất hóa bằng máy đồng nhất hóa mô. Sau đó tổng số ARN được chiết và thu được bằng cách sử dụng Trizol theo quy trình tiêu chuẩn để chiết toàn bộ ARN.

Mức độ biểu hiện của HBV mARN trong mô gan được phát hiện bằng huỳnh quang thời gian thực qPCR. Đặc biệt là, ARN tổng số đã chiết được phiên mã ngược thành cADN bằng cách sử dụng bộ kit phiên mã ngược ImProm-II™ (Promega) theo hướng dẫn, và sau đó tác dụng ức chế của siARN với sự biểu hiện của HBV mARN trong mô gan được phát hiện bằng cách sử dụng bộ kit qPCR huỳnh quang (Beijing Cowin Biosicences Co., Ltd). Trong phương pháp qPCR huỳnh quang này, gen β-actin được sử dụng làm gen đối chứng bên trong, HBV và β-actin được dò bằng cách sử dụng đoạn mồi cho HBV và β-actin, tương ứng.

Trình tự của đoạn mồi để phát hiện được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4: Trình tự của các đoạn mồi để phát hiện

Gen	Đoạn mồi ngược dòng	Đoạn mồi xuôi dòng
HBV	5'-CCGTCTGTGCCTTCTCATCT-3' (SEQ ID NO: 151)	5'-TAATCTCCTCCCCCAACTCC-3'(SEQ ID NO: 152)

β-actin	5'-AGCTTCTTTGCAGCTCCTTCGTTG-3' (SEQ ID NO: 153)	5'-TTCTGACCCATTCCCACCATCACA-3'(SEQ ID NO: 154)

Trong phương pháp qPCR huỳnh quang này, sự biểu hiện của HBV mARN được thể hiện là sự biểu hiện còn lại của gen HBV X và được tính toán bằng công thức sau:

Sự biểu hiện còn lại của gen HBV X = (số lượng sao chép của gen HBV X trong nhóm thử nghiệm/số lượng sao chép của gen β-actin trong nhóm thử nghiệm)/(số lượng sao chép của gen HBV trong nhóm đối chứng/số lượng sao chép của gen β-actin trong nhóm đối chứng) × 100%, được đánh dấu làm sự biểu hiện HBV X/β-actin mARN trong các hình.

Sau đó, phần trăm ức chế của thể liên hợp đối với mARN được tính toán theo phép tính:

Phần trăm ức chế của thể liên hợp đối với mARN = (1- sự biểu hiện còn lại của gen HBV X) × 100%,

trong đó nhóm đối chứng là nhóm chuột đối chứng được sử dụng bằng NS trong thử nghiệm này và mỗi nhóm thử nghiệm là nhóm chuột được sử dụng bằng thể liên hợp siARN khác nhau, tương ứng. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 15.

Trong các thử nghiệm khác, nhiều thử nghiệm cũng được thực hiện theo các điều kiện sau:

Thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp tương tự mô tả nêu trên, ngoại trừ thể liên hợp siARN sử dụng được thay thế bằng thể liên hợp 1 và 6, và số liệu được thu thập ở ngày 14. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 16; và

Thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp tương tự được mô tả nêu trên, ngoại trừ thể liên hợp siARN được sử dụng được thay thế bằng thể liên hợp 5 và 6, và số liệu được thu thập ở ngày 7. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 17; và

Thử nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp tương tự được mô tả nêu trên, ngoại trừ thể liên hợp siARN cần được sử dụng được thay thế bằng thể liên

hợp 9, 10, 5 và 6, và số liệu được thu thập ở ngày 7. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 18; và

Thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp tương tự mô tả nêu trên, ngoại trừ thể liên hợp siARN cần được sử dụng được thay thế bằng thể liên hợp 1, 2, 3 và 4 (5 chuột trong mỗi nhóm), và số liệu được thu thập ở ngày 28. Mỗi thể liên hợp được sử dụng trong hai liều lượng là 1 mg/kg và 0,3 mg/kg (trong đó thể tích sử dụng vẫn tương tự, trong khi nồng độ của dung dịch liên hợp được điều chỉnh tương ứng). Các kết quả của nó được thể hiện tương ứng trong Fig. 19.

Thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp tương tự mô tả nêu trên, ngoại trừ thể liên hợp siARN sử dụng được thay thế bằng thể liên hợp 1, và số liệu được thu thập ở ngày 14. Mỗi thể liên hợp được sử dụng trong hai liều lượng là 1 mg/kg và 0,1 mg/kg (trong đó thể tích sử dụng vẫn tương tự, trong khi nồng độ của dung dịch liên hợp được điều chỉnh tương ứng). Các kết quả được tương ứng thể hiện trong Fig. 20.

Như có thể được nhìn thấy từ các kết quả nêu trên, trong nhiều thử nghiệm với các thời điểm thử nghiệm khác nhau, toàn bộ thể liên hợp theo sáng chế được mô tả nêu trên thể hiện hoạt tính ức chế cao so với sự biểu hiện của HBV mARN ở chuột *in vivo*.

Ví dụ thử nghiệm 5: Thử nghiệm này minh họa thử nghiệm phụ thuộc thời gian của tác dụng ức chế của thể liên hợp siARN theo sáng chế với HBsAg và HBV ADN trong huyết thanh chuột chuyển gen HBV.

Mô hình chuột AAV-HBV được sử dụng. Sau khi thiết lập thành công mô hình động vật, các con chuột này được chia ngẫu nhiên thành nhóm dựa trên hàm lượng HBsAg trong huyết thanh (5 chuột trong mỗi nhóm). Các thể liên hợp 1 và 6, thể liên hợp so sánh 2 và NS làm đối chứng trống được sử dụng tương ứng với mỗi nhóm. Các liều lượng thuốc đối với toàn bộ động vật được tính toán theo khối lượng cơ thể (sử dụng đơn (dưới da), liều lượng sử dụng là 3 mg/kg và 1 mg/kg, ở dạng là 0,9% dung dịch nước NaCl chứa 0,3 mg/ml và 0,1 mg/ml thể liên hợp, và thể tích sử dụng là 5 mL/kg). Máu được lấy từ đám rối tĩnh mạch ổ mắt ở chuột trước khi sử dụng (đánh dấu

là D0) và ở các ngày 7, 14, 21, 28, 56, 84, 112, 140, 154, 168 và 182 sau khi sử dụng, và mức độ HBsAg trong huyết thanh được đo cho mỗi thời điểm. Trong quá trình thử nghiệm, việc phát hiện đối tượng kết thúc nếu hàm lượng HBsAg trong huyết thanh trong kết quả thử nghiệm gần với hoặc nhiều hơn giá trị ban đầu.

Khoảng 100 µl máu ổ mắt được thực hiện mỗi lần, và huyết thanh không dưới 20 µl sau khi ly tâm. Hàm lượng của HBsAg trong huyết thanh được đo bằng cách sử dụng bộ kit HBsAg CLIA (Autobio, CL0310). Mức độ biểu hiện của HBV ADN được đo bằng cách chiết ADN từ huyết thanh bằng cách tham chiếu đến hướng dẫn của bộ kit máu QIAamp 96 ADN sau đó qPCR.

Mức độ biểu hiện HBsAg chuẩn hóa = (hàm lượng của HBsAg sau khi sử dụng/hàm lượng của HBsAg trước khi sử dụng) × 100%.

Phần trăm ức chế với HBsAg = (1 - hàm lượng của HBsAg sau khi sử dụng/hàm lượng của HBsAg trước khi sử dụng) × 100%, trong đó hàm lượng của HBsAg được biểu hiện tương đương (UI) của HBsAg mỗi mililit (ml) huyết thanh.

Mức độ biểu hiện HBV ADN chuẩn hóa = (hàm lượng của HBV ADN sau khi sử dụng/hàm lượng của HBV ADN trước khi sử dụng) × 100%.

Phần trăm ức chế với HBV ADN = (1 - hàm lượng của HBV ADN sau khi sử dụng/hàm lượng của HBV ADN trước khi sử dụng) × 100%,

trong đó hàm lượng của HBV ADN được biểu hiện trong các sao chép của HBV ADN mỗi mililit (ml) huyết thanh.

Các kết quả được thể hiện trong Fig. 21 và 22.

Như được nhìn thấy từ các kết quả của Fig. 21, nhóm đối chứng âm NS cho thấy không có tác dụng ức chế tại các thời điểm khác nhau sau khi sử dụng; ngược lại, mỗi thể liên hợp siARN cho thấy tác dụng ức chế rất tốt trên HBsAg tại các thời điểm khác nhau sau khi sử dụng. Cụ thể là, thể liên hợp 1 luôn thể hiện phần trăm ức chế cao với HBsAg trong huyết thanh trong khoảng thời gian lên đến 140 ngày, chỉ ra độ ổn định và ức chế hiệu quả với sự biểu hiện của gen HBV trong thời gian dài hơn.

Như được nhìn thấy từ các kết quả của Fig. 22, thể liên hợp siARNN của mỗi ví dụ cũng cho thấy ức chế hiệu quả với sự biểu hiện của HBV ADN và duy trì phần trăm ức chế cao hơn trong khoảng thời gian lên đến 84 ngày.

Ngược lại, mặc dù thể liên hợp so sánh 2 đạt được tác dụng ức chế mARN tương tự với thể liên hợp riêng rẽ trong thử nghiệm *in vivo*, thời gian tác dụng ức chế như được thể hiện trong Fig. 21 và 22 ngắn hơn đáng kể so với thời gian tác dụng ức chế của các thể liên hợp 1 và 6 với mức độ liều lượng tương đương.

Theo phương pháp tương tự như được mô tả nêu trên, hơn 4 thử nghiệm nữa cũng được thực hiện, trong đó huyết thanh HBsAg được đo, ngoại trừ:

Trong mô hình chuột AAV-HBV nồng độ thấp, 3 mg/kg và 1 mg/kg thể liên hợp 6 được sử dụng tương ứng; thử nghiệm tiếp tục cho đến ngày 140; và các kết quả được thể hiện trong Fig. 23;

Trong mô hình M-Tg, 3 mg/kg (3mpk) và 1 mg/kg (1mpk) của các thể liên hợp 5 và 6 (PBS đối với nhóm đối chứng) được sử dụng, tương ứng; thử nghiệm được tiếp tục cho đến ngày 70; và các kết quả được thể hiện trong Fig. 24; chuột được mua từ Department of Animal, Shanghai Public Health Center. Phương pháp điều chế của chuột chuyển gen được mô tả bởi Ren J. et al., in J. Medical Virology. 2006, 78:551-560;

Trong mô hình M-Tg, 5 mg/kg, 1 mg/kg và 0,2 mg/kg của các thể liên hợp 11 và 6 (PBS đối với nhóm đối chứng), và 5 mg/kg thể liên hợp so sánh 2 được sử dụng tương ứng; thử nghiệm tiếp tục đến ngày 78; và các kết quả được thể hiện trong Fig. 25;

Theo mô hình sao chép 1,28, 3 mg/kg và 1mg/kg thể liên hợp 1 được sử dụng tương ứng; thử nghiệm tiếp tục đến ngày 210; và các kết quả được thể hiện trong Fig. 26 và 27.

Đối với các liều sử dụng khác nhau được mô tả nêu trên, mỗi thể liên hợp được sử dụng trong thể tích sử dụng tương tự, trong khi nồng độ của dung dịch được điều chỉnh tương ứng, để sử dụng với liều tương ứng.

Từ các kết quả của các Fig. 22-27, có thể thấy rằng thể liên hợp siARN theo sáng chế thể hiện tác dụng ức chế thống nhất và hiệu quả trên huyết thanh HBsAg trong các mô hình động vật khác nhau, và phụ thuộc liều thường xuyên.

Ví dụ thử nghiệm 6: Thử nghiệm này minh họa rằng thể liên hợp siARN theo sáng chế không chỉ có hoạt tính *in vitro* cao hơn, mà còn thể hiện tác dụng xa đích thấp.

(6-1) Các tế bào HEK293A sử dụng trong ví dụ thử nghiệm này được cung cấp bởi Nucleic Acid Technology Laboratory, Institute of Molecular Medicine, Peking University và được nuôi cấy trong môi trường hoàn toàn DMEM (Hyclone company) chứa 20% huyết thanh thai bò (FBS, Hyclone company), 0,2v% Penixillin-Streptomyxin (Gibco, Invitrogen company) ở nhiệt độ 37°C trong máy ủ chứa CO_2 5%/95% không khí.

Trong ví dụ thử nghiệm này, thể liên hợp 1 được nghiên cứu trong hệ thống psiCHECK *in vitro* đối với hiệu quả hoạt tính trên đích và xa đích. Đặc biệt là, thể liên hợp 1 được thử nghiệm đối với hoạt tính của trình tự đích bắt cặp hoàn toàn gắn đích (trình tự nuecleotit được bổ sung hoàn toàn bằng trình tự neucleotit của toàn bộ chiều dài của chuỗi có nghĩa/chuỗi đối nghĩa của thể liên hợp 1) hoặc trình tự đích bắt cặp vùng hạt gắn đích (trình tự nuecleotit được bổ sung bằng trình tự neucleotit của vị trí 1-8 của chuỗi có nghĩa/chuỗi đối nghĩa của thể liên hợp 1).

Theo phương pháp được mô tả bởi Kumico Ui-Tei et. al., Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. Nucleic Acid Research, 2008,36(7), 2136-2151, plasmit để phát hiện được tiến hành và đồng chuyển nhiễm bằng thể liên hợp siARN cần được phát hiện thành tế bào HEK293A; và mức độ biểu hiện của gen chỉ thị luciferaza kép tác động hoạt tính trên đích và tác dụng xa đích của thể liên hợp siARN. Các bước cụ thể như sau:

[1] Tạo plasmit để phát hiện

Bốn plasmit tái tổ hợp được tạo ra sử dụng plasmit psiCHECK™-2 (Promega™), trong đó GSCM đại diện plasmit trên đích; và PSCM, GSSM và PSSM đại diện plasmit xa đích:

(1) GSCM, chứa trình tự đích, trong đó trình tự đích được bổ sung đầy đủ với toàn bộ 21 trình tự nucleotit của chuỗi đối nghĩa trong thể liên hợp 1.

(2) PSCM, chứa trình tự đích, trong đó trình tự đích là giống với toàn bộ 21 trình tự nucleotit của chuỗi đối nghĩa trong thể liên hợp 1.

(3) GSSM, chứa trình tự đích, trong đó trình tự đích được bổ sung đầy đủ với trình tự nucleotit tại các vị trí 1-8 từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa trong thể liên hợp 1, trong khi phần còn lại của trình tự đích tương ứng với trình tự nucleotit tại các vị trí 9-21 từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa trong thể liên hợp 1, nhưng được bắt cặp nhầm hoàn toàn; nghĩa là, khi nucleotit tại bất kỳ vị trí trong vị trí 9-21 từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa trong thể liên hợp 1 là G, C, A hoặc U, nucleotit tại vị trí tương đương trong trình tự đích là T, A, C hoặc G.

(4) PSSM, chứa trình tự đích, trong đó trình tự đích được bổ sung đầy đủ với trình tự nucleotit tại các vị trí 1-8 từ đầu tận 5' của chuỗi có nghĩa trong thể liên hợp 1, trong khi phần còn lại của trình tự đích tương ứng với trình tự nucleotit tại các vị trí 9-19 từ đầu tận 5' của chuỗi có nghĩa trong thể liên hợp 1, nhưng được bắt cặp nhầm hoàn toàn; nghĩa là, khi nucleotit tại bất kỳ vị trí trong vị trí 9-19 từ đầu tận 5' của chuỗi có nghĩa trong thể liên hợp 1 là G, C, A hoặc U, nucleotit tại vị trí tương đương trong trình tự đích là T, A, C hoặc G. Để có chiều dài tương tự như trình tự đích trong GSSM, hai CC được bổ sung tại đầu tận 3' của trình tự đích trong PSSM.

Trình tự đích được chèn vào vị trí Xho I/Not của plasmit psiCHECK™-2.

[2] Chuyển nhiễm

Trong đĩa 96 giếng, siARN và mỗi plasmit trong số plasmit nêu trên được đồng chuyển nhiễm theo hướng dẫn của LipofectaminTM 2000 (Invitrogen), mỗi plasmit tương ứng với nhiều nồng độ đặc hiệu của thể liên hợp A1. Đặc biệt là, 10 ng plasmit được chuyển nhiễm mỗi giếng, sử dụng 0,2 µL LipofectaminTM 2000 mỗi giếng; nồng

độ cuối (dựa trên nồng độ của siARN) của thể liên hợp 1 là từ 100 nM đến 0,0001 nM (pha loãng 4 lần của 11 nồng độ), 3 giếng sao chép mỗi nhóm.

[3] Phát hiện

24 giờ sau khi đồng chuyển nhiễm, các tế bào HEK293A được dung giải bằng cách sử dụng bộ kit thử nghiệm gen chỉ thị luciferaza kép (Promega, Cat số E2940) theo hướng dẫn để phát hiện mức độ biểu hiện của gen chỉ thị luciferaza kép. Để thử nghiệm nhóm của mỗi nồng độ đặc hiệu, các nhóm này không được điều trị bằng thể liên hợp được sử dụng làm đối chứng (con). Mức độ protein luciferaza Renilla (Ren) được chuẩn hóa đến mức độ protein luciferaza đom đóm (Fir).

Đường cong đáp ứng liều được lập đồ thị bởi các kết quả hoạt tính đo ở nồng độ siARN khác nhau, và đường cong được điều chỉnh bằng cách sử dụng chức năng log(chất ức chế) với đáp ứng— Độ dốc biến đổi của phầm mềm Graphpad 5.0. IC_{50} của GSCM gắn đích siARN được tính toán dựa trên đường cong đáp ứng liều lượng bằng công thức bên dưới:

$$Y = \text{Bot} + \frac{\text{Top-Bot}}{1 + 10^{(\text{LogIC50-X}) \times \text{Độ dốc Hill}}}$$

trong đó:

Y là mức độ biểu hiện của mARN còn lại,

X là logarit của nồng độ của siARN được chuyển nhiễm,

Bot là giá trị Y ở cuối giai đoạn ổn định,

Top là giá trị Y ở đầu giai đoạn ổn định,

$LogIC_{50}$ là giá trị X tại đó Y là giá trị trung bình giữa đáy và đỉnh của đường tiệm cận, và độ dốc Hill là độ dốc của đường cong.

IC_{50} của thể liên hợp 1 gắn đích GSCM được tính toán dựa trên đường cong kết quả-liều lượng. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 28A-28D, chỉ ra rằng giá trị IC_{50} của thể liên hợp 1 tương ứng với GSCM là 0,0513 nM. Thể liên hợp 1 tương ứng với PSCM, GSSM hoặc PSSM cho thấy không có tác dụng ức chế đáng kể nào tại mỗi nồng

độ siARN, chỉ định rằng thể liên hợp siARN theo sáng chế không chỉ có hoạt tính *in vitro* cao hơn, mà còn thể hiện tác dụng xa đích thấp.

Theo các kết quả nêu trên, thể liên hợp 1 cho thấy tác dụng ức chế tốt hơn trên sự biểu hiện của mARN đích trong plasmit trên đích với IC_{50} thấp; trong khi cho thấy không có tác dụng ức chế trên sự biểu hiện của ba plasmit xa đích. Do đó, thể liên hợp 1 không chỉ có tác dụng ức chế tốt hơn của mARN đích, mà còn thể hiện tác dụng xa đích thấp.

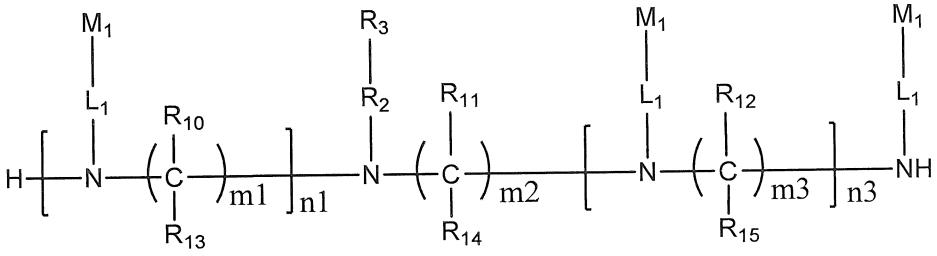
Các phương án theo sáng chế được mô tả chi tiết nêu trên, nhưng phần mô tả không bị giới hạn bởi các chi tiết của các phương án được mô tả nêu trên. Các biến đổi đơn giản khác nhau của giải pháp kỹ thuật theo sáng chế có thể được tạo ra trong phạm vi của khái niệm kỹ thuật theo sáng chế, và các biến đổi đơn giản này nằm trong phạm vi theo sáng chế.

Được lưu ý rằng mỗi dấu hiệu kỹ thuật đặc hiệu mô tả trong các phương án nêu trên có thể được kết hợp theo bất kỳ cách thức thích hợp miễn là không có mâu thuẫn. Để tránh sự lặp lại không cần thiết, các cách thức tổ hợp có thể khác nhau không còn được mô tả trong sáng chế.

Ngoài ra, các phương án khác nhau khác theo sáng chế cũng có thể được thực hiện trong tổ hợp bất kỳ miễn là nó không trái với ý tưởng theo sáng chế, mà cũng nên được coi là mô tả theo sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể liên hợp siARN có cấu trúc như được thể hiện bằng công thức (1):



Công thức (1)

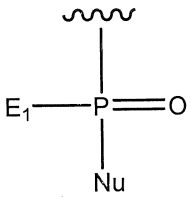
trong đó,

n1 là số nguyên từ 1-3, và n3 là số nguyên từ 0-4;

mỗi m1, m2, và m3 độc lập là số nguyên từ 2-10;

mỗi R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} độc lập là H hoặc được chọn từ nhóm bao gồm C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} haloalkyl và C_1-C_{10} alkoxy;

R_3 là nhóm có cấu trúc như được thể hiện bằng công thức A59:



(A59),

trong đó E_1 là OH, SH hoặc BH_2; và Nu là siARN;

mỗi nucleotit trong siARN độc lập là nucleotit biến đổi hoặc không biến đổi; siARN chứa chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa, trong đó chuỗi có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit 1, và chuỗi đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit 2; trình tự nucleotit 1 và trình tự nucleotit 2 bổ sung đảo ít nhất một phần để tạo thành vùng chuỗi kép; trình tự nucleotit 1 có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:155; và trình tự nucleotit 2 có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156:

5'- CCUUGAGGCAUACUUCAAZ -3' (SEQ ID NO: 155);

5'- Z'UUGAAGUAUGCCUCAAGG -3' (SEQ ID NO: 156);

trong đó,

Z là A; Z' là U;

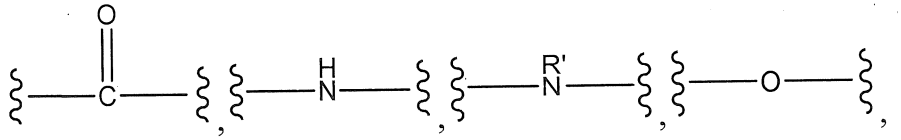
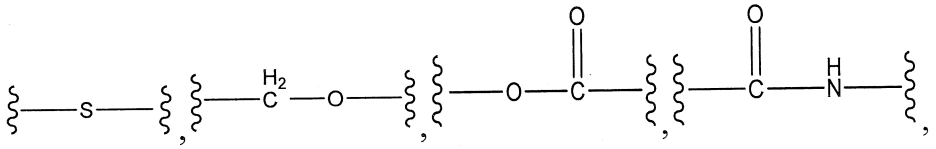
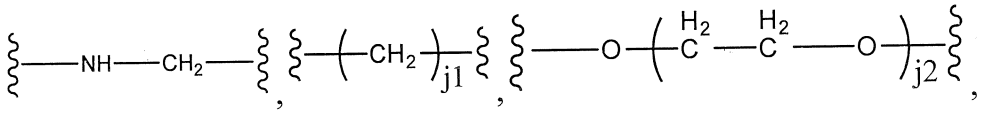
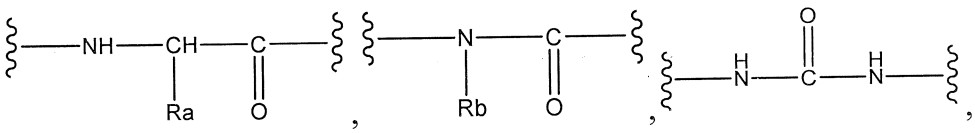
trình tự nucleotit 1 chứa nucleotit Z_A tại vị trí tương ứng với Z;

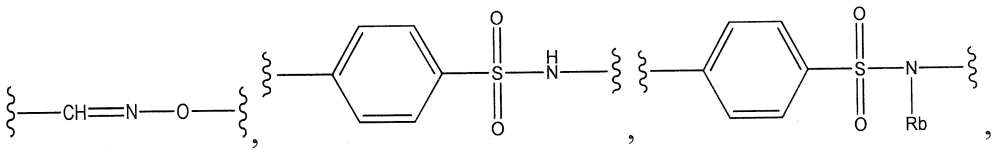
trình tự nucleotit 2 chứa nucleotit Z'_B tại vị trí tương ứng với Z'; nucleotit Z'_B là nucleotit thứ nhất từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa;

R_2 là alkylen mạch thẳng có chiều dài từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon được thay thế tùy ý bằng bất kỳ một hoặc nhiều nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, $S(O)_2$, C_2-C_{10} alkeylen, C_2-C_{10} alkynylen, C_6-C_{10} arylen, C_3-C_{18} heteroxyclylen, và C_5-C_{10} heteroarylen, và trong đó R_2 được thế tùy ý bằng bất kỳ một hoặc nhiều nhóm bao gồm: C_1-C_{10} alkyl, C_6-C_{10} aryl, C_5-C_{10} heteroaryl, C_1-C_{10} haloalkyl, -OC_1-C_{10} alkyl, -OC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-OH, -OC_1-C_{10} haloalkyl, -SC_1-C_{10} alkyl, -SC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-SH, -SC_1-C_{10} haloalkyl, halo, -OH, -SH, $-NH_2$, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2, -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -NH(C_1-C_{10} alkyl), xyano, nitro, $-CO_2H$, -C(O)O(C_1-C_{10} alkyl), -CON(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -CONH(C_1-C_{10} alkyl), $-CONH_2$, -NHC(O)(C_1-C_{10} alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C_1-C_{10} alkyl, -C(O)C_1-C_{10} alkylphenyl, -C(O)C_1-C_{10} haloalkyl, -OC(O)C_1-C_{10} alkyl, $-SO_2$(C_1-C_{10} alkyl), $-SO_2$(phenyl), $-SO_2$(C_1-C_{10} haloalkyl), $-SO_2NH_2$, $-SO_2$NH(C_1-C_{10} alkyl), $-SO_2$NH(phenyl), -NHSO_2(C_1-C_{10} alkyl), -NHSO_2(phenyl), và -NHSO_2(C_1-C_{10} haloalkyl);

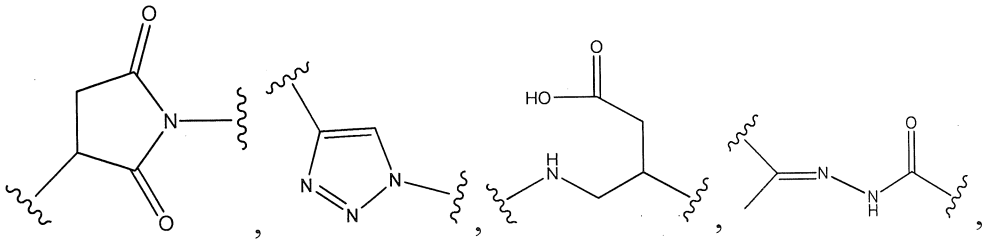
mỗi L_1 độc lập là alkylen mạch thẳng có chiều dài từ 1 đến 70 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon được thay thế tùy ý bằng bất kỳ một hoặc nhiều nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, $S(O)_2$, C_2-C_{10} alkeylen, C_2-C_{10} alkynylen, C_6-C_{10} arylen, C_3-C_{18} heteroxyclylen, và C_5-C_{10} heteroarylen, và trong đó L_1 được thế tùy ý bằng bất kỳ một hoặc nhiều nhóm bao gồm: C_1-C_{10} alkyl, C_6-C_{10} aryl, C_5-C_{10} heteroaryl, C_1-C_{10} haloalkyl, -OC_1-C_{10} alkyl, -OC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-OH, -OC_1-C_{10} haloalkyl, -SC_1-C_{10} alkyl, -SC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-

C_{10} alkyl-SH, -SC_1-C_{10} haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH_2, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2, -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -NH(C_1-C_{10} alkyl), xyano, nitro, -CO_2H, -C(O)O(C_1-C_{10} alkyl), -CON(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -CONH(C_1-C_{10} alkyl), -$CONH_2$, -NHC(O)(C_1-C_{10} alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C_1-C_{10} alkyl, -C(O)C_1-C_{10} alkylphenyl, -C(O)C_1-C_{10} haloalkyl, -OC(O)C_1-C_{10} alkyl, -SO_2(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2(phenyl), -SO_2(C_1-C_{10} haloalkyl), -SO_2NH_2, -SO_2NH(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2NH(phenyl), -$NHSO_2$(C_1-C_{10} alkyl), -$NHSO_2$(phenyl), và -$NHSO_2$(C_1-C_{10} haloalkyl);

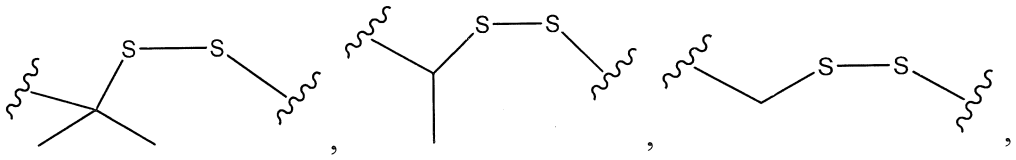
~~~ là vị trí mà nhóm được liên kết với phần còn lại của phân tử;

M_1 là nhóm gắn đích.

2. Thể liên hợp siARN theo điểm 1, trong đó mỗi L_1 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nhóm A1-A26 và bất kỳ tổ hợp kết nối của nó:



(A1) (A2) (A3) (A4)



(A5) (A6) (A7) (A8)



(A9) (A10) (A11)



(A12) (A13) (A14)
~~~



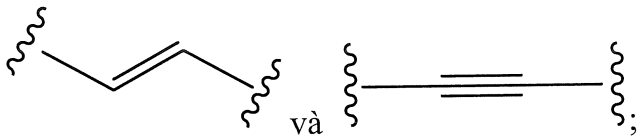
(A15) (A16) (A17)



(A18) (A19) (A20) (A21)



(A22) (A23) (A24)



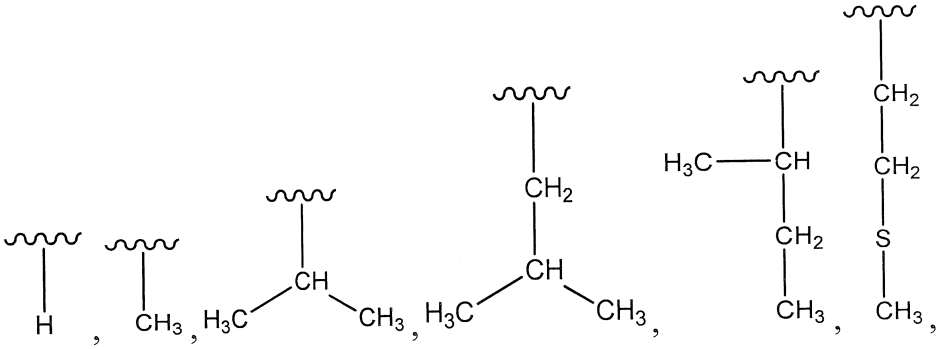
(A25) (A26)

trong đó mỗi j1 độc lập là số nguyên từ 1-20;

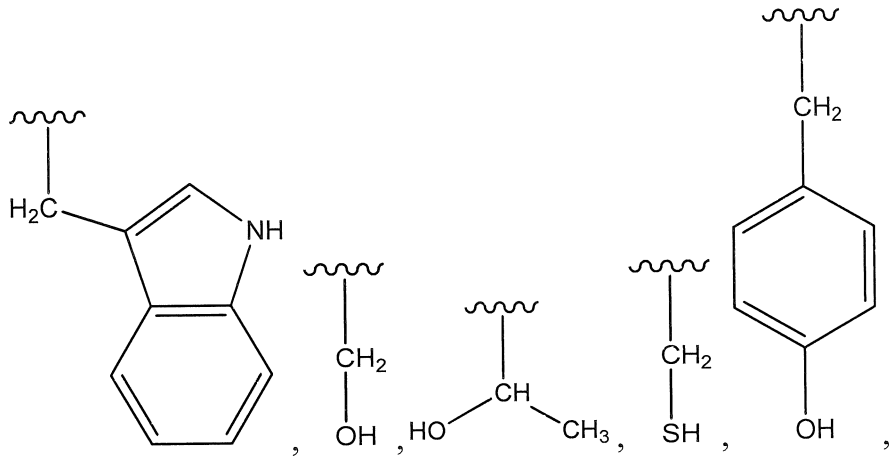
mỗi j2 độc lập là số nguyên từ 1-20;

mỗi R' độc lập là C_1-C_{10} alkyl;

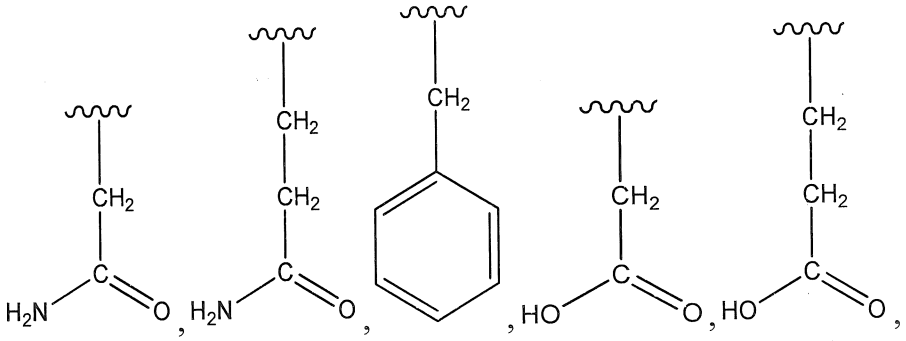
mỗi Ra độc lập được chọn từ nhóm bao gồm A27-A45 và tổ hợp bất kỳ của nó:



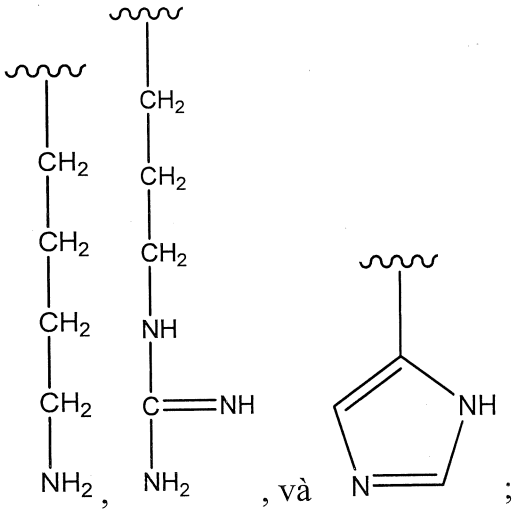
(A27) (A28) (A29) (A30) (A31) (A32)



(A33) (A34) (A35) (A36) (A37)



(A38) (A39) (A40) (A41) (A42)



(A43) (A44) (A45);

mỗi Rb độc lập là C_1-C_{10} alkyl.

3. Thể liên hợp siARN theo điểm 2, trong đó L_1 được chọn từ tổ hợp kết nối của một hoặc nhiều A1, A4, A5, A6, A8, A10, A11, A13, và các tổ hợp kết nối của nó.

4. Thể liên hợp siARN theo điểm 2 hoặc 3, trong đó L_1 được chọn từ tổ hợp kết nối của ít nhất hai trong số A1, A4, A8, A10, và A11.

5. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó L_1 được chọn từ tổ hợp kết nối của ít nhất hai trong số A1, A8, và A10.

6. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó chiều dài của L_1 là 3 đến 25 nguyên tử.

7. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó chiều dài của L_1 là 4 đến 15 nguyên tử.

8. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 7, trong đó j1 là số nguyên từ 2 đến 10, j2 là số nguyên từ 2 đến 10, R' là C_1-C_4 alkyl, Ra được chọn từ nhóm bao gồm A27, A28, A29, A30, và A31, và Rb là C_1-C_5 alkyl.

9. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 8, trong đó j1 là số nguyên từ 3 đến 5, j2 là số nguyên từ 3 đến 5, R' là metyl, etyl hoặc isopropyl, Ra là A27 hoặc A28, và Rb là metyl, etyl, isopropyl hoặc butyl.

10. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó n1 là số nguyên từ 1 đến 2, n3 là số nguyên từ 0 đến 1, và n1 + n3 = 2-3.

11. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó mỗi m1, m2 và m3 độc lập là số nguyên từ 2 đến 5.

12. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó m1= m2 = m3.

13. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó mỗi M_1 độc lập là phối tử liên kết với thụ thể asialoglycoprotein (ASGP-R) trên bề mặt của tế bào gan ở động vật có vú.

14. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó mỗi M_1 độc lập là asialoglycoprotein hoặc sacarit.

15. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó mỗi M_1 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm D-mannopyranoza, L-mannopyranoza, D-

arabinoza, D-xylofuranoza, L-xylofuranoza, D-glucoza, L-glucoza, D-galactoza, L-galactoza, α-D-mannofuranoza, β-D-mannofuranoza, α-D-mannopyranoza, β-D-mannopyranoza, α-D-glucopyranoza, β-D-glucopyranoza, α-D-glucofuranoza, β-D-glucofuranoza, α-D-fructofuranoza, α-D-fructopyranoza, α-D-galactopyranoza, β-D-galactopyranoza, α-D-galactofuranoza, β-D-galactofuranoza, glucosamin, axit sialic, galactosamin, N-axetylgalactosamin, N-trifloroaxetylgalactosamin, N-propionylgalactosamin, N-n-butyrylgalactosamin, N-isobutyrylgalactosamin, 2-amino-3-O-[(R)-1-carboxyetyl]-2-deoxy-β-D-glucopyranoza, 2-deoxy-2-metylamino-L-glucopyranoza, 4,6-dideoxy-4-formamido-2,3-di-O-metyl-D-mannopyranoza, 2-deoxy-2-sulfoamino-D-glucopyranoza, axit N-glycolyl-α-neuraminic, 5-thio-β-D-glucopyranoza, metyl 2,3,4-tris-O-axetyl-1-thio-6-O-trityl-α-D-glucopyranosit, 4-thio-β-D-galactopyranoza, etyl 3,4,6,7-tetra-O-axetyl-2-deoxy-1,5-dithio-α-D-glucoheptopyranosit, 2,5-anhydro-D-allononitril, riboza, D-riboza, D-4-thioriboza, L-riboza, và L-4-thioriboza.

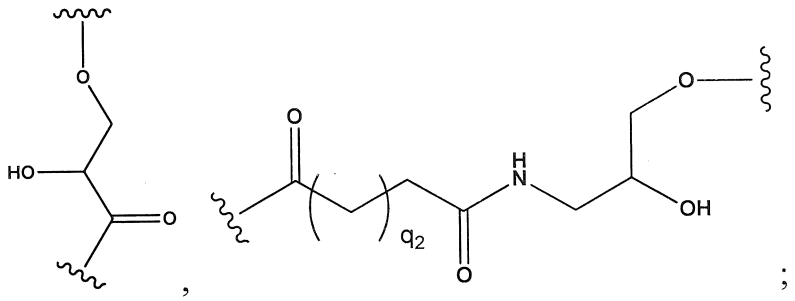
16. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó ít nhất một hoặc mỗi M_1 là galactoza hoặc N-axetylgalactosamin (GalNAc).

17. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó mỗi R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} độc lập là H, metyl hoặc etyl.

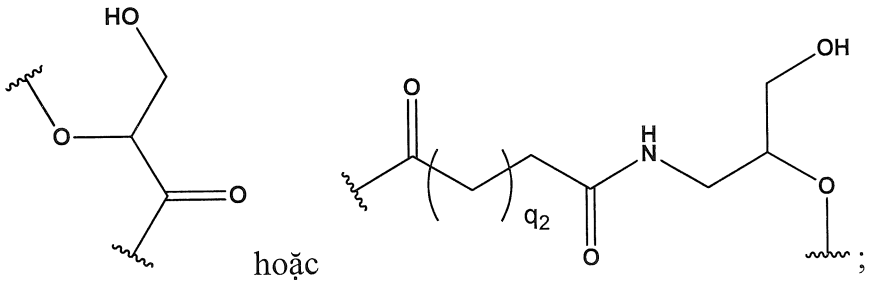
18. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó nhóm R_2 có cả vị trí liên kết với nguyên tử N trên khung nitơ và vị trí liên kết với nguyên tử P trong R_3.

19. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó R_2 tạo thành liên kết amit với nguyên tử N trên khung nitơ, và vị trí liên kết với nguyên tử P trong R_3 tạo thành liên kết phosphoeste với nguyên tử P.

20. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19, trong đó R_2 được chọn từ B5, B6, B5' hoặc B6':



(B5) (B6)

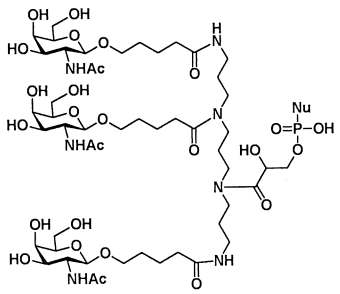


(B5') (B6')

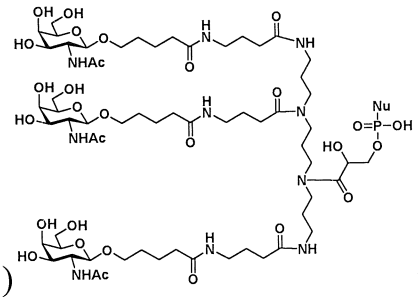
trong đó, ~~~ đại diện vị trí mà các nhóm được liên kết đồng hóa trị; và q_2 là số nguyên từ 1 đến 10.

21. Thể liên hợp siARN theo điểm 20, trong đó q_2 là số nguyên từ 1 đến 5.

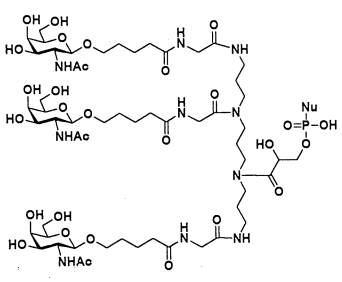
22. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21, trong đó thể liên hợp có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19), (20), (21) hoặc (22):



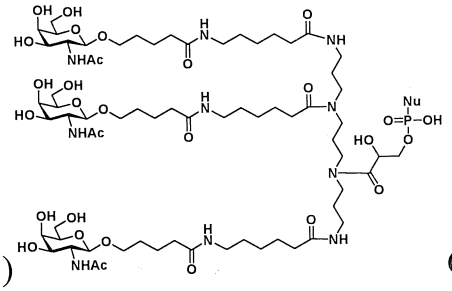
Công thức (3)



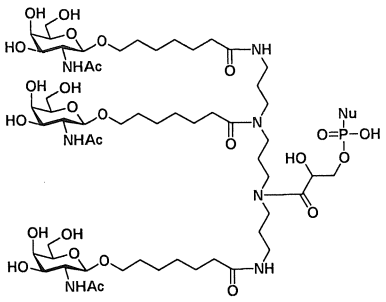
Công thức (4)



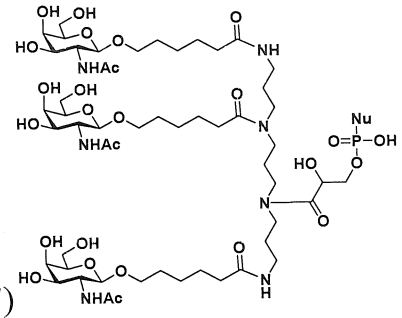
Công thức (5)



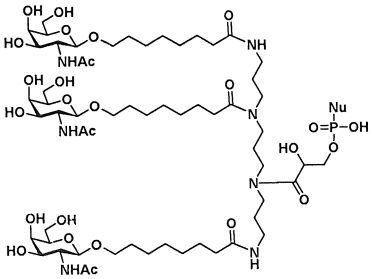
Công thức (6)



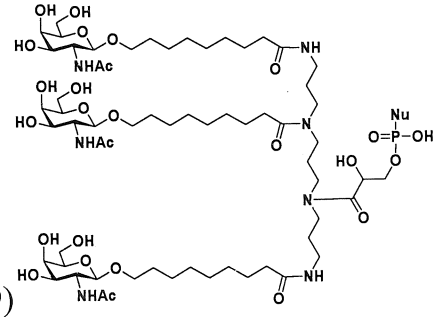
Công thức (7)



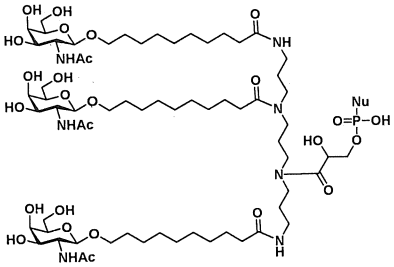
Công thức (8)



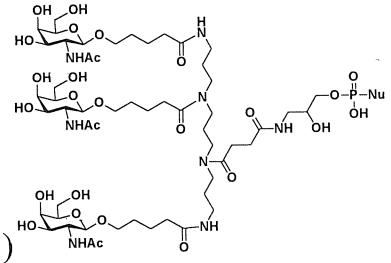
Công thức (9)



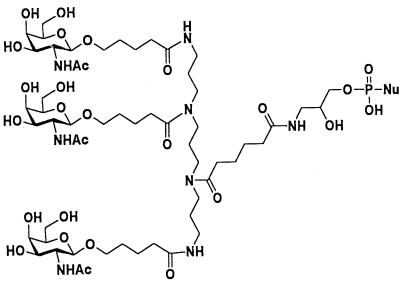
Công thức (10)



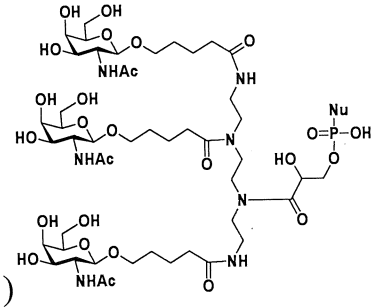
Công thức (11)



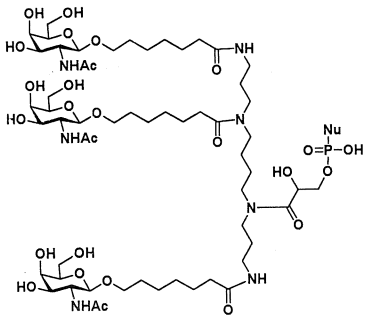
Công thức (12)



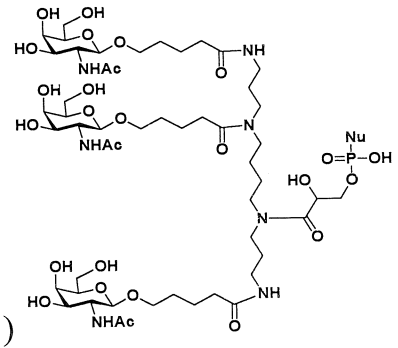
Công thức (13)



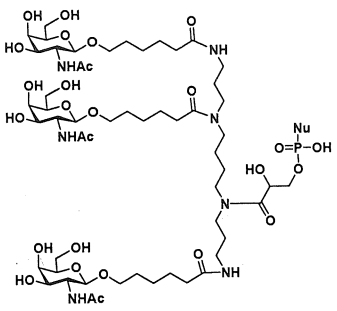
Công thức (14)



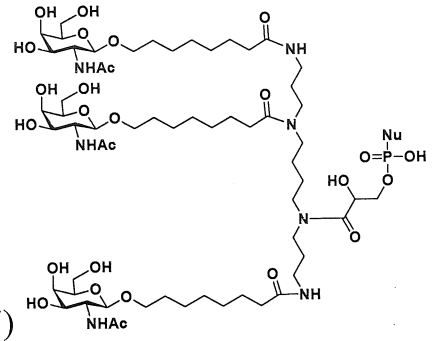
Công thức (15)



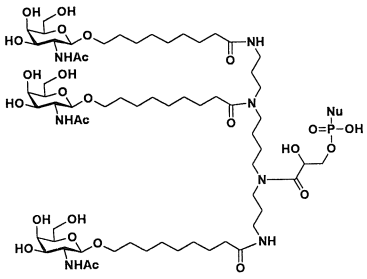
Công thức (16)



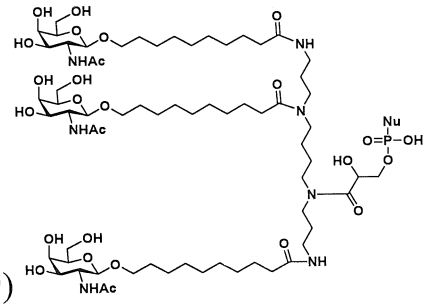
Công thức (17)



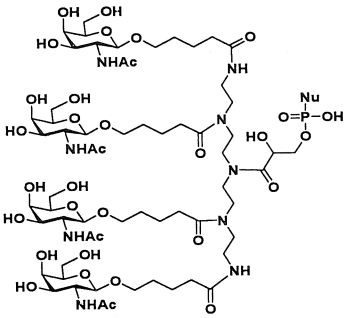
Công thức (18)



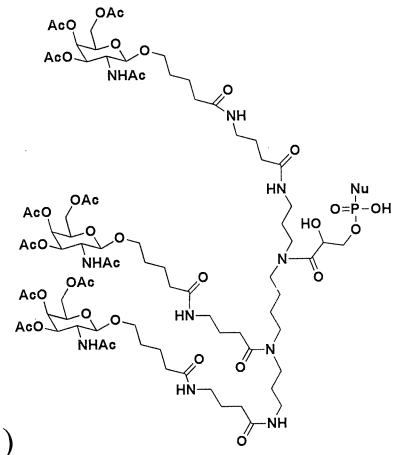
Công thức (19)



Công thức (20)



Công thức (21)



Công thức (22).

23. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 22, trong đó nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với vùng đầu tận của chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa của siARN, đề cập đến 4 nucleotit gần nhất với đầu tận của chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa.

24. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 23, trong đó nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa của siARN.

25. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24, trong đó nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với đầu tận 3’ của chuỗi có nghĩa của siARN.

26. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25, trong đó nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với vị trí 2', 3', hoặc 5' của nucleotit trong siARN bằng cách tạo thành liên kết phosphodieste.

27. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 26, trong đó trình tự nucleotit 1 có không nhiều hơn 1 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:155; và/hoặc trình tự nucleotit 2 có không nhiều hơn 1 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156.

28. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 27, trong đó sự khác biệt về nucleotit giữa trình tự nucleotit 2 và trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156 bao gồm sự khác biệt ở vị trí của Z'_B, trong đó Z'_B được chọn từ A, C hoặc G.

29. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 28, trong đó Z_A là nucleotit bổ sung cho Z'_B.

30. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 29, trong đó trình tự nucleotit 1 về cơ bản bổ sung đảo, gần như bổ sung đảo, hoặc hoàn toàn bổ sung đảo với trình tự nucleotit 2.

31. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 30, trong đó chuỗi có nghĩa cũng chứa trình tự nucleotit 3, và chuỗi đối nghĩa cũng chứa trình tự nucleotit 4; mỗi trình tự nucleotit 3 và 4 có chiều dài là 1 đến 4 nucleotit; trình tự nucleotit 3 được liên kết với đầu tận 5' của trình tự nucleotit 1, và trình tự nucleotit 4 được liên kết với đầu tận 3' của trình tự nucleotit 2; trình tự nucleotit 3 có cùng chiều dài và gần như bổ sung đảo hoặc hoàn toàn bổ sung đảo với trình tự nucleotit 4.

32. Thể liên hợp siARN theo điểm 31, trong đó trình tự nucleotit 3 và trình tự nucleotit 4 đều có chiều dài là 1 nucleotit; bazơ của trình tự nucleotit 3 là A;

trình tự nucleotit 3 và trình tự nucleotit 4 đều có chiều dài là 2 nucleotit; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', bazơ của trình tự nucleotit 3 là G và A nối tiếp nhau;

trình tự nucleotit 3 và trình tự nucleotit 4 đều có chiều dài là 3 nucleotit; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', bazơ của trình tự nucleotit 3 là C, G và A nối tiếp nhau; hoặc

trình tự nucleotit 3 và trình tự nucleotit 4 đều có chiều dài là 4 nucleotit; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', bazơ của trình tự nucleotit 3 là C, C, G và A nối tiếp nhau.

33. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 32, trong đó siARN cũng chứa trình tự nucleotit 5, có chiều dài là 1 đến 3 nucleotit và được liên kết với đầu tận 3' của chuỗi đối nghĩa, từ đó tạo thành phần nhô ra 3' của chuỗi đối nghĩa.

34. Thể liên hợp siARN theo điểm 33, trong đó trình tự nucleotit 5 có chiều dài là 2 nucleotit; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', trình tự nucleotit 5 là 2 thymidin deoxyribonucleotit liên tục, 2 uridin ribonucleotit liên tục, hoặc 2 nucleotit bổ sung với mARN đích.

35. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 34, trong đó chuỗi có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:1, và chuỗi đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO: 4:

5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAZ$_A$ -3' (SEQ ID NO: 1);

5'- Z'$_B$ UUGAAGUAUGCCUCAAGGUU -3' (SEQ ID NO: 3);

5'- Z'$_B$ UUGAAGUAUGCCUCAAGGUC -3' (SEQ ID NO: 4);

trong đó, nucleotit Z'$_B$ là nucleotit thứ nhất từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa; Z$_A$ được chọn từ A, U, G hoặc C; và Z'$_B$ là nucleotit bổ sung cho Z$_A$.

36. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 35, trong đó siARN là siHBa1 hoặc siHBa2:

siHBa1

Chuỗi có nghĩa: 5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAA-3' (SEQ ID NO: 5),

Chuỗi đối nghĩa: 5'-UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU-3' (SEQ ID NO: 6),

siHBa2

Chuỗi có nghĩa: 5'-GACCUUGAGGCAUACUUCAAA-3' (SEQ ID NO: 7),

Chuỗi đối nghĩa: 5'-UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCGG-3' (SEQ ID NO: 8).

37. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 36, trong đó ít nhất một nucleotit trong chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi, và/hoặc ít nhất một nhóm phosphat là nhóm phosphat có biến đổi.

38. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 37, trong đó mỗi nucleotit trong chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa độc lập là nucleotit biến đổi có flo hoặc nucleotit biến đổi không có flo; "nucleotit biến đổi có flo" đề cập đến nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nucleotit có flo; "nucleotit biến đổi không có flo" đề cập đến nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nucleotit với nhóm ngoài floro, hoặc chất tương tự nucleotit.

39. Thể liên hợp siARN theo điểm 38, trong đó nucleotit biến đổi có flo được đặt trong trình tự nucleotit 1 và 2; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 là nucleotit biến đổi có flo; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 là nucleotit biến đổi có flo.

40. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 39, trong đó, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 hoặc 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi không có flo; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 hoặc 2, 6, 8, 9, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi không có flo.

41. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 38 đến 40, trong đó mỗi nucleotit biến đổi không có flo độc lập là nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nó bằng nhóm không chứa flo, hoặc chất tương tự nucleotit.

42. Thể liên hợp siARN theo điểm 41, trong đó nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nhóm không chứa flo được chọn từ nucleotit biến đổi 2'-alkoxy, nucleotit biến đổi alkoxy được thế ở vị trí 2', nucleotit biến đổi 2'-alkyl, nucleotit biến đổi alkyl được thế ở vị trí 2', nucleotit biến đổi 2'-amino, nucleotit biến đổi amino được thế ở vị trí 2', hoặc 2'-deoxy nucleotit; và chất tương tự nucleotit được chọn từ isonucleotit, LNA, ENA, cET, UNA hoặc GNA.

43. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 38 đến 42, trong đó mỗi nucleotit biến đổi không có flo là nucleotit biến đổi metoxy, đề cập đến nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza với nhóm metoxy.

44. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 43, trong đó, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi metoxy; và nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi metoxy;

theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi metoxy; và nucleotit tại các vị trí 2, 6, 8, 9, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi metoxy; hoặc

theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 trong chuỗi có nghĩa của siARN là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi metoxy;

và nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi metoxy.

45. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 44, trong đó siARN là siHBa1M1, siHBa1M2, siHBa2M1 hoặc siHBa2M2:

siHBa1M1

Chuỗi có nghĩa:

5'-CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm-3' (SEQ ID NO: 9),

Chuỗi đối nghĩa:

5'-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm -3' (SEQ ID NO: 10),

siHBa1M2

Chuỗi có nghĩa:

5'- CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3' (SEQ ID NO: 11),

Chuỗi đối nghĩa:

5'-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm -3' (SEQ ID NO: 12),

siHBa2M1

Chuỗi có nghĩa:

5'-GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3' (SEQ ID NO: 13),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-
UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm -3’
(SEQ ID NO: 14),

siHBa2M2

Chuỗi có nghĩa:

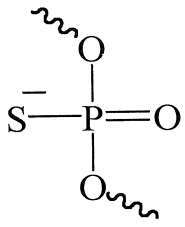
5’-GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’
(SEQ ID NO: 15),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-
UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm -3’
(SEQ ID NO: 16),

trong đó, C, G, U, và A chỉ chế phẩm bazơ của nucleotit; m chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái m là nucleotit biến đổi metoxy; f chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái f là nucleotit biến đổi có flo.

46. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 37 đến 45, trong đó nhóm phosphat có biến đổi là nhóm phosphorothioat có cấu trúc như được thể hiện bằng công thức (101):



Công thức (101).

47. Thể liên hợp siARN theo điểm 46, trong đó, trong siARN, liên kết phosphorothioat tồn tại trong ít nhất một vị trí trong số các vị trí sau:

vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai tại đầu tận 5’ của chuỗi có nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba tại đầu tận 5’ của chuỗi có nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai tại đầu tận 3’ của chuỗi có nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba tại đầu tận 3’ của chuỗi có nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai tại đầu tận 5’ của chuỗi đối nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba tại đầu tận 5’ của chuỗi đối nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai tại đầu tận 3’ của chuỗi đối nghĩa; và

vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba tại đầu tận 3’ của chuỗi đối nghĩa.

48. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 47, trong đó siARN là siHBa1M1S, siHBa1M2S, siHBa2M1S hoặc siHBa2M2S:

siHBa1M1S

Chuỗi có nghĩa:

5’-CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 17),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm -3’ (SEQ ID NO: 18),

siHBa1M2S

Chuỗi có nghĩa:

5’-CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 19),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm -3’ (SEQ ID NO: 20),

siHBa2M1S

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 21),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm -3’ (SEQ ID NO: 22),

siHBa2M2S

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 23),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm -3’ (SEQ ID NO: 24),

trong đó, C, G, U, và A chỉ chế phẩm bazơ của nucleotit; m chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái m là nucleotit biến đổi metoxy; f chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái f là nucleotit biến đổi có flo; s đại diện hai nucleotit liền kề với các bên của chữ cái s được liên kết bằng liên kết phosphorothioat.

49. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 48, trong đó đầu tận 5’ nucleotit trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit 5’-phosphat hoặc nucleotit biến đổi tương tự 5’-phosphat.

50. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 49, trong đó siARN là bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm siHBa1M1P1, siHBa1M2P1, siHBa2M1P1, siHBa2M2P1, siHBa1M1SP1, siHBa1M2SP1, siHBa2M1SP1, và siHBa2M2SP1:

siHBa1M1P1

Chuỗi có nghĩa:

5’-CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 25),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm -3’ (SEQ ID NO: 26),

siHBa1M2P1

Chuỗi có nghĩa:

5’-CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 27),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm -3’ (SEQ ID NO: 28),

siHBa2M1P1

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 29),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmC mGmGm -3’ (SEQ ID NO: 30),

siHBa2M2P1

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 31),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm -3’ (SEQ ID NO: 32),

siHBa1M1SP1

Chuỗi có nghĩa:

5’-CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 33),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm -3’ (SEQ ID NO: 34),

siHBa1M2SP1

Chuỗi có nghĩa:

5’-CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 35),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm -3’ (SEQ ID NO: 36),

siHBa2M1SP1

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 37),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm-3’ (SEQ ID NO: 38),

siHBa2M2SP1

Chuỗi có nghĩa:

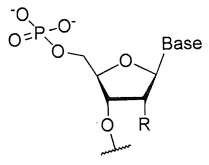
5’-GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 39),

Chuỗi đối nghĩa:

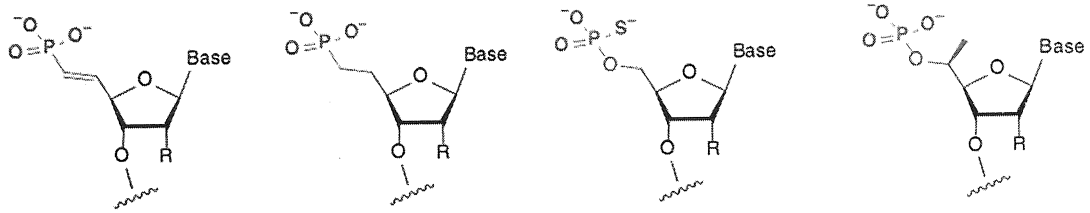
5’-P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm -3’ (SEQ ID NO: 40),

trong đó, C, G, U, và A chỉ chế phẩm bazơ của nucleotit; m chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái m là nucleotit biến đổi metoxy; f chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái f là nucleotit biến đổi có flo; s đại diện hai nucleotit liền kề với các bên của chữ cái s được liên kết bằng liên kết phosphorothioat; P1 đại diện nucleotit liền kề với phía bên phải của P1 là nucleotit 5’-phosphat hoặc nucleotit biến đổi tương tự 5’-phosphat.

51. Thể liên hợp siARN theo điểm 49 hoặc 50, trong đó nucleotit 5’-phosphat hoặc nucleotit biến đổi tương tự 5’-phosphat là nucleotit được đại diện bởi một trong số các công thức sau:



(102)



Công thức (103) Công thức (104) Công thức (105) Công thức (106),

trong đó,

R đại diện nhóm được chọn từ nhóm bao gồm H, OH, F và metoxy;

"Bazơ" đại diện bazơ được chọn từ A, U, C, G, hoặc T.

52. SiARN có khả năng ức chế sự biểu hiện của gen HBV, bao gồm chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa, cả chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa đều bao gồm nucleotit biến đổi có flo và nucleotit biến đổi không có flo; trong đó chuỗi có nghĩa bao gồm đoạn trình tự nucleotit I; chuỗi đối nghĩa bao gồm đoạn trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II bổ sung đảo ít nhất một phần để tạo thành vùng chuỗi kép; trong đó, trình tự nucleotit I bao gồm trình tự nucleotit A, có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:155; và trình tự nucleotit II chứa trình tự nucleotit B, có cùng chiều dài và không nhiều hơn 3 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156:

5'- CCUUGAGGCAUACUUCAAZ -3' (SEQ ID NO: 155);

5'- Z'UUGAAGUAUGCCUCAAGG -3' (SEQ ID NO: 156);

trong đó,

Z là A; Z' là U;

trình tự nucleotit A chứa nucleotit Z_A tại vị trí tương ứng với Z;

trình tự nucleotit B chứa nucleotit Z'_B tại vị trí tương ứng với Z'; nucleotit Z'_B là nucleotit thứ nhất từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa;

nucleotit biến đổi có flo được đặt trong trình tự nucleotit A và B;

theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 là nucleotit biến đổi có flo; và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 là nucleotit biến đổi có flo.

53. SiARN theo điểm 52, trong đó trình tự nucleotit A có không nhiều hơn 1 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:155; và/hoặc trình tự nucleotit B có không nhiều hơn 1 nucleotit khác với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156.

54. SiARN theo điểm 52 hoặc 53, trong đó sự khác biệt về nucleotit giữa trình tự nucleotit B và trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:156 bao gồm sự khác biệt tại vị trí của Z'_B, trong đó Z'_B được chọn từ A, C hoặc G.

55. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 54, trong đó Z_A là nucleotit bổ sung cho Z'_B.

56. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 55, trong đó trình tự nucleotit A về cơ bản bổ sung đảo, gần như bổ sung đảo, hoặc hoàn toàn bổ sung đảo với trình tự nucleotit B; "về cơ bản bổ sung đảo" đề cập đến không nhiều hơn 3 sự bắt cặp nhầm bazơ trong hai trình tự nucleotit; "gần như bổ sung đảo" đề cập đến không nhiều hơn 1 sự bắt cặp nhầm bazơ trong hai trình tự nucleotit; và "hoàn toàn bổ sung đảo" đề cập đến không bắt cặp nhầm trong hai trình tự nucleotit.

57. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 56, trong đó trình tự nucleotit A là trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 1; và trình tự nucleotit B là trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 2:

5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAZ_A-3' (SEQ ID NO: 1);

5'-Z'_BUUGAAGUAUGCCUCAAGG -3' (SEQ ID NO: 2);

trong đó, Z_A được chọn từ A, U, G hoặc C; và Z'_B là nucleotit bổ sung cho Z_A.

58. SiARN theo điểm 57, trong đó Z_A là A; và Z'_B là U.

59. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 58, trong đó trình tự nucleotit I cũng chứa trình tự nucleotit III; và trình tự nucleotit II cũng chứa trình tự nucleotit IV;

mỗi trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV độc lập có chiều dài là 1 đến 4 nucleotit; trình tự nucleotit III được liên kết với đầu tận 5' của trình tự nucleotit A; trình tự nucleotit IV được liên kết với đầu tận 3' của trình tự nucleotit B; và trình tự nucleotit III có cùng chiều dài và gần như bổ sung đảo hoặc hoàn toàn bổ sung đảo với trình tự nucleotit IV; "gần như bổ sung đảo" đề cập đến không nhiều hơn 1 sự bắt cặp nhầm bazơ trong hai trình tự nucleotit; và "hoàn toàn bổ sung đảo" đề cập đến không bắt cặp nhầm trong hai trình tự nucleotit.

60. SiARN theo điểm 59, trong đó trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài là 1 nucleotit, và bazơ của trình tự nucleotit III là A;

trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài là 2 nucleotit; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', bazơ của trình tự nucleotit III là G và A nối tiếp nhau;

trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài là 3 nucleotit; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', bazơ của trình tự nucleotit III là C, G và A nối tiếp nhau; hoặc

trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài là 4 nucleotit; theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', bazơ của trình tự nucleotit III là C, C, G, và A nối tiếp nhau.

61. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 60, trong đó trình tự nucleotit II cũng chứa trình tự nucleotit V, có chiều dài là 1 đến 3 nucleotit và được liên kết với đầu tận 3' của chuỗi đối nghĩa, từ đó tạo thành phần nhô ra 3' của chuỗi đối nghĩa.

62. SiARN theo điểm 61, trong đó trình tự nucleotit V có chiều dài là 2 nucleotit.

63. SiARN theo điểm 61 hoặc 62, trong đó trình tự nucleotit V bổ sung với mARN đích, hoặc theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', trình tự nucleotit V là 2 thymidin deoxyribonucleotit liên tục hoặc 2 uridin ribonucleotit liên tục.

64. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 63, trong đó chuỗi có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:1, và chuỗi đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO: 4:

5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAZ$_A$-3' (SEQ ID NO: 1);

5'- Z'$_B$ UUGAAGUAUGCCUCAAGGUU-3' (SEQ ID NO: 3);

5'- Z'$_B$ UUGAAGUAUGCCUCAAGGUC-3' (SEQ ID NO: 4);

trong đó, nucleotit Z'$_B$ là nucleotit thứ nhất từ đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa; Z$_A$ được chọn từ A, U, G hoặc C; và Z'$_B$ là nucleotit bổ sung cho Z$_A$.

65. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 64, trong đó siARN là siHBa1 hoặc siHBa2:

siHBa1

Chuỗi có nghĩa: 5'- CCUUGAGGCAUACUUCAAA-3' (SEQ ID NO: 5),

Chuỗi đối nghĩa: 5'- UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU-3' (SEQ ID NO: 6),

siHBa2

Chuỗi có nghĩa: 5'- GACCUUGAGGCAUACUUCAAA-3' (SEQ ID NO: 7),

Chuỗi đối nghĩa: 5'- UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCGG-3' (SEQ ID NO: 8).

66. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 65, trong đó, theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit tại các vị trí 7, 8 và 9 hoặc 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit A trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi có nghĩa là nucleotit biến đổi không có flo; và nucleotit tại các vị trí 2, 6, 14 và 16 hoặc 2, 6, 8, 9, 14 và 16 của trình tự nucleotit B trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi có flo, và nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit biến đổi không có flo.

67. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 66, trong đó mỗi nucleotit biến đổi không có flo độc lập là nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nó bằng nhóm không chứa flo, hoặc chất tương tự nucleotit.

68. SiARN theo điểm 67, trong đó nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nhóm không chứa flo được chọn từ nucleotit biến đổi 2'-alkoxy, nucleotit biến đổi alkoxy được thế ở vị trí 2', nucleotit biến đổi 2'-alkyl, nucleotit biến đổi alkyl được thế ở vị trí 2', nucleotit biến đổi 2'-amino, nucleotit biến đổi amino được thế ở vị trí 2', hoặc nucleotit 2'-deoxy; và chất tương tự nucleotit được chọn từ isonucleotit, LNA, ENA, cET, UNA hoặc GNA.

69. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 68, trong đó mỗi nucleotit biến đổi không có flo là nucleotit biến đổi metoxy, đề cập đến nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza với nhóm metoxy.

70. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 69, trong đó siARN là siHBa1M1, siHBa1M2, siHBa2M1 hoặc siHBa2M2:

siHBa1M1

Chuỗi có nghĩa:

5'- CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm-3' (SEQ ID NO: 9),

Chuỗi đối nghĩa:

5'-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm -3' (SEQ ID NO: 10),

siHBa1M2

Chuỗi có nghĩa:

5'- CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm-3' (SEQ ID NO: 11),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm-3’ (SEQ ID NO: 12),

siHBa2M1

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm-3’ (SEQ ID NO: 13),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm-3’ (SEQ ID NO: 14),

siHBa2M2

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 15),

Chuỗi đối nghĩa:

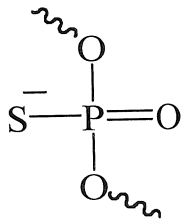
5’-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm -3’ (SEQ ID NO: 16),

trong đó, C, G, U, và A chỉ chế phẩm bazơ của nucleotit; m chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái m là nucleotit biến đổi metoxy; f chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái f là nucleotit biến đổi có flo.

71. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 70, trong đó ít nhất một trong số các nhóm phosphat trong khung phosphat-riboza của ít nhất một chuỗi đơn trong chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa là nhóm phosphat có nhóm biến đổi.

72. SiARN theo điểm 71, trong đó nhóm phosphat có nhóm biến đổi là nhóm phosphorothioat được tạo thành bằng cách thế ít nhất một nguyên tử oxy trong liên kết phosphodieste trong nhóm phosphat với nguyên tử lưu huỳnh.

73. SiARN theo điểm 71 hoặc 72, trong đó nhóm phosphat có biến đổi là nhóm phosphorothioat có cấu trúc như được thể hiện bằng công thức (101):



Công thức (101).

74. SiARN theo điểm 72 hoặc 73, trong đó, trong siARN, liên kết phosphorothioat tồn tại trong ít nhất một vị trí trong các vị trí sau:

vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai tại đầu tận 5' của chuỗi có nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba tại đầu tận 5' của chuỗi có nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai tại đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba tại đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai tại đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba tại đầu tận 5' của chuỗi đối nghĩa;

vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai tại đầu tận 3' của chuỗi đối nghĩa; và

vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba tại đầu tận 3' của chuỗi đối nghĩa.

75. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 74, trong đó siARN là siHBa1M1S, siHBa1M2S, siHBa2M1S hoặc siHBa2M2S:

siHBa1M1S

Chuỗi có nghĩa:

5'-CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm-3' (SEQ ID NO: 17),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm -3’ (SEQ ID NO: 18),

siHBa1M2S

Chuỗi có nghĩa:

5’-CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 19),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm -3’ (SEQ ID NO: 20),

siHBa2M1S

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 21),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm -3’ (SEQ ID NO: 22),

siHBa2M2S

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 23),

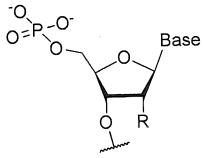
Chuỗi đối nghĩa:

5’-
UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm -3’
(SEQ ID NO: 24),

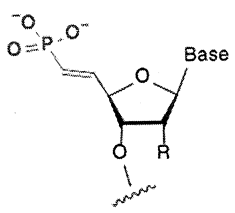
trong đó, C, G, U, và A chỉ chế phẩm bazơ của nucleotit; m chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái m là nucleotit biến đổi metoxy; f chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái f là nucleotit biến đổi có flo; s đại diện hai nucleotit liền kề với các bên của chữ cái s được liên kết bằng liên kết phosphorothioat.

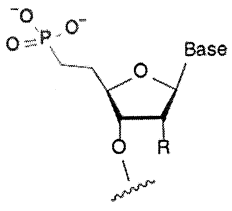
76. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 75, trong đó đầu tận 5’ nucleotit trong chuỗi đối nghĩa là nucleotit 5’-phosphat hoặc nucleotit biến đổi tương tự 5’-phosphat.

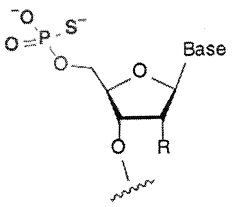
77. SiARN theo điểm 76, trong đó nucleotit 5’-phosphat là nucleotit như được thể hiện bởi công thức (102); và nucleotit biến đổi tương tự 5’-phosphat là nucleotit được đại diện bởi bất kỳ một công thức trong số các công thức từ (103) đến (106):

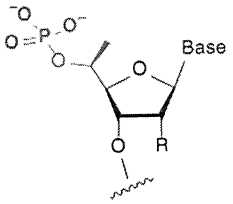


(102)









Công thức (103) Công thức (104) Công thức (105) Công thức (106),

trong đó,

R đại diện nhóm được chọn từ nhóm bao gồm H, OH, metoxy hoặc F;

“Bazơ” đại diện bazơ được chọn từ A, U, C, G, hoặc T.

78. SiARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 77, trong đó siARN là bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm siHBa1M1P1, siHBa1M2P1, siHBa2M1P1, siHBa2M2P1, siHBa1M1SP1, siHBa1M2SP1, siHBa2M1SP1, và siHBa2M2SP1:

siHBa1M1P1

Chuỗi có nghĩa:

5'-CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3' (SEQ ID NO: 25),

Chuỗi đối nghĩa:

5'-P1-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm -3' (SEQ ID NO: 26),

siHBa1M2P1

Chuỗi có nghĩa:

5'-CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3' (SEQ ID NO: 27),

Chuỗi đối nghĩa:

5'-P1-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm -3' (SEQ ID NO: 28),

siHBa2M1P1

Chuỗi có nghĩa:

5'-GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3' (SEQ ID NO: 29),

Chuỗi đối nghĩa:

5'-P1-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmC mGmGm -3' (SEQ ID NO: 30),

siHBa2M2P1

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 31),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm -3’ (SEQ ID NO: 32),

siHBa1M1SP1

Chuỗi có nghĩa:

5’-CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 33),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm -3’ (SEQ ID NO: 34),

siHBa1M2SP1

Chuỗi có nghĩa:

5’-CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 35),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm -3’ (SEQ ID NO: 36),

siHBa2M1SP1

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 37),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm-3’ (SEQ ID NO: 38),

siHBa2M2SP1

Chuỗi có nghĩa:

5’-GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm -3’ (SEQ ID NO: 39),

Chuỗi đối nghĩa:

5’-P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm -3’ (SEQ ID NO: 40),

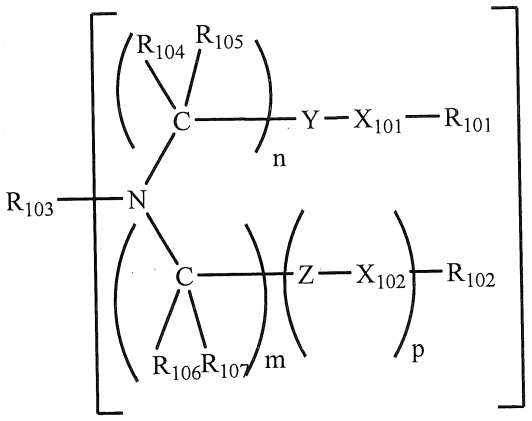
trong đó, C, G, U, và A chỉ chế phẩm bazơ của nucleotit; m chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái m là nucleotit biến đổi metoxy; f chỉ nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái f là nucleotit biến đổi có flo; s đại diện hai nucleotit liền kề với các bên của chữ cái s được liên kết bằng liên kết phosphorothioat; P1 đại diện nucleotit liền kề với phía bên phải của P1 là nucleotit 5’-phosphat hoặc nucleotit biến đổi tương tự 5’-phosphat.

79. Dược phẩm, khác biệt ở chỗ, dược phẩm chứa siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 78 và chất mang dược dụng.

80. Dược phẩm theo điểm 79, trong đó tỷ lệ khối lượng của siARN với chất mang dược dụng là 1: (1-500).

81. Dược phẩm theo điểm 80, trong đó tỷ lệ khối lượng của siARN với chất mang dược dụng là 1: (1-50).

82. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 79 đến 81, trong đó chất mang dược dụng chứa amin hữu cơ, lipit trợ giúp và lipit được PEG hóa; trong đó, amin hữu cơ là hợp chất như được thể hiện bởi công thức (201) và/hoặc muối dược dụng của nó:



Công thức (201),

trong đó:

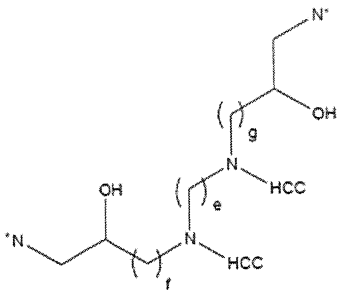
mỗi X_{101} và X_{102} độc lập được chọn từ O, S, N-A hoặc C-A, trong đó A là hydro hoặc chuỗi C_1-C_{20} hydrocacbonn;

mỗi Y và Z độc lập được chọn từ C=O, C=S, S=O, CH-OH hoặc SO_2;

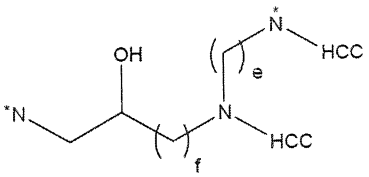
mỗi R_{101}, R_{102}, R_{103}, R_{104}, R_{105}, R_{106} và R_{107} độc lập được chọn từ hydro; nhóm béo được thế hoặc không được thế, có nhánh hoặc không có nhánh, có vòng hoặc không có vòng; nhóm béo khác loại được thế hoặc không được thế, có nhánh hoặc không có nhánh, có vòng hoặc không có vòng; nhóm axyl được thế hoặc không được thế, có nhánh hoặc không có nhánh; nhóm aryl được thế hoặc không được thế, có nhánh hoặc không có nhánh, hoặc nhóm aryl khác loại được thế hoặc không được thế, có nhánh hoặc không có nhánh;

x là số nguyên từ 1 đến 10;

n là số nguyên từ 1 đến 3, m là số nguyên từ 0 đến 20, p là số nguyên 0 hoặc 1, trong đó nếu m và p là 0, thì R_{102} là hydro, và nếu ít nhất một trong số n và m có giá trị là 2, thì R_{103} và nitơ trong công thức (201) tạo thành cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (202) hoặc (203):



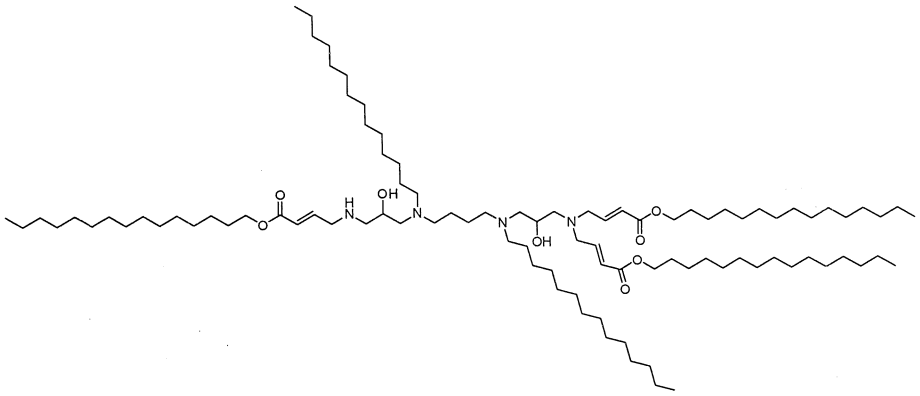
Công thức (202)



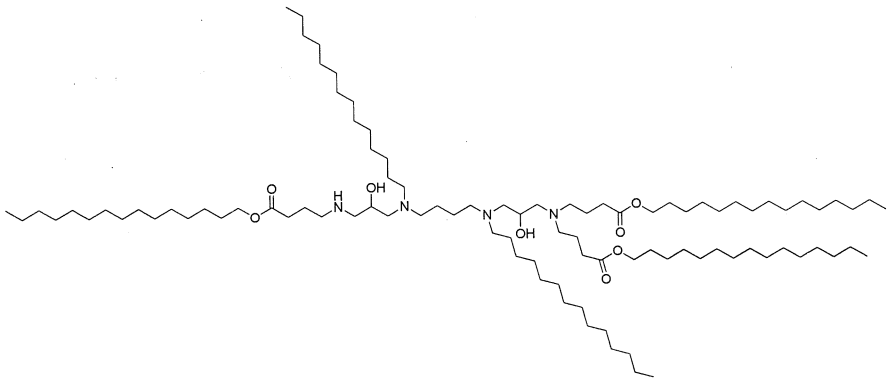
Công thức (203);

trong đó, mỗi g, e và f độc lập là số nguyên từ 1 đến 6; "HCC" đại diện chuỗi hydrocacbon; và mỗi *N chỉ nguyên tử nitơ trong công thức (201).

83. Dược phẩm theo điểm 82, trong đó amin hữu cơ có thể là amin hữu cơ như được thể hiện bởi công thức (214) và/hoặc amin hữu cơ như được thể hiện bởi công thức (215):



Công thức (214),



Công thức (215);

lipit trợ giúp là cholesteol, chất tương tự và/hoặc dẫn xuất của nó; và lipit được PEG hóa là 1,2-dipalmitoyl-sn-glyxero-3-phosphoetanolamin-N-[metoxy (polyetylen glycol)]-2000.

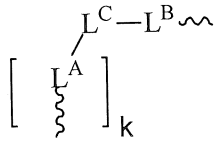
84. Dược phẩm theo điểm 82 hoặc 83, trong đó tỷ lệ mol trong số amin hữu cơ, lipit trợ giúp, và lipit được PEG hóa là (19,7-80): (19,7-80): (0,3-50).

85. Dược phẩm theo điểm 84, trong đó tỷ lệ mol trong số amin hữu cơ, lipit trợ giúp, và lipit được PEG hóa là (50-70): (20-400): (3-20).

86. Thể liên hợp siARN, chứa siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 78 và nhóm liên hợp được liên kết liên hợp với siARN.

87. Thể liên hợp siARN theo điểm 86, trong đó nhóm liên hợp chứa nhóm gắn đích dược dụng và chất liên kết; và siARN, chất liên kết và nhóm gắn đích được liên kết đồng hóa trị nối tiếp nhau.

88. Thể liên hợp siARN theo điểm 86 hoặc 87, trong đó chất liên kết có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (301):

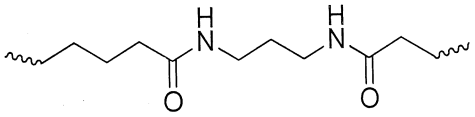


Công thức (301),

trong đó,

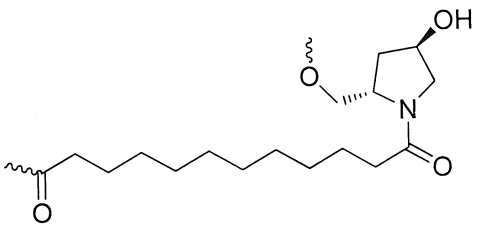
k là số nguyên từ 1 đến 3;

L^A là gốc mạch nhánh bao gồm liên kết amit có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (302), hai đầu tận tương ứng được liên kết với nhóm gắn đích và gốc L^C thông qua liên kết ete:



Công thức (302);

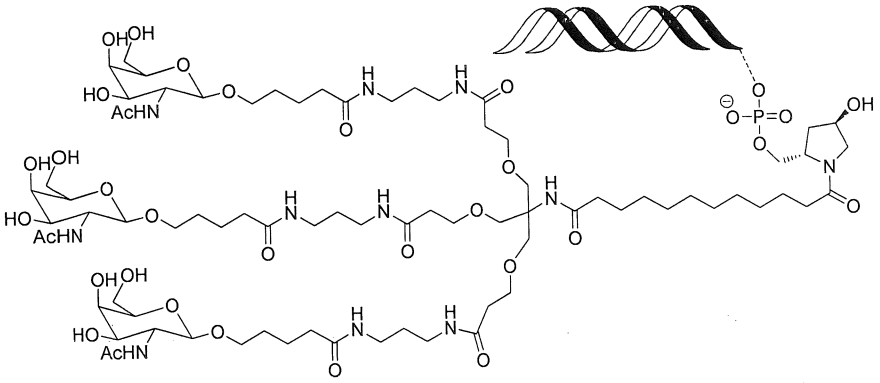
L^B là gốc mạch nhánh bao gồm N-axylpyrolidin có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (303), một đầu tận có nhóm cacbonyl và được liên kết với gốc L^C qua liên kết amit, và đầu tận khác có nhóm oxy và được liên kết với siARN qua liên kết phosphoeste:



Công thức (303);

L^C là nhóm liên kết hóa trị hai đến hóa trị ba dựa trên hydroxymetyl aminometan, dihydroxymetyl aminometan hoặc trihydroxymetyl aminometan, một đầu tận có thể được liên kết với mỗi gốc L^A qua liên kết ete bằng nguyên tử oxy, và đầu tận khác được liên kết với gốc L^B qua liên kết amit bằng nguyên tử nitơ.

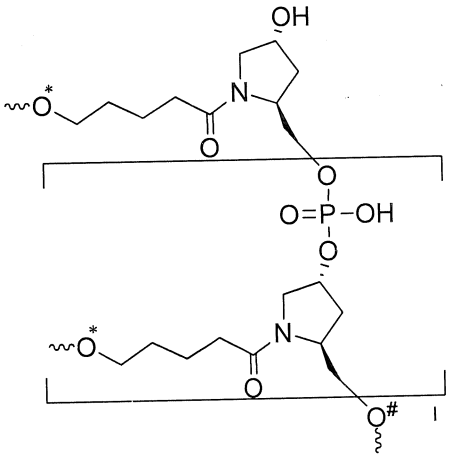
89. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 86 đến 88, trong đó thể liên hợp siARN có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (305):



Công thức (305),

trong đó, cấu trúc xoắn kép chỉ siARN.

90. Thể liên hợp siARN theo điểm 87, trong đó liên kết có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (306):



Công thức (306),

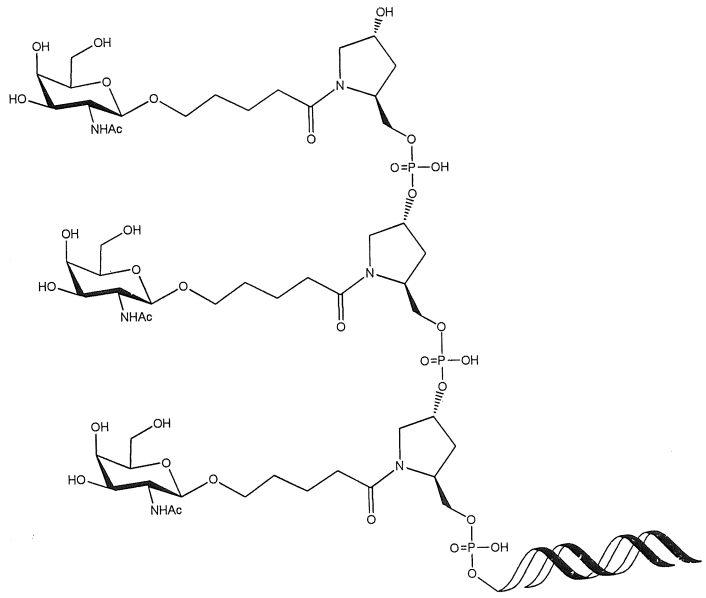
trong đó,

l là số nguyên từ 0 đến 5, tốt hơn là từ 0 đến 3;

* đại diện vị trí trên liên kết được liên kết với nhóm gắn đích thông qua liên kết ete; và

đại diện vị trí trên liên kết được liên kết với siARN thông qua liên kết phosphoeste.

91. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 86, 87 và 90, trong đó thể liên hợp siARN có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (307):



Công thức (307),

trong đó, cấu trúc xoắn kép chỉ siARN.

92. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 87 đến 91, trong đó liên kết được liên kết với đầu tận 3' của chuỗi có nghĩa của siARN.

93. Thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 87, 88, 90 và 92, trong đó mỗi nhóm gắn đích độc lập là phối tử liên kết với thụ thể asialoglycoprotein (ASGP-R) trên bề mặt của tế bào gan ở động vật có vú.

94. Thể liên hợp siARN theo điểm 93, trong đó mỗi nhóm gắn đích độc lập là asialoglycoprotein hoặc sacarit.

95. Thể liên hợp siARN theo điểm 94, trong đó mỗi nhóm gắn đích độc lập được chọn từ nhóm bao gồm D-mannopyranoza, L-mannopyranoza, D-arabinoza, D-xylofuranoza, L-xylofuranoza, D-glucoza, L-glucoza, D-galactoza, L-galactoza, α-D-mannofuranoza, β-D-mannofuranoza, α-D-mannopyranoza, β-D-mannopyranoza, α-D-glucopyranoza, β-D-glucopyranoza, α-D-glucofuranoza, β-D-glucofuranoza, α-D-fructofuranoza, α-D-fructopyranoza, α-D-galactopyranoza, β-D-galactopyranoza, α-D-galactofuranoza, β-

D-galactofuranoza, glucosamin, axit sialic, galactosamin, N-axetylgalactosamin, N-trifloroaxetylgalactosamin, N-propionylgalactosamin, N-n-butyrylgalactosamin, N-isobutyrylgalactosamin, 2-amino-3-O-[(R)-1-carboxyetyl] -2-deoxy-β-D-glucopyranoza, 2-deoxy-2-metylamino-L-glucopyranoza, 4,6- dideoxy-4-formamido-2,3-di-O-metyl-D-mannopyranoza, 2-deoxy-2-sulfoamino -D-glucopyranoza, axit N-glycolyl-α-neuraminic, 5-thio-β-D-glucopyranoza, metyl 2,3,4-tris-O-axetyl-1-thio-6-O-trityl-α-D-glucopyranosit, 4-thio-β-D-galactopyranoza, etyl 3,4,6,7-tetra-O-axetyl-2-deoxy-1,5-dithio-α-D-glucoheptopyranosit, 2,5-anhydro -D-allononitril, riboza, D-riboza, D-4-thioriboza, L-riboza, và L-4-thioriboza.

96. Thể liên hợp siARN theo điểm 95, trong đó ít nhất một hoặc mỗi nhóm gắn đích là galactoza hoặc N-axetylgalactosamin (GalNAc).

97. Bộ kit, bao gồm thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 51, siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 52 đến 78, dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 79 đến 85, và/hoặc thể liên hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 86 đến 96.

Danh mục trình tự

<110> Suzhou Ribo Life Science Co.,Ltd

<120> SIARN, THỂ LIÊN HỢP SIARN, DƯỢC PHẨM CHỨA SIARN VÀ BỘ KIT CHỨA THỂ LIÊN HỢP SIARN

<130> 11460pRIBO

<150> CN201711249333.8

<151> 01-12-2017

<150> CN201711482970.X

<151> 29-12-2018

<160> 156

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> misc_đặc tính

<222> (19)..(19)

<223> n là A, U, G hoặc C

<400> 1

ccuugaggca uacuucaan 19

<210> 2

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> misc_đặc tính

<222> (1)..(1)

<223> n là A, U, G hoặc C

<400> 2

nuugaaguau gccucaagg 19

<210> 3

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> misc_đặc tính

<222> (1)..(1)

<223> n là A, U, G hoặc C

<400> 3

nuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 4

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> misc_đặc tính

<222> (1)..(1)

<223> n là A, U, G hoặc C

<400> 4

nuugaaguau gccucaaggu c 21

<210> 5

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 5

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 6

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 6

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 7

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 7

gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 8

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 8

uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 9

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 9

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 10

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 10

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 11

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 11

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 12

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 12
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 13
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 13
gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 14
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 14
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 15
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 15
gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 16
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 16
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 17
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 17
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 18
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 18
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 19
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 19
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 20
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<400> 20
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 21

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 21

gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 22

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 22

uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 23

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 23

gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 24

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 24

uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 25

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 25

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 26

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 26

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 27

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 27

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 28

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 28

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 29

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 29
gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 30
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 30
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 31
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 31
gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 32
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 32
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 33
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 33
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 34
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 34
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 35
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 35
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 36
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 36
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 37
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 37
gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 38
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 38
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 39
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 39
gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 40
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 40
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 41
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<400> 41
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 42
<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 42

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 43

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 43

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 44

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 44

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 45

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 45

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 46

<211> 21

<212> ADN/ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 46
tuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 47
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 47
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 48
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 48
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 49
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 49
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 50
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 50

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 51

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 51

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 52

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 52

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 53

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 53

gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 54

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 54

uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 55
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 55
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 56
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 56
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 57
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 57
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 58
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 58
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 59
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 59
gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 60
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 60
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 61
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 61
gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 62
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<400> 62
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 63
<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 63

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 64

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 64

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 65

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 65

gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 66

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 66

uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 67

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 67
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 68
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 68
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 69
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 69
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 70
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 70
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 71
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 71

gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 72

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 72

uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 73

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 73

gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 74

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 74

uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 75

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 75

gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 76
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 76
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 77
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 77
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 78
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 78
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 79
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 79
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 80
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 80
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 81
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 81
gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 82
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 82
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 83
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 83
gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 84

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 84

uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 85

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 85

gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 86

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 86

uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 87

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 87

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 88

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 88
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 89
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 89
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 90
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 90
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 91
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 91
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 92
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 92

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 93

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 93

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 94

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 94

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 95

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 95

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 96

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 96

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 97

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 97

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 98

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 98

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 99

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 99

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 100

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 100

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 101

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 101

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 102

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 102

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 103

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 103

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 104

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 104

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 105

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 105

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 106

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 106

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 107

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 107

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 108

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 108

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 109

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 109
gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 110
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 110
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 111
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 111
gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 112
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<400> 112
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 113
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 113

gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 114

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 114

uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 115

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 115

gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 116

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 116

uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 117

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 117

gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 118
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 118
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 119
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 119
gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 120
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 120
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 121
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 121
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 122
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 122
uuugaaguau gccucaaggu c 21

<210> 123
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 123
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 124
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 124
uuugaaguau gccucaaggu c 21

<210> 125
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 125
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 126

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 126

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 127

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 127

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 128

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 128

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 129

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 129

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 130

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 130

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 131

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 131

ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 132

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 132

uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 133

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 133

gaccuugagg cauacuucaa a 21

<210> 134

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 134
uuugaaguau gccucaaggu cgg 23

<210> 135
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 135
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 136
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 136
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 137
<211> 21
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo
<400> 137
ccuugaggca uacuucaaat t 21

<210> 138
<211> 21
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 138

uuugaaguau gccucaaggt t 21

<210> 139

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 139

uucuccgaac gugucacgu 19

<210> 140

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 140

acgugacacg uucggagaau u 21

<210> 141

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 141

gugugcacuu cgcuucaca 19

<210> 142

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 142

ugugaagcga agugcacacu u 21

<210> 143
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 143
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 144
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 144
uuugaaguau gccucaaggu c 21

<210> 145
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 145
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 146
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 146
uuugaaguau gccucaaggu c 21

<210> 147
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 147
ccuugaggca uacuucaaa 19

<210> 148
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 148
uuugaaguau gccucaaggu u 21

<210> 149
<211> 21
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 149
ccuugaggca uacuucaaat t 21

<210> 150
<211> 21
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<400> 150
uuugaaguau gccucaaggt t 21

<210> 151

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 151

ccgtctgtgc cttctcatct 20

<210> 152

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 152

taatctcctc ccccaactcc 20

<210> 153

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 153

agcttctttg cagctccttc gttg 24

<210> 154

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 154

ttctgaccca ttcccaccat caca 24

<210> 155

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> misc_đặc tính

<222> (19)..(19)

<223> n为A

<400> 155

ccuugaggca uacuucaan 19

<210> 156

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> misc_đặc tính

<222> (1)..(1)

<223> n为U

<400> 156

nuugaaguau gccucaagg 19

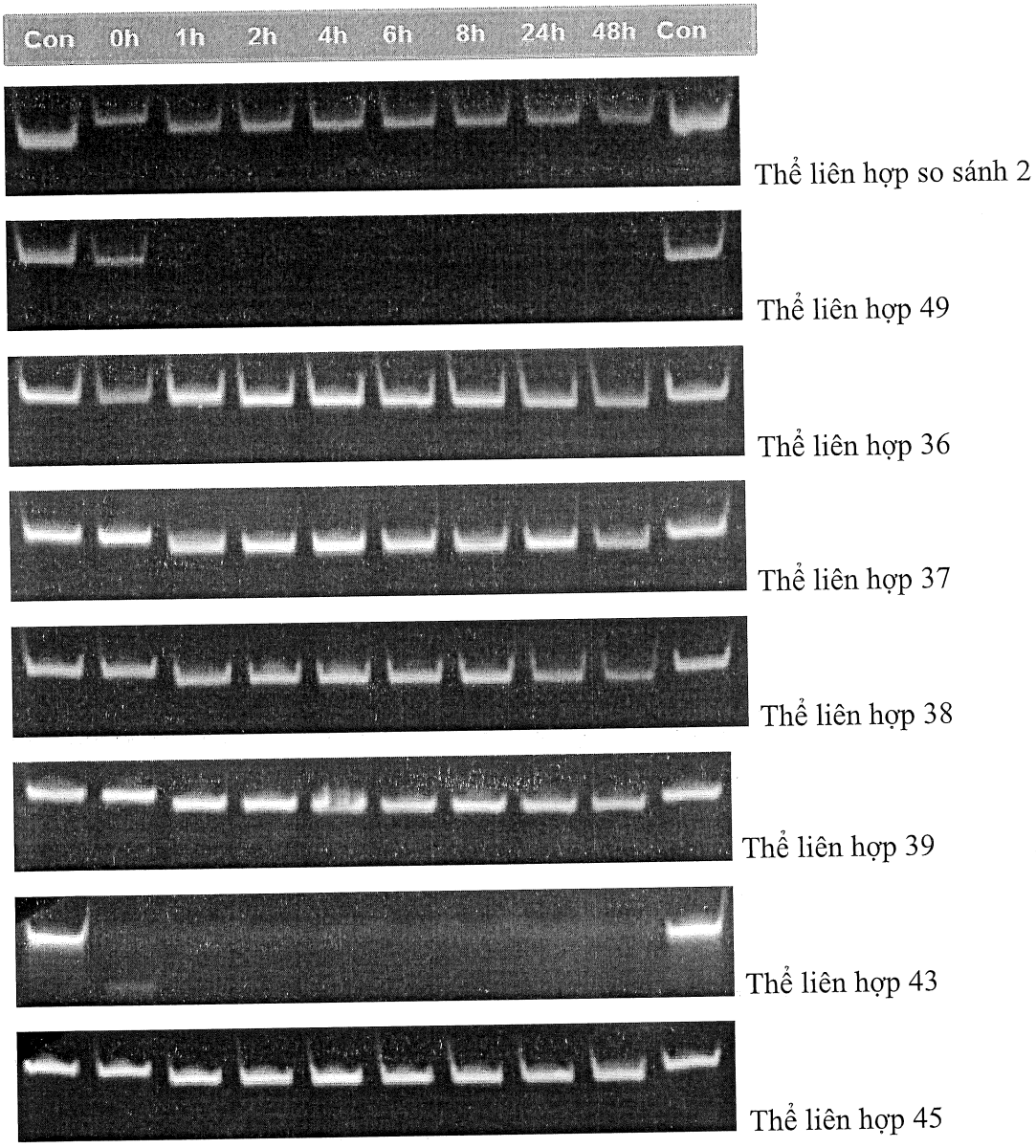

Con 0h 1h 2h 4h 6h 8h 24h 48h Con
Thể liên hợp so sánh 2
Thể liên hợp 49
Thể liên hợp 36
Thể liên hợp 37
Thể liên hợp 38
Thể liên hợp 39
Thể liên hợp 43
Thể liên hợp 45

Fig.1

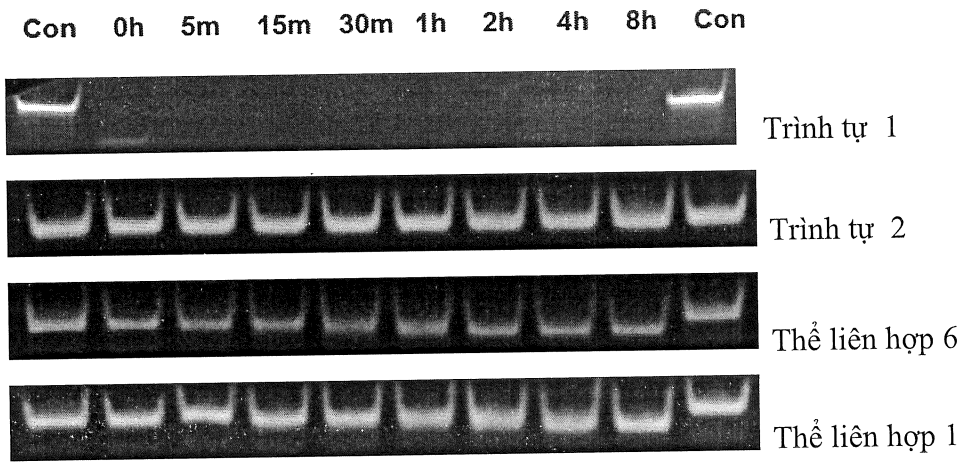

Con 0h 5m 15m 30m 1h 2h 4h 8h Con
Trình tự 1
Trình tự 2
Thể liên hợp 6
Thể liên hợp 1

Fig. 2

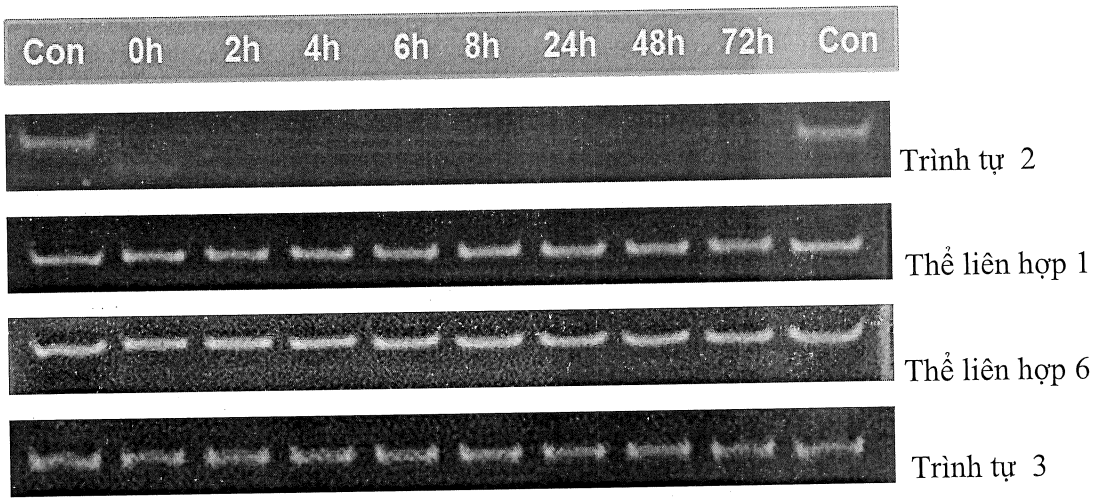

Con 0h 2h 4h 6h 8h 24h 48h 72h Con
Trình tự 2
Thể liên hợp 1
Thể liên hợp 6
Trình tự 3

Fig. 3

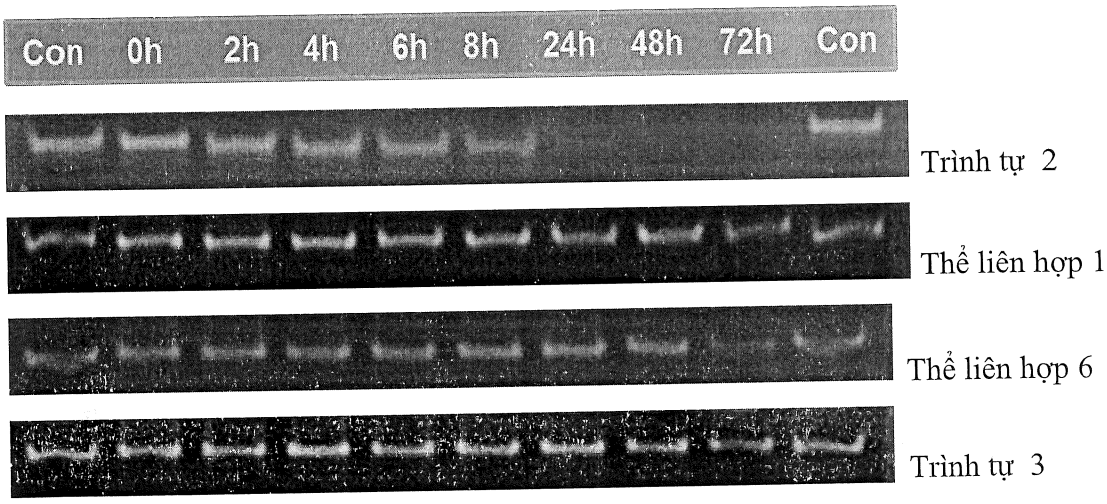


Fig. 4

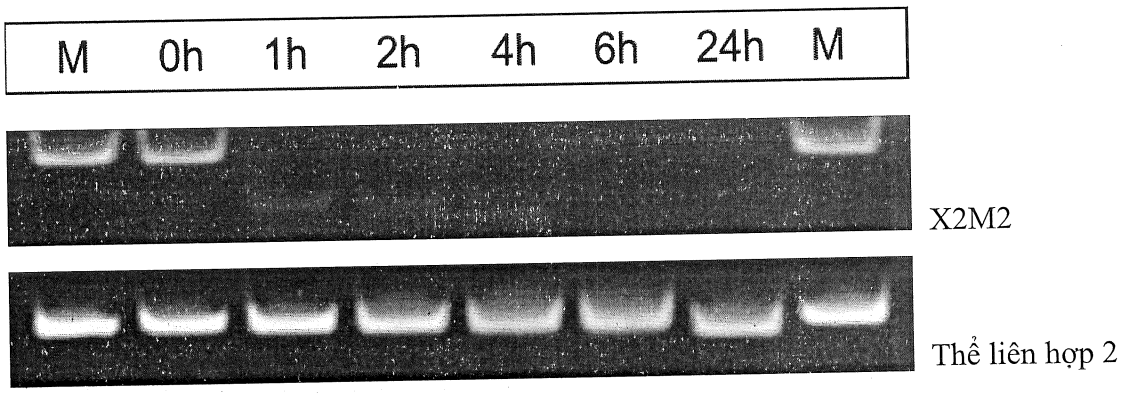


Fig. 5

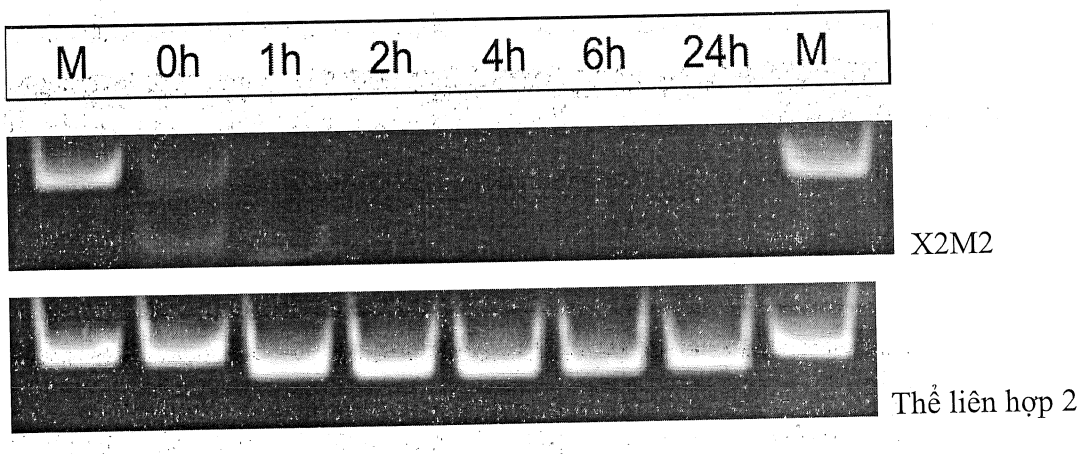


Fig. 6

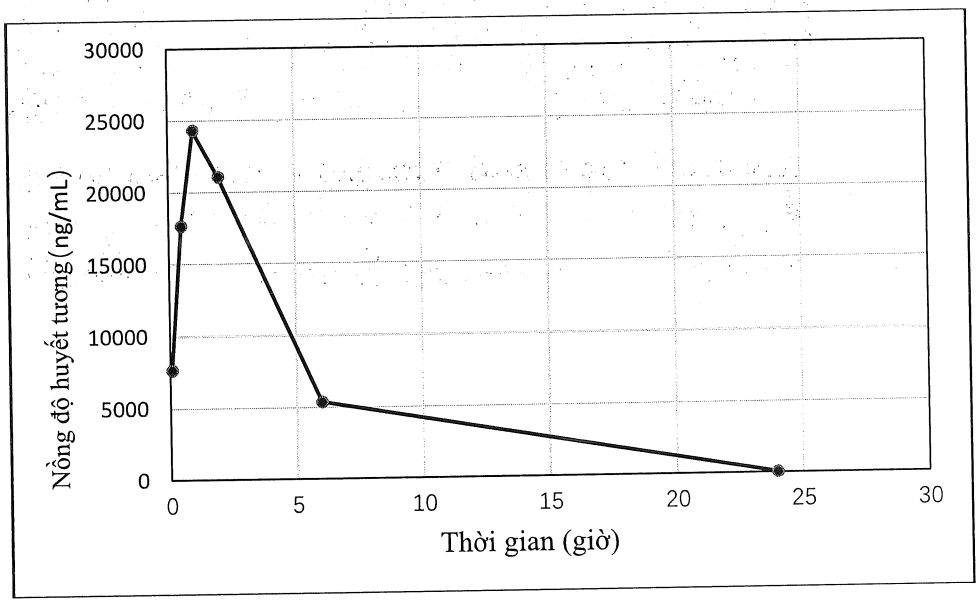

30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Nồng độ huyết tương (ng/mL)
0
5
10
15
20
25
30
Thời gian (giờ)

Fig. 7

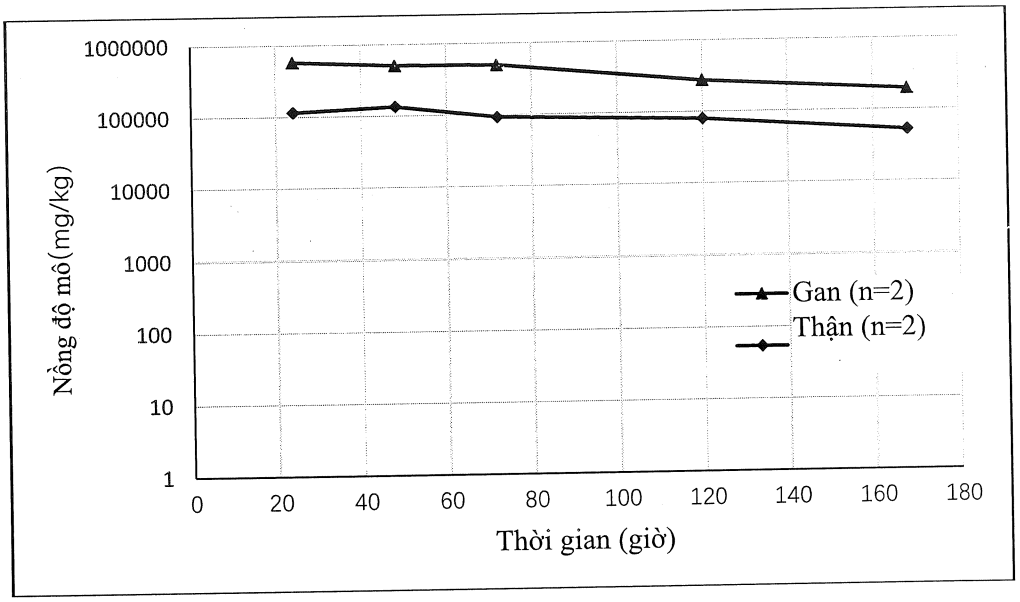

1000000
100000
10000
1000
100
10
1
Nồng độ mô (mg/kg)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Thời gian (giờ)
Gan (n=2)
Thận (n=2)

Fig. 8

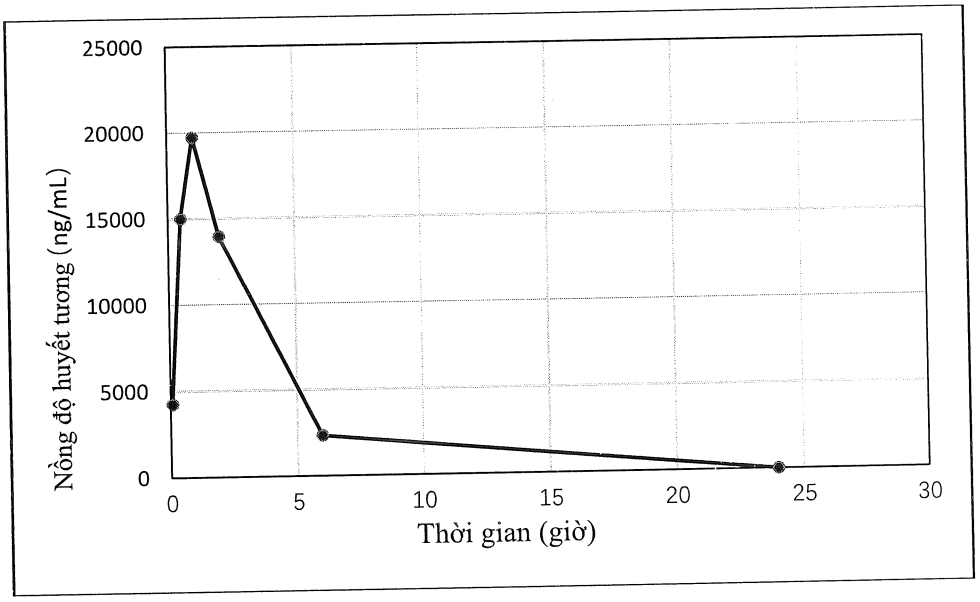

25000
20000
15000
10000
5000
0
Nồng độ huyết tương (ng/mL)
0
5
10
15
20
25
30
Thời gian (giờ)

Fig. 9

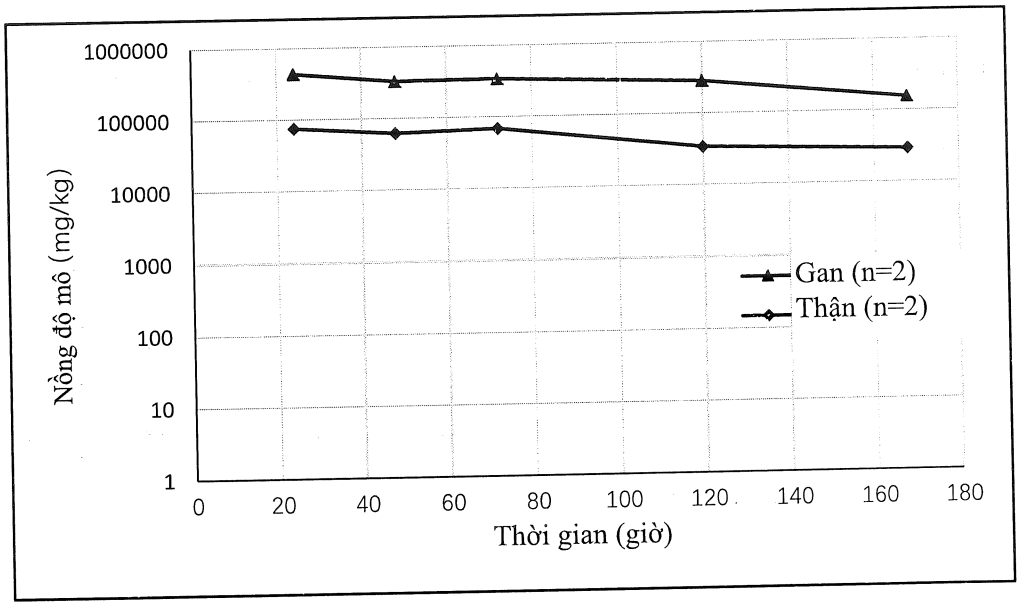

1000000
100000
10000
1000
100
10
1
Nồng độ mô (mg/kg)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Thời gian (giờ)
Gan (n=2)
Thận (n=2)

Fig. 10

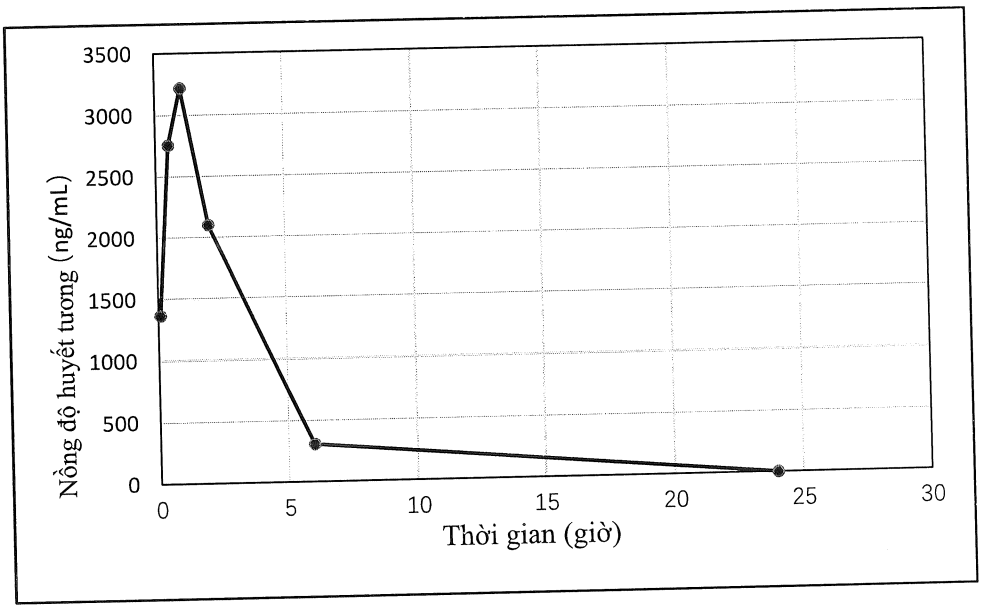

Nồng độ huyết tương (ng/mL)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
Thời gian (giờ)

Fig. 11

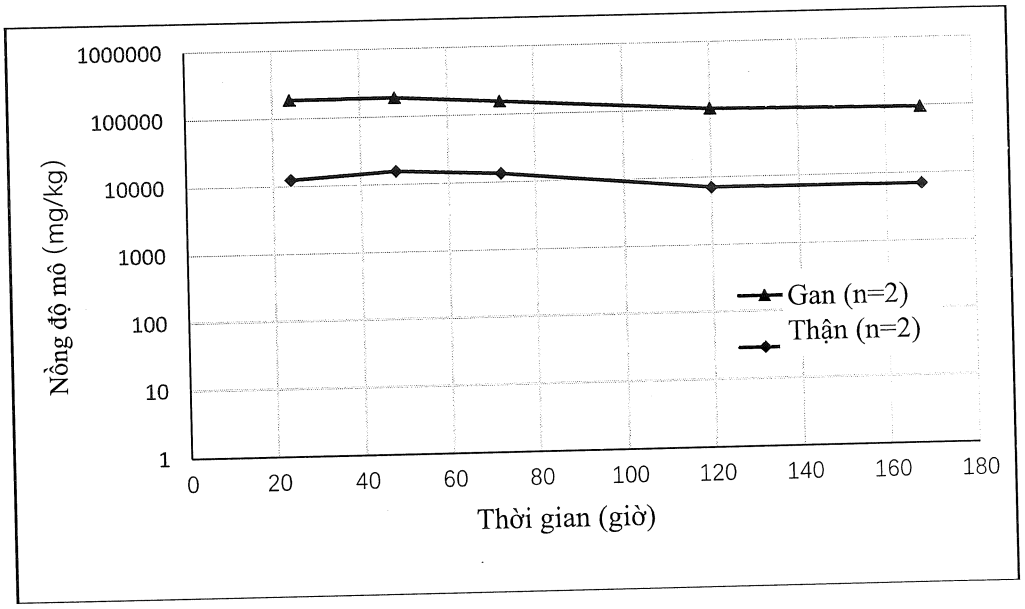

Nồng độ mô (mg/kg)
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Thời gian (giờ)
Gan (n=2)
Thận (n=2)

Fig. 12

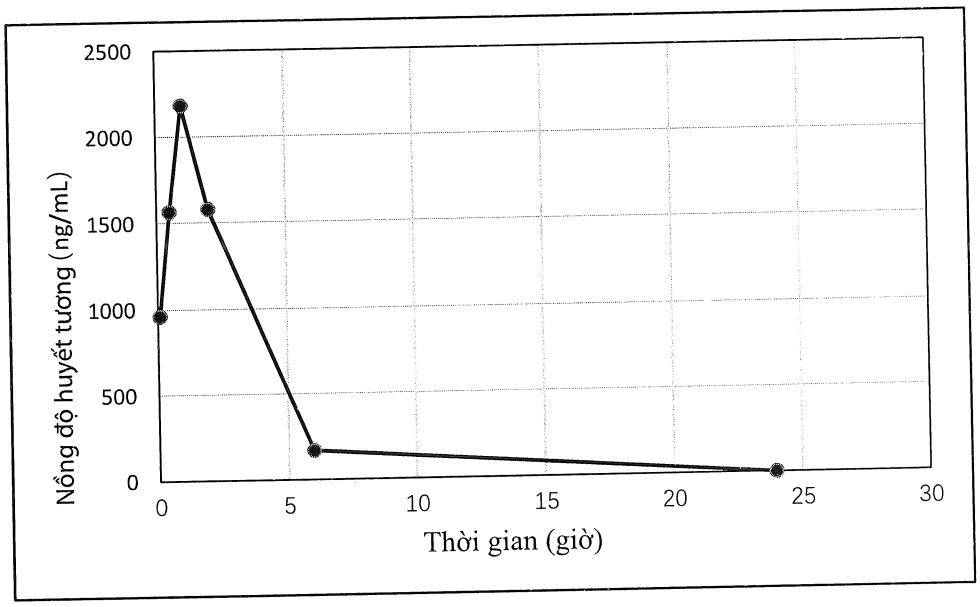

2500
2000
1500
1000
500
0
Nồng độ huyết tương (ng/mL)
0
5
10
15
20
25
30
Thời gian (giờ)

Fig. 13

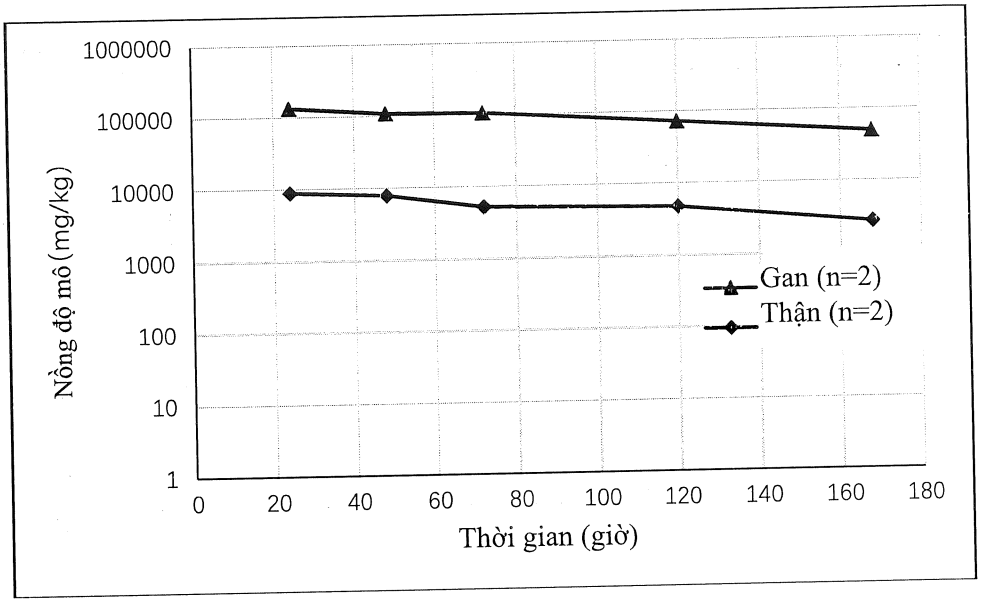

1000000
100000
10000
1000
100
10
1
Nồng độ mô (mg/kg)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Thời gian (giờ)
Gan (n=2)
Thận (n=2)

Fig. 14

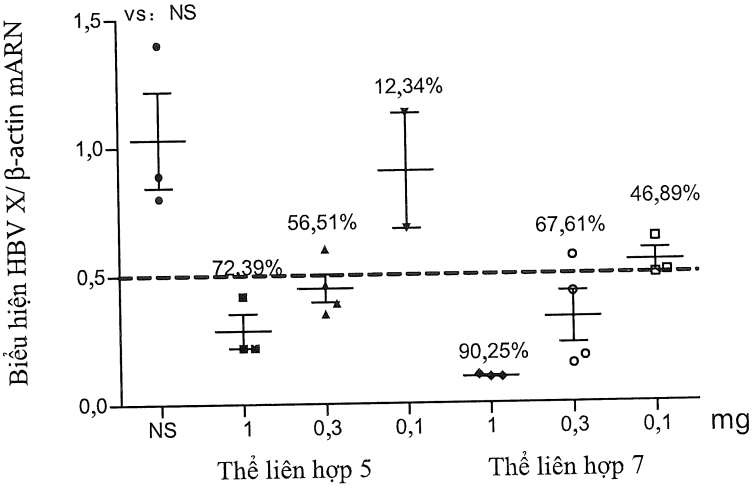

Biểu hiện HBV X/ β-actin mARN
1,5
1,0
0,5
0,0
vs: NS
12,34%
56,51%
72,39%
67,61%
46,89%
90,25%
NS
1
0,3
0,1
1
0,3
0,1
mg
Thể liên hợp 5
Thể liên hợp 7

Fig. 15

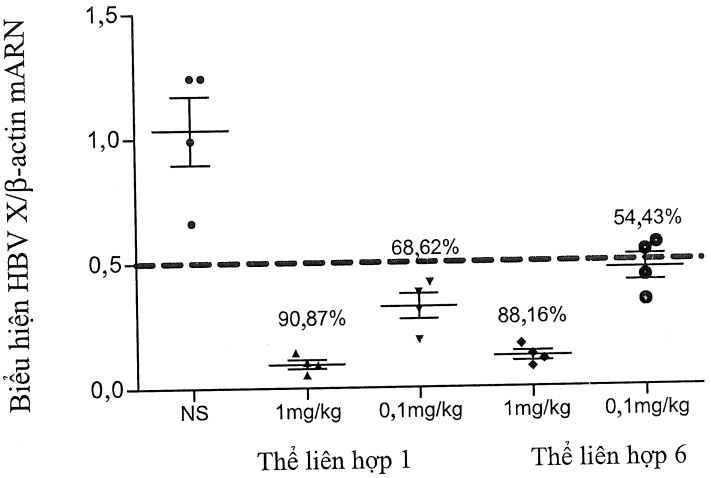

Biểu hiện HBV X/β-actin mARN
1,5
1,0
0,5
0,0
54,43%
68,62%
90,87%
88,16%
NS
1mg/kg
0,1mg/kg
1mg/kg
0,1mg/kg
Thể liên hợp 1
Thể liên hợp 6

Fig. 16

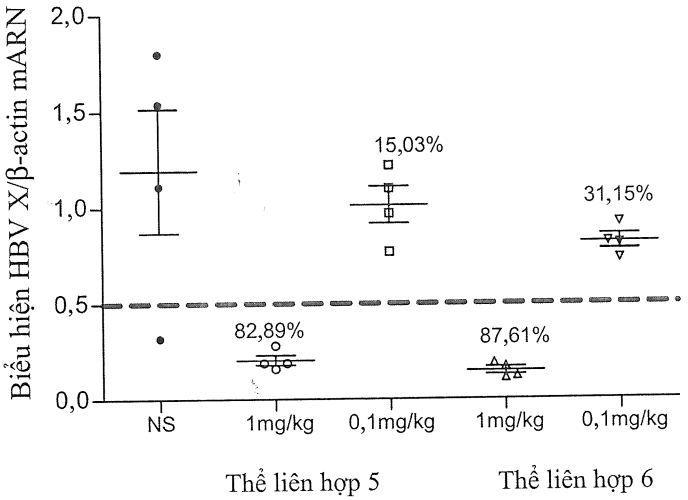

Biểu hiện HBV X/β-actin mARN
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
15,03%
31,15%
82,89%
87,61%
NS
1mg/kg
0,1mg/kg
1mg/kg
0,1mg/kg
Thể liên hợp 5
Thể liên hợp 6

Fig. 17

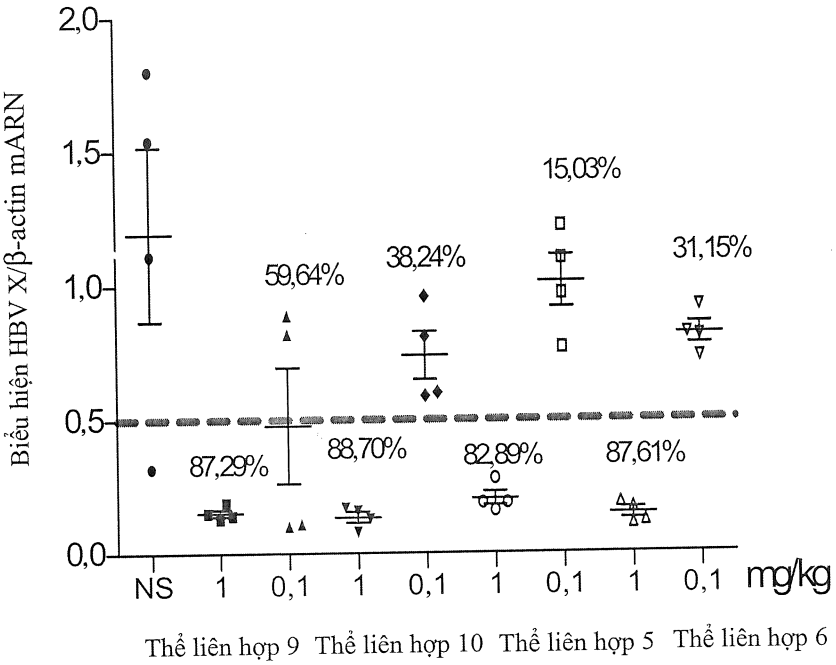

Biểu hiện HBV X/β-actin mARN
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
15,03%
59,64%
38,24%
31,15%
87,29%
88,70%
82,89%
87,61%
NS
1
0,1
1
0,1
1
0,1
1
0,1
mg/kg
Thể liên hợp 9
Thể liên hợp 10
Thể liên hợp 5
Thể liên hợp 6

Fig. 18

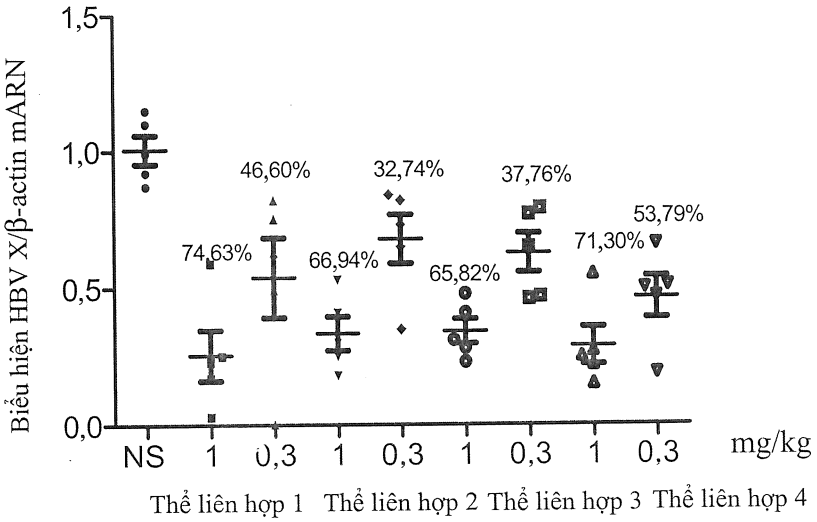

Biểu hiện HBV X/β-actin mARN
1,5
1,0
0,5
0,0
74,63%
46,60%
66,94%
32,74%
65,82%
37,76%
71,30%
53,79%
NS
1
0,3
1
0,3
1
0,3
1
0,3
mg/kg
Thể liên hợp 1
Thể liên hợp 2
Thể liên hợp 3
Thể liên hợp 4

Fig. 19

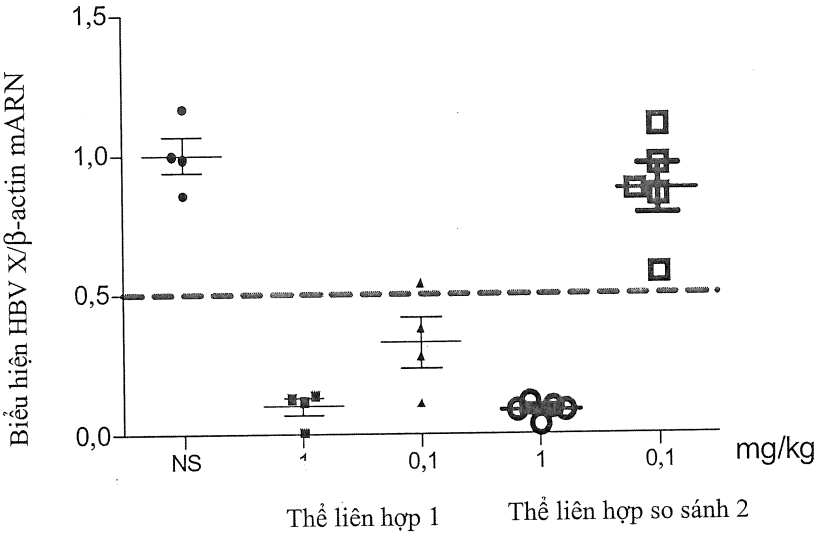

Biểu hiện HBV X/β-actin mARN
1,5
1,0
0,5
0,0
NS
0,1
1
0,1
mg/kg
Thể liên hợp 1
Thể liên hợp so sánh 2

Fig. 20

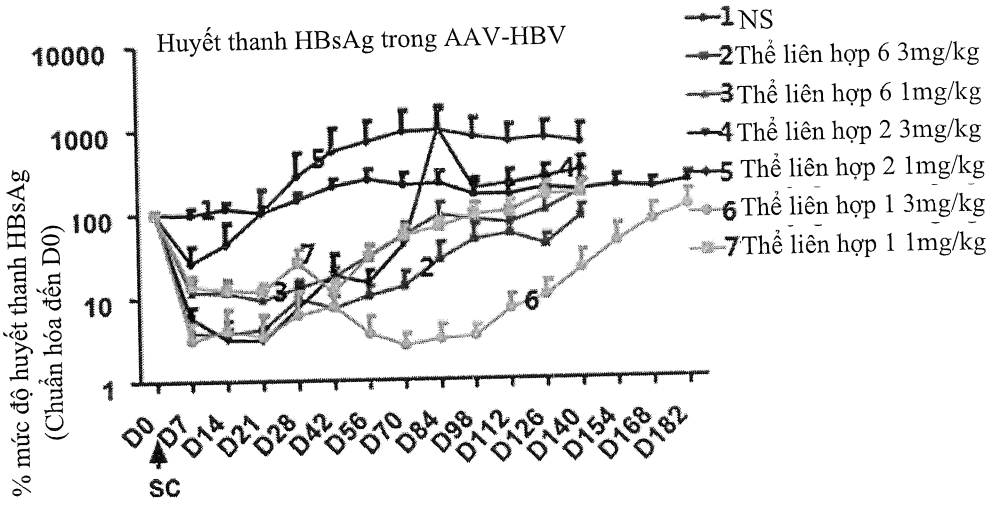

Huyết thanh HBsAg trong AAV-HBV
% mức độ huyết thanh HBsAg
(Chuẩn hóa đến D0)
10000
1000
100
10
1
D0
D7
D14
D21
D28
D42
D56
D70
D84
D98
D112
D126
D140
D154
D168
D182
SC
1 NS
2 Thể liên hợp 6 3mg/kg
3 Thể liên hợp 6 1mg/kg
4 Thể liên hợp 2 3mg/kg
5 Thể liên hợp 2 1mg/kg
6 Thể liên hợp 1 3mg/kg
7 Thể liên hợp 1 1mg/kg

Fig. 21

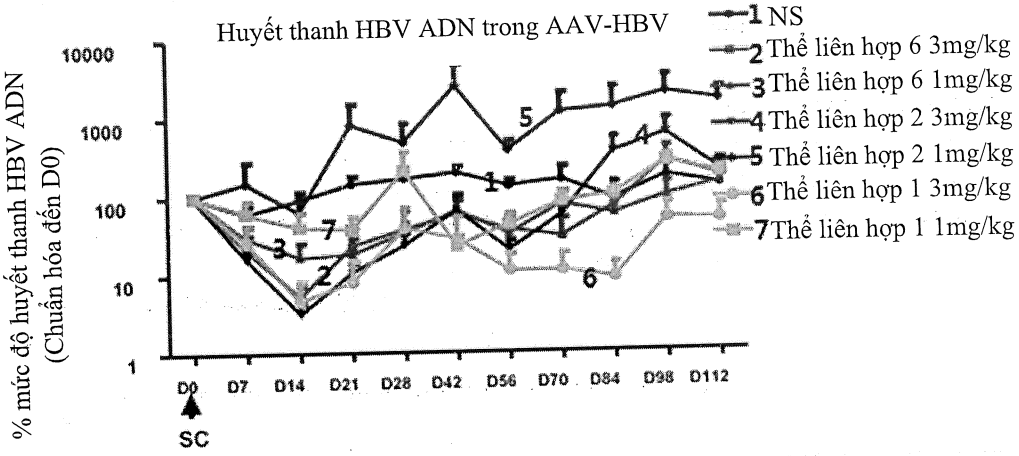

Huyết thanh HBV ADN trong AAV-HBV
% mức độ huyết thanh HBV ADN
(Chuẩn hóa đến D0)
10000
1000
100
10
1
D0
D7
D14
D21
D28
D42
D56
D70
D84
D98
D112
SC
1 NS
2 Thể liên hợp 6 3mg/kg
3 Thể liên hợp 6 1mg/kg
4 Thể liên hợp 2 3mg/kg
5 Thể liên hợp 2 1mg/kg
6 Thể liên hợp 1 3mg/kg
7 Thể liên hợp 1 1mg/kg

Fig. 22

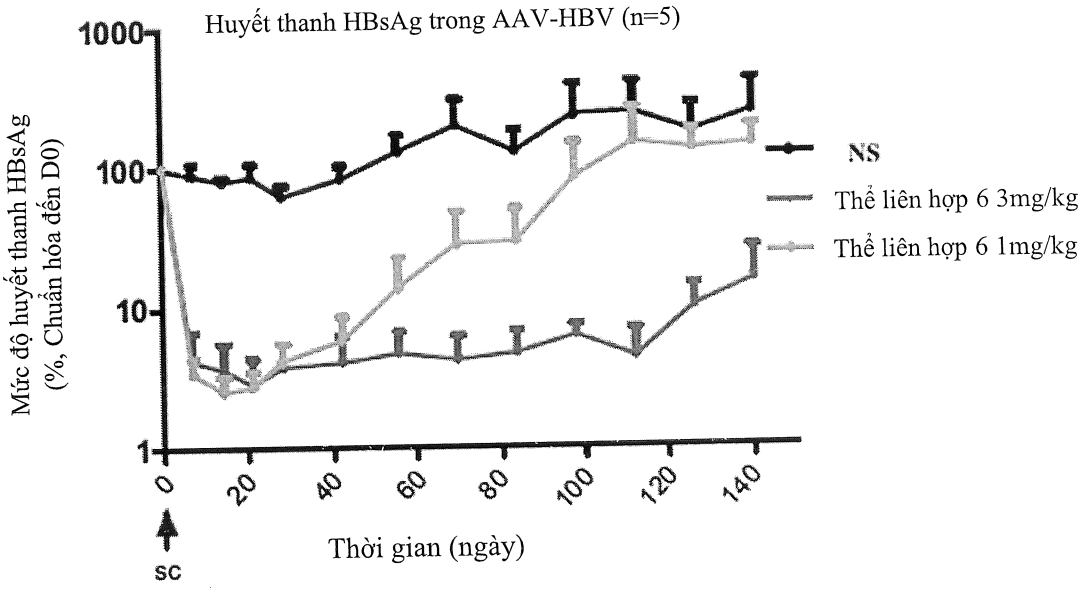

Huyết thanh HBsAg trong AAV-HBV (n=5)
Mức độ huyết thanh HBsAg
(%, Chuẩn hóa đến D0)
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
120
140
SC
Thời gian (ngày)
NS
Thể liên hợp 6 3mg/kg
Thể liên hợp 6 1mg/kg

Fig. 23

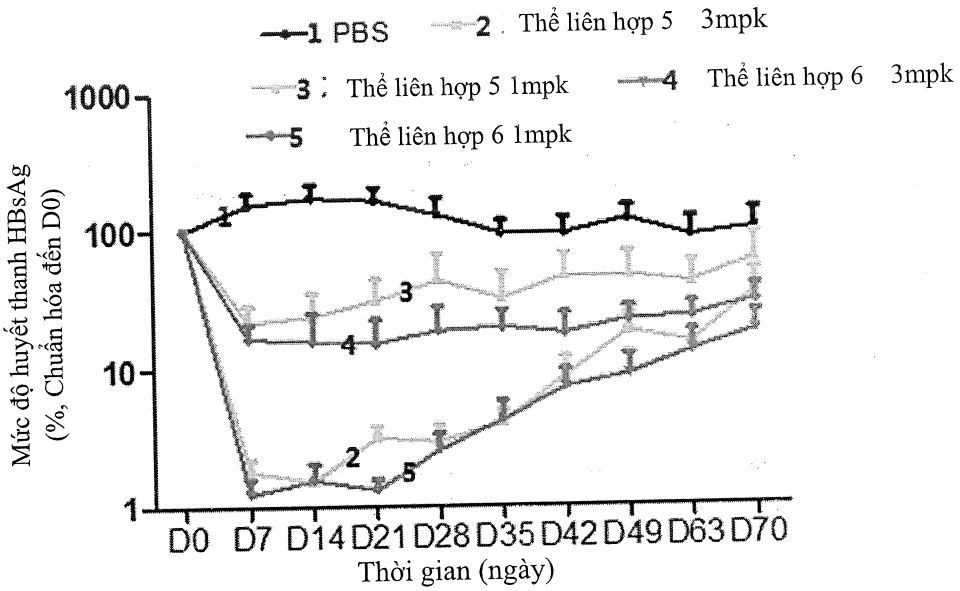

1 PBS
2 Thể liên hợp 5 3mpk
3 Thể liên hợp 5 1mpk
4 Thể liên hợp 6 3mpk
5 Thể liên hợp 6 1mpk
Mức độ huyết thanh HBsAg
(%, Chuẩn hóa đến D0)
1000
100
10
1
D0 D7 D14 D21 D28 D35 D42 D49 D63 D70
Thời gian (ngày)

Fig. 24

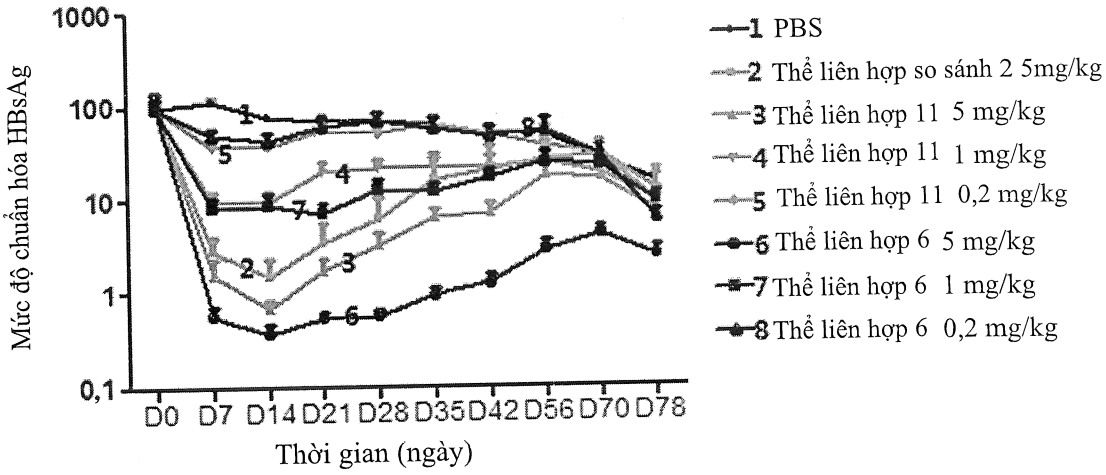

Mức độ chuẩn hóa HBsAg
1000
100
10
1
0,1
D0 D7 D14 D21 D28 D35 D42 D56 D70 D78
Thời gian (ngày)
1 PBS
2 Thể liên hợp so sánh 2 5mg/kg
3 Thể liên hợp 11 5 mg/kg
4 Thể liên hợp 11 1 mg/kg
5 Thể liên hợp 11 0,2 mg/kg
6 Thể liên hợp 6 5 mg/kg
7 Thể liên hợp 6 1 mg/kg
8 Thể liên hợp 6 0,2 mg/kg

Fig. 25

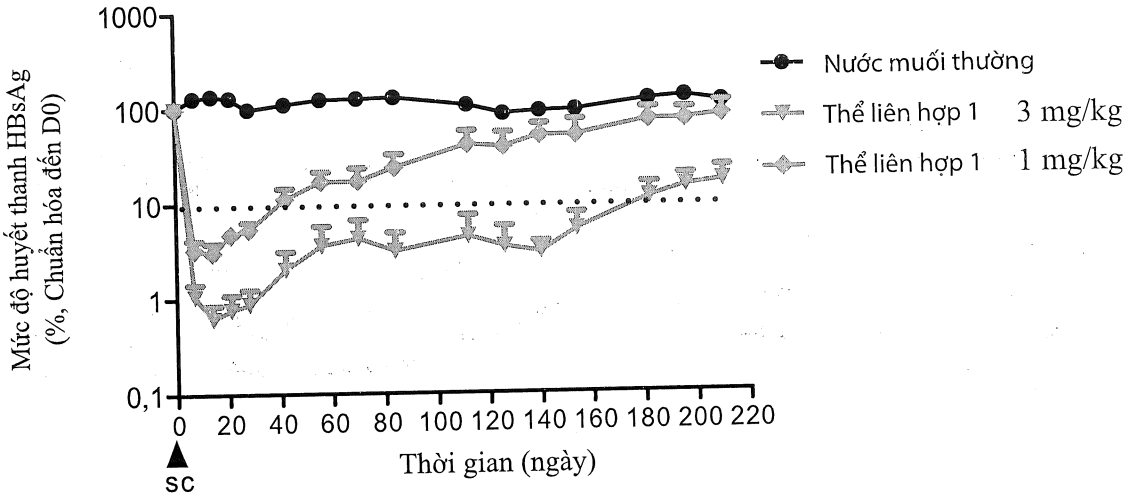

Mức độ huyết thanh HBsAg
(%, Chuẩn hóa đến D0)
1000
100
10
1
0,1
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220
SC
Thời gian (ngày)
Nước muối thường
Thể liên hợp 1 3 mg/kg
Thể liên hợp 1 1 mg/kg

Fig. 26

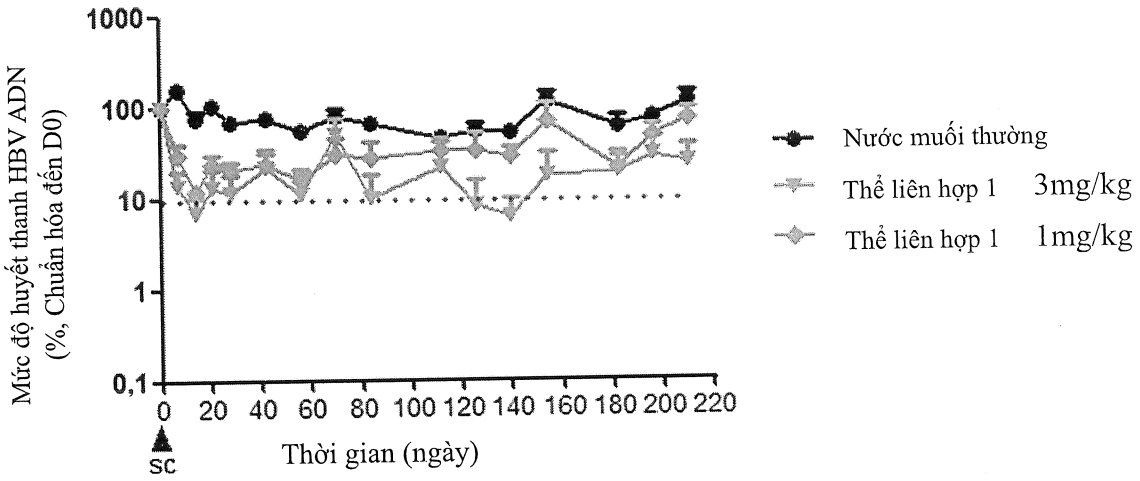


Fig. 27

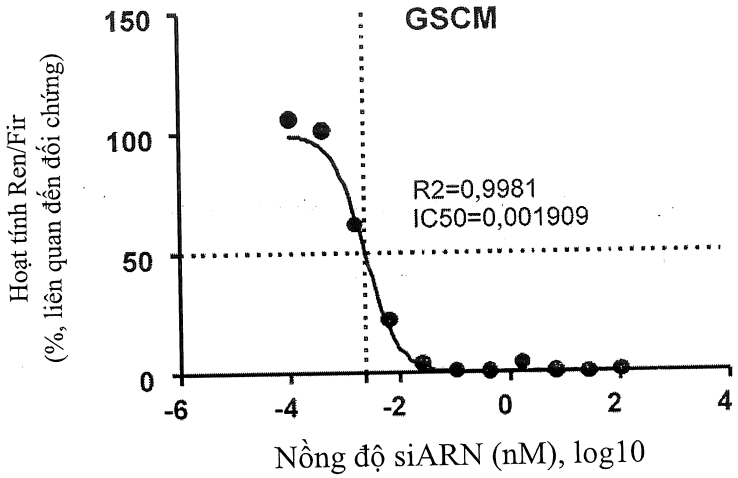


Fig. 28A

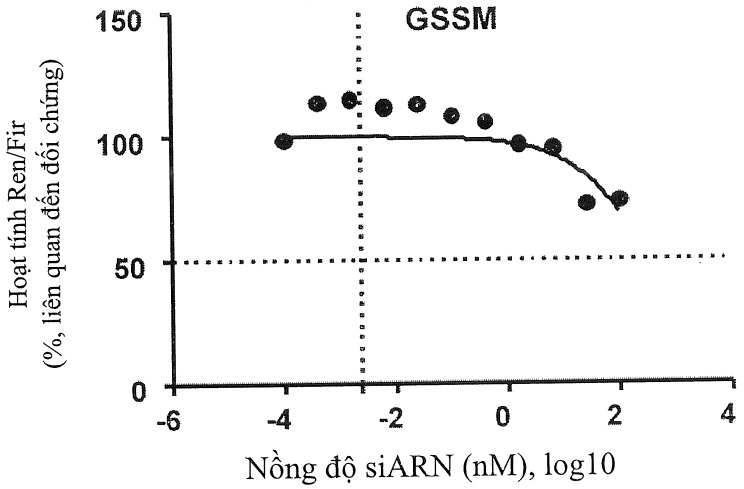


Fig. 28B

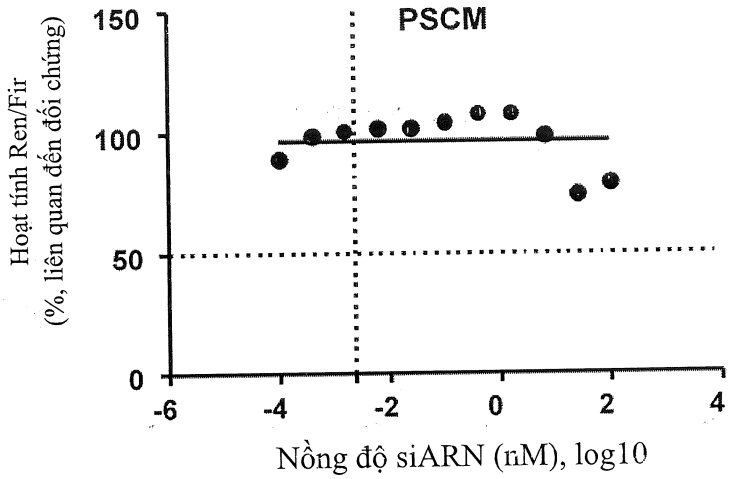


Fig. 28C

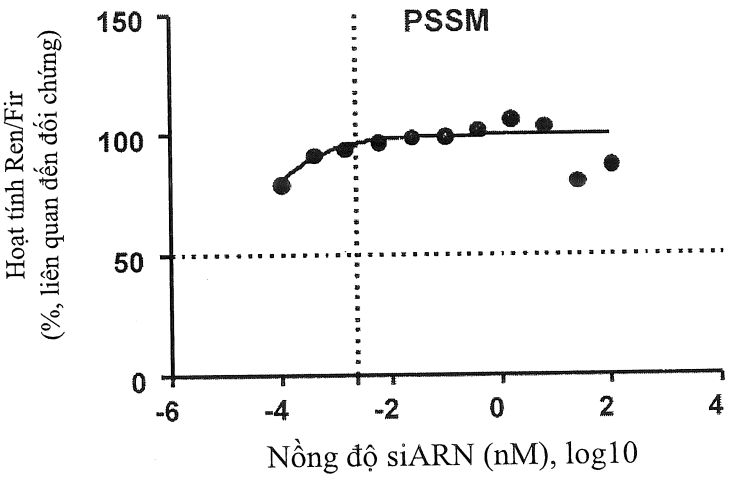

PSSM
150
100
50
0
-6
-4
-2
0
2
4
Hoạt tính Ren/Fir
(%, liên quan đến đối chứng)
Nồng độ siARN (nM), log10

Fig. 28D