



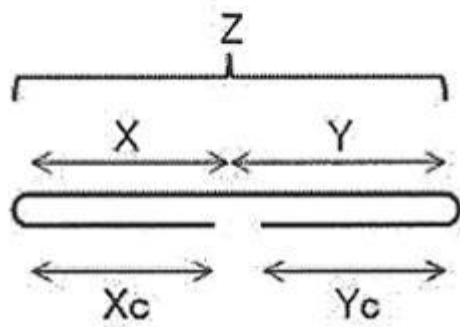
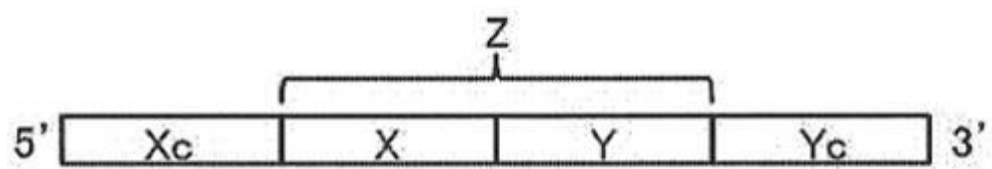
(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ C12N 15/09; C12N 15/113; A61K 48/00; A61P 29/00 (13) B



(21) 1-2013-00395 (22) 08/07/2011
(86) PCT/JP2011/065737 08/07/2011 (87) WO2012/005368A1 12/01/2012
(30) 2010-156122 08/07/2010 JP; 2010-174915 03/08/2010 JP; 2010-230806
13/10/2010 JP; 2010-230808 13/10/2010 JP; 2010-269823 02/12/2010 JP; 2010-
269824 02/12/2010 JP
(45) 25/05/2020 386 (43) 25/04/2013 301A
(73) BONAC CORPORATION (JP)
Fukuoka BIO Factory 4F, 1488-4, Aikawa-machi, Kurume-shi, Fukuoka 839-0861,
JAPAN
(72) Tadaaki OHGI (JP); Hirotake HAYASHI (JP); Hisao SHIROHZU (JP); Tomohiro
HAMASAKI (JP); Akihiro ITOH (JP); Hiroshi SUZUKI (JP)
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.)

(54) PHÂN TỬ ARN SỢI ĐƠN ĐỂ ỨNG CHẾ SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN VÀ DƯỢC
PHẨM CHỨA PHÂN TỬ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic có thể ức chế sự biểu hiện của gen và có thể được sản xuất một cách dễ dàng và hiệu quả. Phân tử axit nucleic này là phân tử axit nucleic sợi đơn chứa trình tự ức chế sự biểu hiện để ức chế sự biểu hiện của gen đích. Phân tử axit nucleic sợi đơn chứa, theo trình tự từ đầu 5' đến đầu 3': vùng đầu 5' (Xc); vùng bên trong (Z); và vùng đầu 3' (Yc). Vùng bên trong (Z) gồm vùng bên trong đầu 5' (X) và vùng bên trong đầu 3' (Y) được liên kết với nhau. Vùng đầu 5' (Xc) hỗ trợ cho vùng bên trong đầu 5' (X). Vùng đầu 3' (Yc) hỗ trợ cho vùng bên trong đầu 3' (Y). Ít nhất một vùng trong số vùng bên trong (Z), vùng đầu 5' (Xc), và vùng đầu 3' (Yc) chứa trình tự ức chế sự biểu hiện. Có thể ức chế sự biểu hiện của gen đích bằng cách sử dụng phân tử axit nucleic sợi đơn theo sáng chế. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm dùng để ức chế sự biểu hiện của gen đích, dược phẩm chứa phân tử này, phương pháp ức chế sự biểu hiện của gen đích *in vitro* và phương pháp tạo ra sự can thiệp ARN để ức chế sự biểu hiện của gen đích *in vitro*.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic sợi đơn ức chế sự biểu hiện của gen, chế phẩm và được phẩm chứa phân tử axit nucleic sợi đơn này, và phương pháp ức chế sự biểu hiện của gen đích *in vitro* bằng cách sử dụng phân tử axit nucleic sợi đơn này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đối với kỹ thuật ức chế sự biểu hiện của gen, kỹ thuật can thiệp ARN (RNA interference: ARNi) là đã biết, ví dụ (tài liệu: Fire. *et al.*, Nature, vol. 391, pp. 806-811, 1998). Sự ức chế mức độ biểu hiện của gen bằng kỹ thuật can thiệp ARN thường được tiến hành, ví dụ, bằng cách sử dụng phân tử ARN sợi kép ngắn cho tế bào hoặc yếu tố tương tự. Phân tử ARN sợi kép thường được gọi là ARN can thiệp nhỏ (small interfering RNA: siARN). Đã có thông báo rằng không chỉ siARN mà cả phân tử ARN dạng vòng là phân tử sợi kép một phần được cải biến bằng sự liên kết bổ sung giữa các phân tử cũng có thể ức chế sự biểu hiện của gen (Công bố đơn đăng ký sáng chế Nhật Bản số JP 2008-278784 A). Tuy nhiên, các phân tử ARN được sử dụng trong các kỹ thuật này tạo ra sự ức chế mức độ biểu hiện của gen có các nhược điểm sau đây.

Thứ nhất, để sản xuất siARN, cần phải tổng hợp sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa một cách riêng biệt và sau đó lai các sợi này với nhau ở cuối quy trình. Do đó, vấn đề nảy sinh là hiệu quả sản xuất sẽ thấp. Hơn nữa, khi siARN được sử dụng cho tế bào, cần phải sử dụng siARN cho tế bào trong khi ức chế sự phân ly của các ARN sợi đơn, do đó cần phải thiết lập các điều kiện để xử lý siARN. Mặt khác, một vấn đề gặp phải đối với phân tử ARN dạng vòng là quá trình tổng hợp khó khăn.

Các đơn đăng ký sáng chế châu Âu số EP2256191A và EP2233573A mô tả siARN dạng vòng và chế phẩm chứa siARN dạng vòng này để ức chế sự biểu hiện của gen đích.

Công bố đơn quốc tế số WO 2006/074108 mô tả ARN sợi đơn chứa trình tự ức chế sự biểu hiện và hai cấu trúc gấp cuộn lại ở các đầu.

Các Công bố đơn quốc tế số WO 2004/015075, WO 2004/015107 và WO 2006/088490 mô tả các phân tử ARN kẹp tóc ngắn (shARN) có nhóm liên kết không phải nucleotit.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Với những khó khăn nêu trên, mục đích của sáng chế là tạo ra phân tử ARN mới có thể ức chế sự biểu hiện của gen và cũng có thể được sản xuất một cách dễ dàng và hiệu quả.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề cập đến phân tử ARN sợi đơn chỉ chứa một trình tự ức chế sự biểu hiện để ức chế sự biểu hiện của gen đích, trong đó:

- đầu 5' và đầu 3' không được liên kết với nhau,
- phân tử ARN sợi đơn chứa, theo trình tự từ đầu 5' đến đầu 3': vùng đầu 5' (Xc); vùng bên trong (Z) chứa trình tự ức chế sự biểu hiện; và vùng đầu 3' (Yc),
- vùng bên trong (Z) gồm vùng bên trong đầu 5' (X) và vùng bên trong đầu 3' (Y) được liên kết với nhau,
- vùng đầu 5' (Xc) bổ trợ cho vùng bên trong đầu 5' (X) và sợi kép được tạo ra bởi sự gấp cuộn lại của vùng (Xc) về phía vùng (X) và sự tự liên kết bổ sung của các vùng (Xc) và (X),
- vùng đầu 3' (Yc) bổ trợ cho vùng bên trong đầu 3' (Y), và sợi kép được tạo ra bởi sự gấp cuộn lại của vùng (Yc) về phía vùng (Y) và sự tự liên kết bổ sung của các vùng (Yc) và (Y),
- vùng liên kết (Lx) có mặt ở giữa vùng đầu 5' (Xc) và vùng bên trong đầu 5' (X),
- vùng đầu 5' (Xc) và vùng bên trong đầu 5' (X) được liên kết với nhau qua vùng liên kết (Lx),
- vùng liên kết (Lx) chứa gốc không phải nucleotit,

- vùng liên kết (Ly) có mặt ở giữa vùng đầu 3' (Yc) và vùng bên trong đầu 3' (Y),
- vùng đầu 3' (Yc) và vùng bên trong đầu 3' (Y) được liên kết với nhau qua vùng liên kết (Ly), và
- số lượng bazơ (Z) ở vùng bên trong (Z), số lượng bazơ (X) ở vùng bên trong đầu 5' (X), số lượng bazơ (Y) ở vùng bên trong đầu 3' (Y), số lượng bazơ (Xc) ở vùng đầu 5' (Xc), và số lượng bazơ (Yc) ở vùng đầu 3' (Yc) thỏa mãn các điều kiện từ (a) đến (d):

(a) các điều kiện của biểu thức (1) và (2) được thỏa mãn:

$$Z = X + Y \quad \dots (1)$$

$$Z \geq Xc + Yc \quad \dots (2);$$

(b) Z nằm trong khoảng từ 19 đến 30;

(c) Xc nằm trong khoảng từ 1 đến 7 hoặc Yc nằm trong khoảng từ 1 đến 9;

và

(d) $Z - (Xc + Yc) = 0$ hoặc 1 đến 10.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm dùng để ức chế sự biểu hiện của gen đích. Chế phẩm này chứa phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến:

- phương pháp ức chế sự biểu hiện của gen đích *in vitro*, trong đó phân tử axit sợi đơn theo sáng chế được sử dụng cho tế bào, mô hoặc cơ quan; và
- phương pháp tạo ra sự can thiệp ARN để ức chế sự biểu hiện của gen đích *in vitro*, phương pháp này bao gồm bước sử dụng phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế.

Sáng chế cũng mô tả phân tử axit nucleic để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh, trong đó:

- phân tử axit nucleic là phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế, và
- phân tử ARN sợi đơn chứa trình tự ức chế sự biểu hiện là trình tự ức chế sự biểu hiện của gen gây bệnh.

Bằng cách sử dụng phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế, có thể ức chế sự biểu hiện của gen. Hơn nữa, do phân tử ARN sợi đơn này không phải dạng vòng, có thể tổng hợp nó một cách dễ dàng. Ngoài ra, do phân tử này là phân tử sợi đơn, không cần bước liên kết bổ sung trong quá trình sản xuất sợi kép, vì vậy có thể sản xuất phân tử này một cách hiệu quả.

Các tác giả sáng chế là người đầu tiên phát hiện được rằng sự biểu hiện của gen có thể được ức chế bằng cấu trúc của phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế. Dự định rằng tác dụng ức chế gen của phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế là do hiện tượng tương tự với sự can thiệp ARN gây ra. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng sự ức chế mức độ biểu hiện của gen theo sáng chế không bị hạn chế hoặc giới hạn bởi kỹ thuật can thiệp ARN.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sơ đồ minh họa một ví dụ về phân tử ARN sợi đơn (không phải của sáng chế).

Fig.2 thể hiện sơ đồ minh họa ví dụ khác về phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế.

Fig.3 thể hiện sơ đồ minh họa các ví dụ khác về phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH theo một ví dụ của sáng chế.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH theo một ví dụ khác của sáng chế.

Fig.6 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH trong tế bào A549 theo ví dụ khác nữa của sáng chế

Fig.7 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH trong tế bào 293 theo ví dụ của sáng chế.

Fig.8 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện của gen TGF- β 1 theo ví dụ khác nữa của sáng chế.

Fig.9 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện của gen TGF- β 1 trên một đơn vị

trọng lượng phổi trong mỗi nhóm sử dụng theo ví dụ khác nữa của sáng chế.

Fig.10 là biểu đồ thể hiện số lượng tế bào trong mẫu BALF của mỗi nhóm sử dụng theo ví dụ của sáng chế.

Fig.11 là biểu đồ thể hiện số lượng bạch cầu trung tính trong mẫu BALF của mỗi nhóm sử dụng theo ví dụ của sáng chế.

Fig.12 là ảnh chụp trong đó mỗi ảnh thể hiện kết quả nhuộm Giemsa của tế bào trong mẫu BALF theo ví dụ của sáng chế. Fig.12A thể hiện kết quả thu được ở nhóm sử dụng 4 (LPS (+)/ARN (-)). Fig.12B thể hiện kết quả thu được ở nhóm sử dụng 6 (LPS (+)/đối chứng âm NK-0035 (+)). Fig.12C thể hiện kết quả thu được ở nhóm sử dụng 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)).

Fig.13 là ảnh chụp trong đó mỗi ảnh thể hiện kết quả nhuộm HE của mô phổi theo ví dụ của sáng chế. Fig.13A thể hiện kết quả thu được ở nhóm sử dụng 4 (LPS (+)/ARN (-)). Fig.13B thể hiện kết quả thu được ở nhóm sử dụng 6 (LPS (+)/đối chứng âm NK-0035 (+)). Fig.13C thể hiện kết quả thu được ở nhóm sử dụng 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)).

Fig.14A thể hiện kết quả xác định mức độ biểu hiện của gen TGF- β 1 trong một ví dụ khác của sáng chế. Fig.14B thể hiện kết quả xác định mức độ biểu hiện của gen IFN- α theo ví dụ của sáng chế. Fig.14C thể hiện kết quả xác định mức độ biểu hiện của gen IFN- β theo ví dụ của sáng chế.

Fig.15 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen TGF- β 1 theo một ví dụ khác của sáng chế.

Fig.16 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen TGF- β 1 theo ví dụ của sáng chế.

Fig.17 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện của gen TGF- β 1 trên một đơn vị trọng lượng phổi trong mỗi nhóm sử dụng theo một ví dụ khác của sáng chế.

Fig.18A là biểu đồ thể hiện lượng TNF- α trong mẫu BALF của mỗi nhóm sử dụng theo ví dụ của sáng chế. Fig.18B là biểu đồ thể hiện lượng IFN- β trong mẫu BALF của mỗi nhóm sử dụng theo ví dụ của sáng chế.

Fig.19 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen LAMA1 trong tế bào 293 theo một ví dụ khác của sáng chế.

Fig.20 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen LMNA trong tế bào A549 theo một ví dụ khác của sáng chế.

Fig.21 thể hiện phân tử ARN sợi đơn được sử dụng trong một ví dụ khác nữa của sáng chế.

Fig.22 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH theo ví dụ của sáng chế.

Fig.23 thể hiện phân tử ARN sợi đơn được sử dụng trong một ví dụ khác nữa theo sáng chế.

Fig.24 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH theo ví dụ của sáng chế.

Fig.25 thể hiện phân tử ARN sợi đơn được sử dụng trong một ví dụ khác theo sáng chế.

Fig.26 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH theo ví dụ của sáng chế.

Fig.27 thể hiện phân tử ARN sợi đơn được sử dụng trong một ví dụ khác của sáng chế.

Fig.28 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH theo ví dụ của sáng chế.

Fig.29 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH theo một ví dụ khác của sáng chế.

Fig.30 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH trong tế bào HCT116 theo một ví dụ khác của sáng chế.

Fig.31 là hình ảnh điện di thể hiện tính kháng ribonucleaza trong một ví dụ khác của sáng chế.

Fig.32 là hình ảnh điện di thể hiện tính kháng S7 nucleaza trong một ví dụ khác

của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả có nghĩa như thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này, trừ khi được quy định theo cách khác.

1. Phân tử ssNc

Phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế, như đã mô tả trên đây, là phân tử ARN sợi đơn chứa trình tự ức chế sự biểu hiện để ức chế sự biểu hiện của gen đích. Phân tử ARN axit nucleic sợi đơn chứa, theo trình tự từ đầu 5' đến đầu 3': vùng đầu 5' (Xc); vùng bên trong (Z); và vùng đầu 3' (Yc). Vùng bên trong (Z) gồm vùng bên trong đầu 5' (X) và vùng bên trong đầu 3' (Y) được liên kết với nhau. Vùng đầu 5' (Xc) hỗ trợ cho vùng bên trong đầu 5' (X). Vùng đầu 3' (Yc) hỗ trợ cho vùng bên trong đầu 3' (Y). Vùng bên trong (Z) chứa trình tự ức chế sự biểu hiện.

Theo sáng chế, thuật ngữ “ức chế sự biểu hiện của gen đích” có nghĩa là phá vỡ sự biểu hiện, ví dụ, của gen đích. Cơ chế mà nhờ đó đạt được sự ức chế là không có giới hạn cụ thể, và có thể là điều hòa giảm hoặc làm bất hoạt. Sự ức chế mức độ biểu hiện của gen đích có thể được xác định bằng: sự giảm lượng sản phẩm phiên mã thu được từ gen đích; sự giảm hoạt tính của sản phẩm phiên mã; sự giảm lượng sản phẩm dịch mã được tạo ra từ gen đích; sự giảm hoạt tính của sản phẩm dịch mã; hoặc thông số tương tự. Các protein có thể là protein trưởng thành, tiền chất protein trước khi được xử lý hoặc cải biến sau dịch mã, hoặc quá trình tương tự.

Phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế sau đây cũng có thể được gọi là “phân tử ssNc” theo sáng chế. Phân tử ssNc theo sáng chế có thể được sử dụng để ức chế sự biểu hiện của gen đích *in vivo* hoặc *in vitro*, vì vậy cũng có thể được gọi là “phân tử ssNc để ức chế sự biểu hiện của gen đích” hoặc “chất ức chế sự biểu hiện của gen đích”. Hơn nữa, phân tử ssNc theo sáng chế có thể ức chế sự biểu hiện của gen đích bằng cách, ví dụ, can thiệp ARN, vì vậy nó còn được gọi là “phân tử ssNc để can thiệp ARN”, “phân tử tạo ra sự can thiệp ARN”, “chất can thiệp ARN”, hoặc “chất tạo ra sự can thiệp

ARN”. Phân tử ssNc theo sáng chế cũng có thể ức chế tác dụng phụ như cảm ứng interferon.

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, đầu 5’ và đầu 3’ không được liên kết với nhau. Do đó, phân tử ssNc theo sáng chế cũng có thể được gọi là “phân tử axit nucleic sợi đơn mạch thẳng”. Phân tử ssNc theo sáng chế có cấu hình sao cho trong vùng bên trong (Z), vùng bên trong đầu 5’ (X) và vùng bên trong đầu 3’ (Y) được liên kết trực tiếp với nhau.

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, vùng đầu 5’ (Xc) bổ trợ cho vùng bên trong đầu 5’ (X), và vùng đầu 3’ (Yc) bổ trợ cho vùng bên trong đầu 3’ (Y). Ở đầu 5’, sợi kép được tạo ra bởi sự gấp cuộn lại của vùng (Xc) về phía vùng (X) và quá trình tự liên kết bổ sung của các vùng (Xc) và (X). Ở đầu 3’, sợi kép có thể được tạo ra bởi sự gấp cuộn lại của vùng (Yc) về phía vùng (Y) và quá trình tự liên kết bổ sung của các vùng (Yc) và (Y). Phân tử ssNc theo sáng chế có thể tạo thành sợi kép trong phân tử như đã mô tả trên đây. Do đó, cấu trúc của phân tử ssNc là hoàn toàn khác với cấu trúc của ARN sợi kép thu được nhờ quá trình liên kết bổ sung hai ARN sợi đơn riêng biệt, như siARN thường được sử dụng trong kỹ thuật can thiệp ARN.

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, trình tự ức chế sự biểu hiện là trình tự có hoạt tính ức chế sự biểu hiện của gen đích khi phân tử ssNc theo sáng chế được đưa vào tế bào *in vivo* hoặc *in vitro*. Trình tự ức chế sự biểu hiện không bị giới hạn cụ thể, và có thể được thiết lập khi thích hợp tùy theo loại gen đích có sự biểu hiện cần được ức chế. Để làm trình tự ức chế sự biểu hiện, có thể sử dụng trình tự liên quan trong quá trình can thiệp ARN do siARN gây ra, khi thích hợp. Thông thường, sự can thiệp ARN là hiện tượng trong đó phân tử ARN sợi kép (double-stranded RNA: dsARN) dài được phân cắt trong tế bào bởi Dicer để tạo ra ARN sợi kép (siARN: small interfering RNA (ARN can thiệp nhỏ)) gồm từ khoảng 19 đến 21 cặp bazơ và có đầu 3’ nhô ra, và một trong số các ARN sợi đơn tạo ra siARN gắn kết với mRNA đích để phân hủy mRNA, nhờ đó ức chế quá trình dịch mã ARN thông tin. Để làm trình tự ARN sợi đơn của siARN gắn kết với mRNA đích, nhiều loại trình tự khác nhau đối với nhiều loại gen đích đã được thông báo. Theo sáng chế, chẳng hạn, trình tự ARN sợi đơn của siARN có

thể được sử dụng làm trình tự ức chế sự biểu hiện.

Cần lưu ý rằng đối tượng của sáng chế không phải là thông tin trình tự của trình tự ức chế sự biểu hiện đối với gen đích. Thực chất, sáng chế đề cập đến cấu trúc của phân tử axit nucleic cho phép hoạt tính ức chế gen đích được tạo ra bởi trình tự ức chế sự biểu hiện hoạt động trong tế bào. Do đó, theo sáng chế, không chỉ các trình tự của ARN sợi đơn của siARN đã biết tại thời điểm nộp đơn mà cả các trình tự được xác định trong tương lai có thể được sử dụng làm trình tự ức chế sự biểu hiện.

Tốt hơn, nếu trình tự ức chế sự biểu hiện có tính hỗ trợ ít nhất là 90%, tốt hơn là 95%, tốt hơn nữa là 98%, và tốt nhất là 100% cho vùng định trước của gen đích. Khi trình tự ức chế sự biểu hiện đáp ứng được mức độ hỗ trợ đã mô tả trên đây, có thể giảm tác dụng sai đích một cách đầy đủ.

Ví dụ cụ thể về trình tự ức chế sự biểu hiện là như sau: khi gen đích là gen GAPDH, trình tự 19 đơn phân được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 có thể được sử dụng; khi gen đích là gen TGF- β 1, trình tự 21 đơn phân được thể hiện trong SEQ ID NO: 16 có thể được sử dụng; khi gen đích là gen LAMA1, trình tự 19 đơn phân được thể hiện trong SEQ ID NO: 5 có thể được sử dụng; và khi gen đích là gen LMNA, trình tự 19 đơn phân được thể hiện trong SEQ ID NO: 6 có thể được sử dụng.

5'-GUUGUCAUACUUCUCAUGG-3' (SEQ ID NO: 1)

5'-AAAGUCAAUGUACAGCUGCUU-3' (SEQ ID NO: 16)

5'-AUUGUAACGAGACAAACAC-3' (SEQ ID NO: 5)

5'-UUGCGCUUUUUGGUGACGC-3' (SEQ ID NO: 6)

Dự định rằng sự ức chế mức độ biểu hiện của gen đích bằng phân tử ssNc theo sáng chế đạt được bằng cách can thiệp ARN hoặc hiện tượng tương tự với sự can thiệp ARN (hiện tượng giống với sự can thiệp ARN) do cấu trúc của phân tử ssNc gây ra trong đó trình tự ức chế sự biểu hiện được đưa vào ít nhất một vùng trong số vùng bên trong (Z), vùng đầu 5' (Xc), và vùng đầu 3' (Yc). Tuy nhiên, cần lưu ý rằng sáng chế sẽ không bị giới hạn bởi cơ chế này. Không giống như phân tử được gọi là siARN, phân tử ssNc theo sáng chế không được đưa vào tế bào hoặc một môi trường tương tự ở dạng

ARN sợi kép gồm hai ARN sợi đơn, và không phải lúc nào cũng cần phân cắt trình tự ức chế sự biểu hiện trong tế bào. Do đó, có thể nói rằng phân tử ssNc theo sáng chế có chức năng tương tự với sự can thiệp ARN.

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, trình tự ức chế sự biểu hiện được đưa vào vùng bên trong (Z) như đã mô tả trên đây. Phân tử ssNc theo sáng chế có thể chứa một trình tự ức chế sự biểu hiện.

Như đã mô tả trên đây, vùng bên trong (Z) gồm vùng bên trong đầu 5' (X) và vùng bên trong đầu 3' (Y) được liên kết với nhau. Các vùng (X) và (Y) có thể được liên kết trực tiếp với nhau mà không có trình tự xen giữa. Vùng bên trong (Z) được mô tả là “gồm vùng bên trong đầu 5' (X) và vùng bên trong đầu 3' (Y) được liên kết với nhau” chỉ có nghĩa là trình tự giữa vùng đầu 5' (Xc) và vùng đầu 3' (Yc). Trình tự ức chế sự biểu hiện này có thể được sắp xếp để mở rộng qua các vùng (X) và (Y) trong vùng bên trong (Z).

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, vùng đầu 5' (Xc) hỗ trợ cho vùng bên trong đầu 5' (X). Chỉ cần là vùng (Xc) có vùng hỗ trợ trình tự cho toàn bộ hoặc một phần của vùng (X). Cụ thể, được ưu tiên là vùng (Xc) bao gồm hoặc gồm vùng hỗ trợ trình tự cho toàn bộ hoặc một phần của vùng (X). Vùng (Xc) có thể là vùng hỗ trợ hoàn toàn cho toàn bộ hoặc một phần của vùng (X), hoặc một hoặc một số bazơ trong vùng (Xc) có thể không hỗ trợ cho một hoặc một số bazơ trong vùng (X). Tốt hơn, nếu vùng (Xc) hỗ trợ hoàn toàn cho vùng (X). Trong phân tử ssNc theo sáng chế, vùng đầu 3' (Yc) hỗ trợ cho vùng bên trong đầu 3' (Y). Chỉ cần là vùng (Yc) có vùng hỗ trợ trình tự cho toàn bộ hoặc một phần của vùng (Y). Cụ thể, được ưu tiên là vùng (Yc) bao gồm hoặc gồm vùng hỗ trợ trình tự cho toàn bộ hoặc một phần của vùng (Y). Vùng (Yc) có thể hỗ trợ hoàn toàn cho toàn bộ hoặc một phần của vùng (Y), hoặc một hoặc một số bazơ trong vùng (Yc) có thể không hỗ trợ cho một hoặc một số bazơ trong vùng (Y). Tốt hơn, nếu vùng (Yc) hỗ trợ hoàn toàn cho vùng (Y). Thuật ngữ “một hoặc một số bazơ” có nghĩa là, chẳng hạn, từ 1 đến 3 bazơ, tốt hơn là 1 bazơ hoặc 2 bazơ.

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, vùng đầu 5' (Xc) và vùng bên trong đầu 5' (X) được liên kết với nhau qua vùng liên kết (Lx).

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, vùng đầu 3' (Yc) và vùng bên trong đầu 3' (Y) được liên kết với nhau qua vùng liên kết (Ly).

Phân tử ssNc theo sáng chế có thể có cả hai vùng liên kết (Lx) và (Ly).

Mỗi vùng liên kết (Lx) và (Ly) đều có cấu trúc sao cho không có hiện tượng tự liên kết bổ sung xảy ra bên trong các vùng liên kết này.

Fig.1 thể hiện sơ đồ minh họa một ví dụ về phân tử ssNc không phải của sáng chế, không chứa vùng liên kết. Fig.1A là sơ đồ thể hiện thứ tự của các vùng tương ứng từ đầu 5' đến đầu 3' trong phân tử ssNc. Fig.1B là sơ đồ thể hiện trạng thái trong đó các sợi kép được tạo ra trong phân tử ssNc. Như được thể hiện trên Fig.1B, trong phân tử ssNc, vùng đầu 5' (Xc) cuộn gấp lại, nhờ đó sợi kép được tạo ra bởi vùng đầu 5' (Xc) và vùng bên trong đầu 5' (X), và vùng đầu 3' (Yc) cuộn gấp lại, nhờ đó sợi kép được tạo ra bởi vùng đầu 3' (Yc) và vùng bên trong đầu 3' (Y). Sơ đồ được thể hiện trên Fig.1 chỉ minh họa thứ tự trong đó các vùng tương ứng được liên kết với nhau và mối quan hệ về vị trí của các vùng tương ứng hình thành sợi kép, và sơ đồ này không giới hạn chiều dài và các yếu tố tương tự của mỗi vùng.

Fig.2 thể hiện sơ đồ minh họa một ví dụ về phân tử ssNc theo sáng chế bao gồm các vùng liên kết. Fig.2A là sơ đồ thể hiện thứ tự của các vùng tương ứng từ đầu 5' đến đầu 3' trong phân tử ssNc, làm ví dụ minh họa. Fig.2B là sơ đồ thể hiện trạng thái trong đó sợi kép được tạo ra trong phân tử ssNc. Như được thể hiện trên Fig.2B, trong phân tử ssNc, sợi kép được tạo ra giữa vùng đầu 5' (Xc) và vùng bên trong đầu 5' (X) và giữa vùng bên trong đầu 3' (Y) và vùng đầu 3' (Yc) tương ứng, và vùng Lx và vùng Ly, mỗi vùng là một cấu trúc vòng. Sơ đồ được thể hiện trên Fig.2 chỉ minh họa thứ tự trong đó các vùng tương ứng được liên kết với nhau và mối quan hệ về vị trí của các vùng tương ứng hình thành sợi kép, và sơ đồ này không giới hạn chiều dài và các yếu tố tương tự của mỗi vùng.

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, số lượng bazơ trong mỗi vùng đầu 5' (Xc), vùng bên trong đầu 5' (X), vùng bên trong đầu 3' (Y), và vùng đầu 3' (Yc) không bị giới hạn một cách cụ thể và có thể như sau. Theo sáng chế, thuật ngữ “số lượng bazơ”

có nghĩa là “chiều dài” và cũng có thể được gọi là “chiều dài của bazơ”.

Như đã mô tả trên đây, vùng đầu 5' (Xc) có thể hỗ trợ cho toàn bộ vùng bên trong đầu 5' (X). Trong trường hợp này, được ưu tiên là vùng (Xc) có cùng chiều dài bazơ với vùng (X), và được tạo bởi trình tự bazơ hỗ trợ cho toàn bộ vùng kéo dài từ đầu 5' đến đầu 3' của vùng (X). Được ưu tiên hơn nữa là vùng (Xc) có cùng chiều dài bazơ với vùng (X), và tất cả các bazơ trong vùng (Xc) hỗ trợ cho tất cả các bazơ trong vùng (X), nghĩa là vùng (Xc) hỗ trợ hoàn toàn cho vùng (X). Tuy nhiên, cần lưu ý rằng cấu hình của vùng (Xc) không chỉ giới hạn ở đó, và một hoặc một số bazơ trong vùng (Xc) có thể không hỗ trợ cho các bazơ tương ứng trong vùng (X) như đã mô tả trên đây.

Hơn nữa, như đã mô tả trên đây, vùng đầu 5' (Xc) có thể hỗ trợ cho một phần của vùng bên trong đầu 5' (X). Trong trường hợp này, được ưu tiên là vùng (Xc) có cùng chiều dài bazơ với một phần của vùng (X), nghĩa là vùng (Xc) được tạo bởi trình tự bazơ có chiều dài bazơ ngắn hơn so với chiều dài bazơ của vùng (X) một hoặc nhiều bazơ. Được ưu tiên hơn nữa là vùng (Xc) có cùng chiều dài bazơ với một phần của vùng (X) và tất cả bazơ trong vùng (Xc) hỗ trợ cho tất cả các bazơ trong một phần của vùng (X), nghĩa là vùng (Xc) hỗ trợ hoàn toàn cho một phần vùng (X). Tốt hơn, nếu một phần của vùng (X) là vùng (đoạn) có trình tự bazơ gồm các bazơ liên tiếp nhau bắt đầu từ bazơ ở đầu 5' (bazơ thứ nhất) trong vùng (X).

Như đã mô tả trên đây, vùng đầu 3' (Yc) có thể hỗ trợ cho toàn bộ vùng bên trong đầu 3' (Y). Trong trường hợp này, được ưu tiên là vùng (Yc) có cùng chiều dài bazơ với vùng (Y), và được tạo bởi trình tự bazơ hỗ trợ cho toàn bộ vùng kéo dài từ đầu 5' đến đầu 3' của vùng (Y). Được ưu tiên hơn nữa là vùng (Yc) có cùng chiều dài bazơ với vùng (Y), và tất cả bazơ trong vùng (Yc) hỗ trợ cho tất cả bazơ trong vùng (Y), nghĩa là vùng (Yc) hỗ trợ hoàn toàn cho vùng (Y). Tuy nhiên, cần lưu ý rằng cấu hình của vùng (Yc) không chỉ giới hạn ở đó, và một hoặc một số bazơ trong vùng (Yc) có thể không hỗ trợ cho các bazơ tương ứng trong vùng (Y) như đã mô tả trên đây.

Hơn nữa, như đã mô tả trên đây, vùng đầu 5' (Yc) có thể hỗ trợ cho một phần của vùng bên trong đầu 5' (Y). Trong trường hợp này, được ưu tiên là vùng (Yc) có cùng chiều dài bazơ với một phần của vùng (Y), nghĩa là vùng (Yc) được tạo bởi trình

tự bazơ có chiều dài bazơ ngắn hơn so với chiều dài bazơ của vùng (Y) một hoặc nhiều bazơ. Được ưu tiên hơn nữa là vùng (Yc) có cùng chiều dài bazơ với một phần của vùng (Y) và tất cả bazơ trong vùng (Yc) hỗ trợ cho tất cả bazơ trong một phần của vùng (Y), nghĩa là vùng (Yc) hỗ trợ hoàn toàn cho một phần vùng (Y). Tốt hơn, nếu một phần của vùng (Y) là vùng (đoạn) có trình tự bazơ gồm các bazơ liên tiếp nhau bắt đầu từ bazơ ở đầu 5' (bazơ thứ nhất) trong vùng (Y).

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, mối quan hệ giữa số lượng bazơ (Z) ở vùng bên trong (Z) với số lượng bazơ (X) ở vùng bên trong đầu 5' (X) và số lượng bazơ (Y) ở vùng bên trong đầu 3' (Y), và mối quan hệ của số lượng bazơ (Z) ở vùng bên trong (Z) với số lượng bazơ (X) ở vùng bên trong đầu 5' (X) và số lượng bazơ (Xc) ở vùng đầu 5' (Xc) thỏa mãn các điều kiện của biểu thức (1) và (2).

$$Z = X + Y \quad \dots (1)$$

$$Z \geq Xc + Yc \quad \dots (2)$$

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, mối quan hệ giữa số lượng bazơ (X) ở vùng bên trong đầu 5' (X) và số lượng bazơ (Y) ở vùng bên trong đầu 3' (Y) không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể đáp ứng điều kiện bất kỳ trong số các điều kiện của các biểu thức sau.

$$X = Y \quad \dots (19)$$

$$X < Y \quad \dots (20)$$

$$X > Y \quad \dots (21)$$

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, mối quan hệ giữa số lượng bazơ (X) ở vùng bên trong đầu 5' (X) và số lượng bazơ (Xc) ở vùng đầu 5' (Xc), và mối quan hệ giữa số lượng bazơ (Y) ở vùng bên trong đầu 3' (Y) và số lượng bazơ (Yc) ở vùng đầu 3' (Yc) đáp ứng điều kiện bất kỳ trong số các điều kiện từ (a) đến (d) sau đây.

(a) Điều kiện của biểu thức (3) và (4) được thỏa mãn.

$$X > Xc \quad \dots (3)$$

$$Y = Yc \quad \dots (4)$$

(b) Điều kiện của biểu thức (5) và (6) được thỏa mãn.

$$X = X_c \quad \dots (5)$$

$$Y > Y_c \quad \dots (6)$$

(c) Điều kiện của biểu thức (7) và (8) được thỏa mãn.

$$X > X_c \quad \dots (7)$$

$$Y > Y_c \quad \dots (8)$$

(d) Điều kiện của biểu thức (9) và (10) được thỏa mãn.

$$X = X_c \quad \dots (9)$$

$$Y = Y_c \quad \dots (10)$$

Trong các điều kiện từ (a) đến (d) đã mô tả trên đây, tốt hơn nếu sự khác biệt giữa số lượng bazơ (X) ở vùng bên trong đầu 5' (X) và số lượng bazơ (X_c) ở vùng đầu 5' (X_c), và sự khác biệt giữa số lượng bazơ (Y) ở vùng bên trong đầu 3' (Y) và số lượng bazơ (Y_c) ở vùng đầu 3' (Y_c) đáp ứng các điều kiện từ (a) đến (d) sau đây.

(a) Điều kiện của biểu thức (11) và (12) được thỏa mãn.

$$X - X_c = 1 \text{ đến } 10, \text{ tốt hơn là bằng } 1, 2, 3 \text{ hoặc } 4,$$

$$\text{và tốt hơn nữa là bằng } 1, 2 \text{ hoặc } 3 \quad \dots (11)$$

$$Y - Y_c = 0 \quad \dots (12)$$

(b) Điều kiện của biểu thức (13) và (14) được thỏa mãn.

$$X - X_c = 0 \quad \dots (13)$$

$$Y - Y_c = 1 \text{ đến } 10, \text{ tốt hơn là bằng } 1, 2, 3 \text{ hoặc } 4,$$

$$\text{và tốt hơn nữa là bằng } 1, 2 \text{ hoặc } 3 \quad \dots (14)$$

(c) Điều kiện của biểu thức (15) và (16) được thỏa mãn.

$$X - X_c = 1 \text{ đến } 10, \text{ tốt hơn là bằng } 1, 2 \text{ hoặc } 3,$$

$$\text{và tốt hơn nữa là bằng } 1 \text{ hoặc } 2 \quad \dots (15)$$

$$Y - Y_c = 0 \quad \dots (16)$$

(d) Điều kiện của biểu thức (17) và (18) được thỏa mãn.

$$X - X_c = 0 \quad \dots (17)$$

$$Y - Y_c = 0 \quad \dots (18)$$

Đối với phân tử ssNc thỏa mãn các điều kiện từ (a) đến (d), ví dụ về cấu trúc của các phân tử này được thể hiện lần lượt trong sơ đồ trên Fig.3. Fig.3 thể hiện phân tử ssNc bao gồm các vùng liên kết (Lx) và (Ly). Fig.3A thể hiện ví dụ về phân tử ssNc thỏa mãn điều kiện (a); Fig.3B thể hiện ví dụ về phân tử ssNc thỏa mãn điều kiện (b); Fig.3C thể hiện ví dụ về phân tử ssNc thỏa mãn điều kiện (c); và Fig.3D thể hiện ví dụ về phân tử ssNc thỏa mãn điều kiện (d). Trên Fig.3, đường nét đứt thể hiện trạng thái trong đó sợi kép được tạo ra bằng cách tự liên kết bổ sung. Phân tử ssNc được thể hiện trên Fig.3 đều là các ví dụ trong đó mối quan hệ giữa số lượng bazơ (X) ở vùng bên trong đầu 5' (X) và số lượng bazơ (Y) ở vùng bên trong đầu 3' (Y) thỏa mãn điều kiện " $X < Y$ " của biểu thức (20). Tuy nhiên, cần lưu ý rằng mối quan hệ về số lượng bazơ này không chỉ bị giới hạn ở đó, và " $X = Y$ " của biểu thức (19) hoặc " $X > Y$ " của biểu thức (21) cũng có thể được thỏa mãn. Sơ đồ được thể hiện trên Fig.3 chỉ minh họa mối quan hệ giữa vùng bên trong đầu 5' (X) và vùng đầu 5' (Xc) và mối quan hệ giữa vùng bên trong đầu 3' (Y) và vùng đầu 3' (Yc), và chúng không giới hạn chiều dài, hình dạng, và các đặc điểm tương tự của mỗi vùng, cũng như sự có mặt hoặc không có mặt của các vùng liên kết (Lx) và (Ly).

Mỗi phân tử ssNc thỏa mãn các điều kiện từ (a) đến (c) có cấu hình sao cho khi sợi kép lần lượt được tạo bởi vùng đầu 5' (Xc) và vùng bên trong đầu 5' (X) và vùng đầu 3' (Yc) và vùng bên trong đầu 3' (Y), vùng bên trong (Z) bao gồm ít nhất một bazơ không thể xếp thẳng hàng với vùng đầu 5' (Xc) hoặc vùng đầu 3' (Yc). Ở vùng bên trong (Z), bazơ không thể xếp thẳng hàng (bazơ không tạo thành sợi kép) sau đây còn được gọi là "bazơ không kết cặp". Trên Fig.3, vùng bao gồm (các) bazơ không kết cặp được thể hiện là "F". Số lượng bazơ ở vùng (F) không bị giới hạn một cách cụ thể. Số lượng bazơ (F) ở vùng (F) là như sau, chẳng hạn: " $X_c - X$ " trong trường hợp phân tử ssNc thỏa mãn điều kiện (a); " $Y - Y_c$ " trong trường hợp phân tử ssNc thỏa mãn điều kiện (b); và tổng của " $X_c - X$ " và " $Y - Y_c$ " trong trường hợp phân tử ssNc thỏa mãn điều kiện (c).

Mặt khác, phân tử ssNc thỏa mãn điều kiện (d) có cấu hình sao cho toàn bộ vùng

bên trong (Z) được xếp thẳng hàng với vùng đầu 5' (Xc) và vùng đầu 3' (Yc), nói cách khác, toàn bộ vùng bên trong (Z) tạo thành sợi kép. Trong phân tử ssNc thỏa mãn điều kiện (d), đầu 5' của vùng đầu 5' (Xc) và đầu 3' của vùng đầu 3' (Yc) không được liên kết với nhau.

Ví dụ về chiều dài của các vùng tương ứng trong phân tử ssNc theo sáng chế được nêu dưới đây. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng sáng chế không bị giới hạn ở những ví dụ đó. Theo sáng chế, khoảng giá trị số học đề cập đến số lượng bazơ để chỉ tất cả các số nguyên dương nằm trong khoảng đó. Chẳng hạn, cụm từ “1 đến 4 bazơ” có nghĩa là tất cả các số “1, 2, 3, và 4” bazơ (quy tắc này cũng áp dụng cho tất cả khoảng giá trị số học sau đây).

Tổng số bazơ ở vùng đầu 5' (Xc), bazơ ở vùng đầu 3' (Yc), và bazơ không kết cặp (F) ở vùng bên trong (Z) bằng với số lượng bazơ ở vùng bên trong (Z). Do đó, chiều dài của vùng đầu 5' (Xc) và vùng đầu 3' (Yc) có thể được xác định một cách thích hợp tùy thuộc vào chiều dài của vùng bên trong (Z), số lượng bazơ không kết cặp (F), và vị trí của bazơ không kết cặp.

Số lượng bazơ ở vùng bên trong (Z) là lớn hơn hoặc bằng 19. Giới hạn dưới của số lượng bazơ bằng 19, tốt hơn là bằng 20, và tốt hơn nữa là bằng 21. Giới hạn trên của số lượng bazơ bằng 30. Ví dụ cụ thể về số lượng bazơ ở vùng bên trong (Z) là 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, hoặc 30.

Vùng bên trong (Z) có thể là vùng chỉ gồm trình tự ức chế sự biểu hiện hoặc vùng bao gồm trình tự ức chế sự biểu hiện. Số lượng bazơ của trình tự ức chế sự biểu hiện, chẳng hạn, nằm trong khoảng từ 19 đến 30, tốt hơn là bằng 19, 20, hoặc 21. Trình tự ức chế sự biểu hiện còn có thể có trình tự bổ sung ở đầu 5' và/hoặc đầu 3' của nó. Tốt hơn, nếu số lượng bazơ trong trình tự bổ sung này nằm trong khoảng từ 1 đến 21, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 11, và vẫn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 7.

Số lượng bazơ ở vùng đầu 5' (Xc) nằm trong khoảng từ 1 đến 7, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 4, và đặc biệt tốt hơn là bằng 1, 2, hoặc 3.

Tốt hơn, nếu số lượng bazơ ở vùng đầu 3' (Yc) nằm trong khoảng từ 1 đến 7, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 4, và đặc biệt tốt hơn là bằng 1, 2, hoặc 3.

Như đã mô tả trên đây, mối quan hệ giữa số lượng bazơ ở vùng bên trong (Z), số lượng bazơ ở vùng đầu 5' (Xc), và số lượng bazơ ở vùng đầu 3' (Yc) có thể được thể hiện bằng biểu thức (2): " $Z \geq Xc + Yc$ ". Cụ thể, số lượng bazơ được thể hiện bằng " $Xc + Yc$ " bằng số lượng bazơ ở vùng bên trong (Z), hoặc thấp hơn số lượng bazơ ở vùng bên trong (Z). Trong trường hợp thứ hai, giá trị của biểu thức " $Z - (Xc + Yc)$ " có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 10, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 4, và tốt hơn nữa là bằng 1, 2, hoặc 3. Giá trị của biểu thức " $Z - (Xc + Yc)$ " tương ứng với số lượng bazơ (F) trong vùng bazơ không kết cặp (F) ở vùng bên trong (Z).

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, chiều dài của vùng liên kết (Lx) và (Ly) không bị giới hạn một cách cụ thể. Tốt hơn, nếu chiều dài của vùng liên kết (Lx) sao cho vùng bên trong đầu 5' (X) và vùng đầu 5' (Xc) có thể tạo thành sợi kép. Tốt hơn, nếu chiều dài của vùng liên kết (Lx) sao cho vùng bên trong đầu 3' (Y) và vùng đầu 3' (Yc) có thể tạo thành sợi kép. Khi các thành phần (tạo khối) của vùng liên kết (Lx) và (Ly) có bazơ, số lượng bazơ trong vùng liên kết (Lx) có thể là bằng hoặc khác với số lượng bazơ trong vùng liên kết (Ly). Tương tự, trình tự bazơ của chúng có thể là giống hoặc khác nhau. Giới hạn dưới của số lượng bazơ trong mỗi vùng liên kết (Lx) và (Ly) có thể là 1, tốt hơn là 2, và tốt hơn nữa là 3, và giới hạn trên của số lượng bazơ trong mỗi vùng liên kết có thể là 100, tốt hơn là 80, và tốt hơn nữa là 50. Cụ thể, số lượng bazơ trong mỗi vùng liên kết nằm trong khoảng từ 1 đến 50, nằm trong khoảng từ 1 đến 30, nằm trong khoảng từ 1 đến 20, nằm trong khoảng từ 1 đến 10, nằm trong khoảng từ 1 đến 7, hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 4, chẳng hạn, nhưng không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Chiều dài đầy đủ của phân tử ssNc theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể. Trong phân tử ssNc theo sáng chế, giới hạn dưới của tổng số bazơ (số lượng bazơ trong phân tử ssNc có chiều dài đầy đủ), có thể là 38, tốt hơn là 42, tốt hơn nữa là 50, tốt hơn nữa là 51, và đặc biệt tốt hơn là 52, và giới hạn trên của tổng số bazơ có thể là 300, tốt hơn là 200, tốt hơn nữa là 150, tốt hơn nữa là 100, và đặc biệt tốt hơn là 80.

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, giới hạn dưới của tổng số bazơ ngoại trừ vùng liên kết (Lx) và (Ly) là 38, tốt hơn là 42, tốt hơn nữa là 50, tốt hơn nữa là 51, và đặc biệt tốt hơn là 52, và giới hạn trên của tổng số bazơ có thể là 300, tốt hơn là 200, tốt hơn nữa là 150, tốt hơn nữa là 100, và đặc biệt tốt hơn là 80.

Các thành phần của phân tử ssNc theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể. Tuy nhiên, các gốc nucleotit là gốc ribonucleotit. Gốc nucleotit này có thể là gốc không được cải biến (gốc nucleotit không được cải biến) hoặc gốc được cải biến (gốc nucleotit được cải biến). Bằng cách tạo ra phân tử ssNc theo sáng chế để chứa gốc nucleotit được cải biến, có thể cải thiện tính kháng của phân tử ssNc với nucleaza, nhờ đó cho phép tính ổn định của phân tử ssNc được cải thiện. Hơn nữa, phân tử ssNc theo sáng chế có thể còn bao gồm gốc không phải nucleotit, ngoài gốc nucleotit. Chi tiết về gốc nucleotit và gốc không phải nucleotit sẽ được mô tả dưới đây.

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, tốt hơn nếu gốc nucleotit là thành phần của mỗi vùng bên trong (Z), vùng đầu 5' (Xc), và vùng đầu 3' (Yc). Mỗi vùng được tạo bởi các gốc từ (1) đến (3) sau đây.

- (1) (các) gốc nucleotit không được cải biến
- (2) (các) gốc nucleotit được cải biến
- (3) (các) gốc nucleotit không được cải biến và (các) gốc nucleotit được cải biến

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, các thành phần của vùng liên kết (Lx) và (Ly) không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ về các thành phần này bao gồm gốc nucleotit và gốc không phải nucleotit đã mô tả trên đây. Mỗi vùng liên kết có thể gồm chỉ (các) gốc nucleotit, chỉ (các) gốc không phải nucleotit, hoặc cả (các) gốc nucleotit và (các) gốc không phải nucleotit. Mỗi vùng liên kết được tạo bởi các gốc từ (1) đến (7) sau đây.

- (1) (các) gốc nucleotit không được cải biến
- (2) (các) gốc nucleotit được cải biến
- (3) (các) gốc nucleotit không được cải biến và (các) gốc nucleotit được cải biến

(4) (các) gốc không phải nucleotit

(5) (các) gốc không phải nucleotit và (các) gốc nucleotit không được cải biến

(6) (các) gốc không phải nucleotit và (các) gốc nucleotit được cải biến

(7) (các) gốc không phải nucleotit, (các) gốc nucleotit không được cải biến, và (các) gốc nucleotit được cải biến

Các thành phần của cả hai vùng (Lx) và (Ly) có thể giống hoặc khác nhau. Ví dụ cụ thể về các thành phần của cả hai vùng này là gốc nucleotit; các thành phần của cả hai vùng này là gốc không phải nucleotit; và thành phần của một trong hai vùng là gốc nucleotit trong khi thành phần của vùng liên kết còn lại là gốc không phải nucleotit.

Ví dụ về phân tử ssNc theo sáng chế bao gồm: phân tử chỉ gồm các gốc nucleotit; và phân tử bao gồm cả (các) gốc không phải nucleotit, ngoài các gốc nucleotit. Trong phân tử ssNc theo sáng chế, các gốc nucleotit có thể chỉ là gốc nucleotit không được cải biến; chỉ (các) gốc nucleotit được cải biến; hoặc cả (các) gốc nucleotit không được cải biến và (các) gốc nucleotit được cải biến, như đã mô tả trên đây. Khi phân tử ssNc bao gồm cả (các) gốc nucleotit không được cải biến và (các) gốc nucleotit được cải biến, số lượng gốc nucleotit được cải biến không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể là “một hoặc nhiều”, cụ thể là nằm trong khoảng từ 1 đến 5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 4, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 3, và tốt nhất là bằng 1 hoặc 2. Khi phân tử ssNc theo sáng chế bao gồm (các) gốc không phải nucleotit, số lượng (các) gốc không phải nucleotit không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể là “một hoặc nhiều”, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1 đến 8, nằm trong khoảng từ 1 đến 6, nằm trong khoảng từ 1 đến 4, hoặc bằng 1, 2, hoặc 3.

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, gốc nucleotit là gốc ribonucleotit. Do đó, phân tử ssNc theo sáng chế còn được gọi là “phân tử ARN” hoặc “phân tử ARN sợi đơn”. Ví dụ về phân tử ARN sợi đơn bao gồm: các phân tử chỉ bao gồm các gốc ribonucleotit; và phân tử bao gồm (các) gốc không phải nucleotit, ngoài các gốc ribonucleotit. Như đã mô tả trên đây, để làm các gốc ribonucleotit, phân tử ARN sợi đơn có thể bao gồm: chỉ các gốc ribonucleotit không được cải biến; chỉ các gốc

ribonucleotit được cải biến; hoặc cả (các) gốc ribonucleotit không được cải biến và (các) gốc ribonucleotit được cải biến.

Khi phân tử ARN sợi đơn bao gồm (các) gốc ribonucleotit được cải biến, ngoài các gốc ribonucleotit không được cải biến, số lượng (các) gốc ribonucleotit được cải biến không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể là “một hoặc nhiều”, chẳng hạn, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 4, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 3, và tốt nhất là bằng 1 hoặc 2. Gốc ribonucleotit được cải biến trái ngược với gốc ribonucleotit không được cải biến có thể là gốc deoxyribonucleotit thu được bằng cách thay thế gốc riboza bằng gốc deoxyriboza. Khi phân tử ARN sợi đơn bao gồm (các) gốc deoxyribonucleotit, ngoài (các) gốc ribonucleotit không được cải biến, chẳng hạn, số lượng (các) gốc deoxyribonucleotit không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể là “một hoặc nhiều”, chẳng hạn, nằm trong khoảng từ 1 đến 5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 4, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 3, và tốt nhất là bằng 1 hoặc 2.

Phân tử ssNc theo sáng chế có thể bao gồm chất đánh dấu (gen đánh dấu), và có thể được đánh dấu bằng chất đánh dấu. Chất đánh dấu không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể là chất đánh dấu huỳnh quang, thuốc nhuộm, chất đồng vị, hoặc chất tương tự. Ví dụ về chất đánh dấu huỳnh quang bao gồm: các nhóm huỳnh quang như pyren, TAMRA, florescein, thuốc nhuộm Cy3, và thuốc nhuộm Cy5. Ví dụ về thuốc nhuộm bao gồm thuốc nhuộm Alexa như Alexa 488. Các ví dụ về chất đồng vị bao gồm chất đồng vị ổn định và chất đồng vị phóng xạ. Trong số chúng, chất đồng vị ổn định là được ưu tiên. Chất đồng vị ổn định có nguy cơ phơi nhiễm phóng xạ thấp, và không cần máy móc tinh vi. Do đó, chất đồng vị ổn định có thể xử lý một cách dễ dàng và có thể góp phần làm giảm giá thành sản phẩm. Hơn nữa, đồng vị ổn định không làm thay đổi đặc tính vật lý của hợp chất được đánh dấu, và do đó có thể đảm bảo đặc tính tốt của chất được đánh dấu. Chất đồng vị ổn định không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ về chất đồng vị ổn định bao gồm ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{33}S , ^{34}S , và, ^{36}S .

Như đã mô tả trên đây, phân tử ssNc theo sáng chế có thể ức chế sự biểu hiện của gen đích. Do đó, phân tử ssNc theo sáng chế có thể được sử dụng làm chất điều trị

để điều trị bệnh do gen gây ra. Khi phân tử ssNc bao gồm trình tự ức chế sự biểu hiện là trình tự ức chế sự biểu hiện của gen gây bệnh, có thể điều trị bệnh bằng cách ức chế sự biểu hiện của gen đích. Theo sáng chế, thuật ngữ “điều trị” bao gồm: ngăn ngừa bệnh; cải thiện tình trạng bệnh; và cải thiện mức độ tiên lượng bệnh và có thể có nghĩa bất kỳ trong số các nghĩa này.

Phương pháp sử dụng phân tử ssNc theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể. Chẳng hạn, phân tử ssNc có thể được sử dụng cho đối tượng có gen đích.

Ví dụ về đối tượng có thể sử dụng phân tử ssNc theo sáng chế bao gồm tế bào, mô, và cơ quan. Đối tượng còn có thể bao gồm người và động vật không phải người như động vật có vú không phải người, nghĩa là động vật có vú ngoại trừ người. Việc sử dụng có thể được thực hiện *in vivo* hoặc *in vitro*. Tế bào không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ về tế bào bao gồm: các loại tế bào được nuôi cấy khác nhau như tế bào HeLa, tế bào 293, tế bào NIH3T3, và tế bào COS; tế bào gốc như tế bào ES và tế bào gốc tạo máu; và tế bào được phân lập từ cơ thể sống, như tế bào được nuôi cấy sơ cấp.

Theo sáng chế, gen đích có sự biểu hiện cần được ức chế không bị giới hạn một cách cụ thể, và gen mong muốn bất kỳ có thể được thiết lập là gen đích. Sau khi thiết lập gen đích, trình tự ức chế sự biểu hiện có thể được thiết kế khi thích hợp tùy theo loại gen đích, như đã mô tả trên đây.

Ví dụ cụ thể về phân tử ssNc theo sáng chế sẽ được đưa ra dưới đây. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng sáng chế không bị giới hạn ở những phương án ví dụ này. Ví dụ về trình tự bazơ của phân tử ssNc bao gồm: trình tự bazơ trong SEQ ID NO: 2, 7, 8, 13, 14, 29 - 35, 37, 43, 44, 47, 48, và 51 - 80; và trình tự bazơ thu được bằng cách, chẳng hạn, loại bỏ, thay thế và/hoặc bổ sung thêm một hoặc nhiều bazơ vào các trình tự bazơ này. Khi gen đích là gen GAPDH, ví dụ về trình tự bazơ của phân tử ssNc bao gồm trình tự bazơ trong SEQ ID NO: 2, 7, 8, 13, 37 và 51 - 80. Khi gen đích là TGF- β 1, ví dụ về trình tự bazơ của phân tử ssNc bao gồm trình tự bazơ trong SEQ ID NO: 14 và 29 - 35. Khi gen đích là gen LAMA1, ví dụ về trình tự bazơ của phân tử ssNc bao gồm trình tự bazơ trong SEQ ID NO: 43 và 44. Khi gen đích là gen LMNA, ví dụ về trình tự bazơ của phân tử ssNc bao gồm trình tự bazơ trong SEQ ID NO: 47 và 48.

Để sử dụng phân tử ssNc theo sáng chế, có thể tham khảo phần mô tả sau đây đề cập đến chế phẩm, phương pháp ức chế, phương pháp điều trị, và các khía cạnh tương tự theo sáng chế.

Do phân tử ssNc theo sáng chế có thể ức chế sự biểu hiện của gen đích như đã mô tả trên đây, nó hữu dụng làm dược chất, chất chẩn đoán, hóa chất nông nghiệp và công cụ hữu hiệu để tiến hành nghiên cứu trong lĩnh vực hóa nông, khoa học y học, khoa học đời sống và lĩnh vực tương tự.

2. Gốc nucleotit

Gốc nucleotit bao gồm các thành phần là đường, bazơ, và phosphat. Gốc nucleotit là gốc ribonucleotit như đã mô tả trên đây. Gốc ribonucleotit có: riboza là đường; và adenin (A), guanin (G), xytosin (C), hoặc uraxil (U) là bazơ.

Gốc nucleotit có thể là gốc nucleotit không được cải biến hoặc gốc nucleotit được cải biến. Các thành phần của gốc nucleotit không được cải biến là giống hoặc gần giống với các thành phần của gốc nucleotit có trong tự nhiên. Tốt hơn, nếu các thành phần của gốc nucleotit không được cải biến là giống hoặc gần như giống với các thành phần của gốc nucleotit trong tự nhiên của cơ thể người.

Gốc nucleotit được cải biến là gốc nucleotit thu được bằng cách cải biến gốc nucleotit không được cải biến. Gốc nucleotit được cải biến có thể là gốc nucleotit sao cho thành phần bất kỳ trong số các thành phần của nucleotit không được cải biến sẽ được cải biến. Theo sáng chế, “sự cải biến” có nghĩa là sự thay thế, bổ sung thêm, và/hoặc loại bỏ thành phần bất kỳ trong số các thành phần; và sự thay thế, bổ sung thêm, và/hoặc loại bỏ (các) nguyên tử và/hoặc (các) nhóm chức trong (các) thành phần này. Quá trình này còn được gọi là “làm thay đổi”. Ví dụ về gốc nucleotit được cải biến bao gồm các gốc nucleotit có trong tự nhiên và gốc nucleotit được cải biến bằng phương pháp nhân tạo. Có thể tham khảo các gốc nucleotit được cải biến có nguồn gốc tự nhiên trong tài liệu “Limbach et al. (1994, Summary: the modified nucleosides of RNA, Nucleic Acids Res. 22: pp. 2183 - 2196). Gốc nucleotit được cải biến có thể là gốc thay thế của nucleotit.

Ví dụ về sự cải biến gốc nucleotit bao gồm sự cải biến khung riboza-phosphat (sau đây được gọi là “khung ribophosphat”).

Trong khung ribophosphat, gốc riboza có thể được cải biến. Trong gốc riboza, chẳng hạn, nguyên tử cacbon ở vị trí 2 có thể được cải biến. Cụ thể, nhóm hydroxyl liên kết với nguyên tử cacbon ở vị trí 2 có thể được thế bằng nguyên tử hydro hoặc nguyên tử halogen như flo. Bằng cách thay thế nhóm hydroxyl liên kết với nguyên tử cacbon ở vị trí 2 bằng hydro, có thể thay thế gốc riboza bằng deoxyriboza. Gốc riboza có thể được thế bằng chất đồng phân lập thể của nó, và có thể được thế bằng gốc arabinoza.

Khung ribophosphat có thể được thế bằng khung không phải ribophosphat có gốc không phải là riboza và/hoặc gốc không phải phosphat. Khung không phải ribophosphat có thể là khung ribophosphat được cải biến để không mang điện tích. Ví dụ về các nhóm thế thu được bằng cách thế khung ribophosphat bằng khung không phải ribophosphat trong nucleotit bao gồm morpholino, xyclobutyl, và pyrrolidin. Các ví dụ khác về nhóm thế bao gồm các gốc monome axit nucleic nhân tạo. Ví dụ cụ thể về các nhóm thế bao gồm PNA (axit nucleic của peptit), LNA (axit nucleic được khóa), và ENA (axit nucleic được liên hợp với 2'-O,4'-C-Etylen). Trong số đó, PNA là được ưu tiên.

Trong khung ribophosphat, nhóm phosphat có thể được cải biến. Trong khung ribophosphat, nhóm phosphat ở vị trí gần nhất với gốc đường được gọi là “nhóm α -phosphat”. Nhóm α -phosphat có điện tích âm, và điện tích được phân bố đều trên hai nguyên tử oxy không liên kết với gốc đường. Trong số bốn nguyên tử oxy trong nhóm α -phosphat, hai nguyên tử oxy không liên kết với gốc đường trong liên kết phosphodiester giữa các gốc nucleotit sau đây được gọi là “nguyên tử oxy không liên kết”. Mặt khác, hai nguyên tử oxy liên kết với gốc đường trong liên kết phosphodiester giữa các gốc nucleotit sau đây được gọi là “nguyên tử oxy liên kết”. Tốt hơn, nếu nhóm α -phosphat được cải biến để không mang điện tích, hoặc để thay đổi sự phân bố điện tích giữa các nguyên tử oxy không liên kết không đối xứng.

Trong nhóm phosphat, (các) nguyên tử oxy không liên kết có thể được thế. (Các) nguyên tử oxy có thể được thế bằng nguyên tử bất kỳ được chọn từ S (lưu huỳnh), Se

(selen), B (bo), C (cacbon), H (hydro), N (nitơ), và OR (R là nhóm alkyl hoặc nhóm aryl), chẳng hạn, và được ưu tiên là thế bằng S. Được ưu tiên là cả hai nguyên tử oxy không liên kết đều được thế, và được ưu tiên hơn nữa là cả hai nguyên tử oxy không liên kết đều được thế bằng S. Ví dụ về nhóm phosphat được cải biến bao gồm phosphorothioat, phosphorodithioat, phosphoroselenat, borano phosphat, borano phosphat este, hydro phosphonat, phosphoroamitat, alkyl hoặc aryl phosphonat, và phosphotrieste. Cụ thể, được ưu tiên là phosphorodithioat trong đó cả hai nguyên tử oxy không liên kết đều được thế bằng S.

Trong nhóm phosphat, (các) nguyên tử oxy liên kết có thể được thế. (Các) nguyên tử oxy này có thể được thế bằng nguyên tử bất kỳ được chọn từ nguyên tử S (lưu huỳnh), C (cacbon), và N (nitơ). Ví dụ về nhóm phosphat được cải biến bao gồm: phosphoroamitat có liên kết cầu được tạo ra từ quá trình thế bằng nguyên tử N; phosphorothioat có liên kết cầu được tạo ra từ quá trình thế bằng S; và metylenphosphonat có liên kết cầu được tạo ra từ quá trình thế bằng C. Tốt hơn, nếu quá trình thế (các) nguyên tử oxy liên kết được thực hiện ở ít nhất một góc trong số góc nucleotit đầu 5' và góc nucleotit đầu 3' của phân tử ssNc theo sáng chế. Khi quá trình thế được thực hiện ở đầu 5', tốt hơn là thế bằng C. Khi quá trình thế được thực hiện ở đầu 3', tốt hơn là thế bằng N.

Nhóm phosphat có thể được thế bằng nhóm liên kết không phosphat. Nhóm liên kết này có thể chứa siloxan, cacbonat, carboxymetyl, carbamat, amit, thioete, nhóm liên kết etylen oxit, sulfonat, sulfonamit, thioformaxetal, formaxetal, oxime, metylenimino, metylenmetylimino, metylenhydrazo, metylendimetylhydrazo, metylenoxymetylimino, hoặc nhóm tương tự. Tốt hơn, nếu nhóm liên kết có thể chứa nhóm metylen cacbonyl amino và metylenmetylimino.

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, ít nhất một góc nucleotit ở đầu 3' và góc nucleotit ở đầu 5' có thể được thế. Góc nucleotit ở đầu 3' hoặc đầu 5' có thể được cải biến, hoặc góc nucleotit ở cả hai đầu 3' và đầu 5' có thể được cải biến. Quá trình cải biến có thể được thực hiện như đã mô tả trên đây, chẳng hạn, và tốt hơn là cải biến nhóm phosphat ở (các) đầu. Toàn bộ nhóm phosphat có thể được cải biến, hoặc một

hoặc nhiều nguyên tử trong nhóm phosphat có thể được cải biến. Trong trường hợp thứ nhất, toàn bộ nhóm phosphat có thể được thế hoặc bị loại bỏ.

Sự cải biến (các) gốc nucleotit ở (các) đầu có thể là bổ sung thêm phân tử khác bất kỳ. Ví dụ về phân tử khác này bao gồm phân tử chức năng như chất đánh dấu đã mô tả trên đây và nhóm bảo vệ. Ví dụ về các nhóm bảo vệ bao gồm S (lưu huỳnh), Si (silicon), B (bo), và nhóm chứa este. Các phân tử chức năng như chất đánh dấu có thể được sử dụng để phát hiện phân tử ssNc theo sáng chế.

Phân tử khác có thể được bổ sung thêm vào nhóm phosphat của gốc nucleotit, hoặc có thể được bổ sung thêm vào nhóm phosphat hoặc gốc đường thông qua nhóm đệm. Nguyên tử cuối cùng của nhóm đệm có thể được thêm vào hoặc được thế bằng một trong số hai nguyên tử oxy liên kết của nhóm phosphat, hoặc O, N, S, hoặc C của gốc đường. Tốt hơn, nếu vị trí liên kết trong gốc đường tốt hơn nếu là C ở vị trí 3', C ở vị trí 5', hoặc nguyên tử bất kỳ liên kết với các nguyên tử cacbon ở vị trí đó. Nhóm đệm cũng có thể được bổ sung thêm hoặc thế vào nguyên tử tận cùng của nhóm thay thế nucleotit như PNA.

Nhóm đệm không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ về nhóm đệm bao gồm $-(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nN-$, $-(CH_2)_nO-$, $-(CH_2)_nS-$, $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$, đường không có tính bazơ, amit, carboxy, amin, oxyamin, oxyimin, thioete, disulfit, thioure, sulfonamit, và morpholino, cũng như chất phản ứng biotin và floresxein. Trong các công thức trên, n là số nguyên dương, và tốt hơn là n = 3 hoặc 6.

Các ví dụ khác về phân tử được bổ sung thêm vào phân tử ssNc theo sáng chế bao gồm thuốc nhuộm, chất đan xen (ví dụ, acridin), chất tạo liên kết ngang (ví dụ, psoralen, mitomycin C), porphyrin (TPPC4, texaphyrin, Sapphyrin), hydrocacbon thơm đa vòng (ví dụ, phenazin, dihydrophenazin), endonucleaza nhân tạo (ví dụ, EDTA), chất mang ưa chất béo (ví dụ, cholesterol, axit cholic, axit adamantan axetic, axit 1-pyren butyric, dihydrotestosteron, 1,3-Bis-O (hexadexyl)glyxerol, nhóm geranyloxyhexyl, hexadexylglyxerol, borneol, menthol, 1,3-propandiol, nhóm heptadexyl, axit palmitic, axit myristic, axit O3-(oleoyl)lithocholic, axit O3-(oleoyl)cholic, dimetoxytrityl, hoặc phenoxazin), phức chất peptit (ví dụ, antennapedia

peptit, tat peptit), chất alkyl hóa, phosphat, amino, mercapto, PEG (ví dụ, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, polyamino, alkyl, alkyl được thế, gen đánh dấu được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, enzym, hapten (ví dụ, biotin), chất hỗ trợ vận chuyển/hấp thu (ví dụ, aspirin, vitamin E, axit folic), và ribonucleaza tổng hợp (ví dụ, imidazol, bisimidazol, histamin, chùm imidazol, phức hợp acridin-imidazol, phức hợp Eu³⁺ của vòng tetraazamacro).

Trong phân tử ssNc theo sáng chế, đầu 5' có thể được cải biến bằng nhóm phosphat hoặc chất tương tự của nhóm phosphat. Các ví dụ về nhóm phosphat bao gồm:

5'-monophosphat((HO)₂(O)P-O-5');

5'-diphosphat((HO)₂(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');

5'-triphosphat(HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');

5'-guanosin (metyl hóa hoặc không được metyl hóa ở vị trí 7),

7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');

5'-adenosin (A_{ppp});

cấu trúc phân tử nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến bất kỳ (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');

5'-monothiophosphat (phosphorothioat: (HO)₂(S)P-O-5');

5'-monodithiophosphat (phosphorodithioat: (HO)(HS)(S)P-O-5');

5'-phosphorothiolat ((HO)₂(O)P-S-5');

monophosphat, diphosphat, và triphosphat được thế lưu huỳnh (ví dụ, 5'-α-thiotriphosphat, 5'-γ-thiotriphosphat, và nhóm tương tự);

5'-phosphoramitat ((HO)₂(O)P-NH-5', (HO)(NH₂)(O)P-O-5');

5'-alkylphosphonat (ví dụ, RP(OH)(O)-O-5', (OH)₂(O)P-5'-CH₂, trong đó R là nhóm alkyl (ví dụ, metyl, etyl, isopropyl, propyl, hoặc nhóm tương tự)); và

5'-alkyletephosphonat (ví dụ, RP(OH)(O)-O-5', trong đó R là alkylete (ví dụ, metoxymetyl, etoxymetyl, hoặc nhóm tương tự)).

Trong gốc nucleotit, bazơ không bị giới hạn một cách cụ thể. Bazơ có thể là

bazơ tự nhiên hoặc bazơ không có nguồn gốc tự nhiên. Bazơ có thể là bazơ có nguồn gốc tự nhiên hoặc bazơ tổng hợp. Có thể sử dụng bazơ thông thường (phổ biến), chất tương tự được cải biến của nó, và các bazơ tương tự.

Ví dụ về bazơ bao gồm: các bazơ purin như adenin và guanin; và các bazơ pyrimidin như xytosin, uraxil, và thymin. Các ví dụ khác về bazơ bao gồm inosin, thymin, xanthin, hypoxanthin, nubularin, isoguanisin, và tuberxidin. Ví dụ về bazơ còn bao gồm: dẫn xuất alkyl như 2-aminoadenin, purin được metyl hóa ở vị trí 6, và purin được propyl hóa ở vị trí 2; 5-halouraxil và 5-haloxytosin; 5-propynyl uraxil và 5-propynyl xytosin; 6-azo uraxil, 6-azo xytosin, và 6-azo thymin; 5-uraxil (giả uraxil), 4-thiouraxil, 5-halouraxil, 5-(2-aminopropyl)uraxil, 5-amino allyl uraxil; purin được halogen hóa ở vị trí 8, được amin hóa, thiol hóa, thioalkyl hóa, hydroxyl hóa, và purin được thế ở vị trí 8 khác; pyrimidin được triflometyl hóa ở vị trí 5 và các pyrimidin được thế ở vị trí 5; 7-methylguanin; pyrimidin được thế ở vị trí 5; 6-azapyrimidin; purin được thế N-2, N-6, và O-6 (bao gồm cả 2-aminopropyladenin); 5-propynyluraxil và 5-propynylxytosin; dihydrouraxil; 3-deaza-5-azaxytosin; 2-aminopurin; 5-alkyluraxil; 7-alkylguanin; 5-alkylxytosin; 7-deazaadenin; N⁶,N⁶-dimethyladenin; 2,6-diaminopurin; 5-amino-allyl-uraxil; N³-methyluraxil; 1,2,4-triazol được thế; 2-pyridinon; 5-nitroindol; 3-nitropyrol; 5-metoxyraxil; axit uraxil-5-oxyaxetic; 5-metoxycacbonylmethyluraxil; 5-methyl-2-thiouraxil; 5-metoxycacbonylmethyl-2-thiouraxil; 5-methylaminomethyl-2-thiouraxil; 3-(3-amino-3-carboxypropyl)uraxil; 3-methylxytosin; 5-methylxytosin; N⁴-axetylxytosin; 2-thioxytosin; N⁶-methyladenin; N⁶-isopentyladenin; 2-methylthio-N⁶-isopentenyladenin; N-methylguanin; và bazơ được O-alkyl hóa. Ví dụ về purin và pyrimidin bao gồm các hợp chất được mô tả trong Bảng độc quyền sáng chế Mỹ số US 3687808, "Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering", trang 858 đến 859, của Kroschwitz J. I, John Wiley & Sons, 1990, và Englisch et al, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, vol. 30, p. 613.

Ví dụ khác về gốc nucleotit được cải biến bao gồm các gốc nucleotit không chứa bazơ, nghĩa là gốc có khung ribophosphat không có tính bazơ. Hơn nữa, có thể sử dụng gốc nucleotit được cải biến được mô tả trong Đơn đăng ký sáng chế Mỹ số 60/465665

(ngày nộp đơn 25/04/2003) và Công bố đơn quốc tế số WO 2004/080406 (ngày nộp đơn 08/03/2004).

3. Gốc không phải nucleotit

Gốc không phải nucleotit không bị giới hạn một cách cụ thể. Phân tử ssNc theo sáng chế có thể bao gồm gốc không phải nucleotit, cấu trúc không phải nucleotit chứa khung pyrrolidin hoặc piperidin.

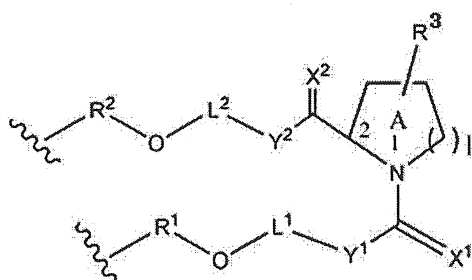
Khung pyrrolidin có thể khung của dẫn xuất pyrrolidin thu được bằng cách thế ít nhất một nguyên tử cacbon trong vòng pyrrolidin có 5 cạnh. Trong trường hợp này, tốt hơn nếu thế (các) nguyên tử cacbon không phải C-2. Nguyên tử cacbon có thể được thế bằng nguyên tử nitơ, oxy, hoặc lưu huỳnh. Khung pyrrolidin có thể chứa liên kết đôi cacbon-cacbon hoặc liên kết đôi cacbon-nitơ trong vòng pyrrolidin có 5 cạnh, chẳng hạn. Trong khung pyrrolidin, các nguyên tử cacbon và nitơ tạo thành vòng pyrrolidin có 5 cạnh, mỗi nguyên tử đều có một nguyên tử hydro liên kết với chúng hoặc nhóm thế được mô tả dưới đây liên kết với chúng. Vùng liên kết (Lx) có thể liên kết với vùng (X) và (Xc) qua nhóm bất kỳ trong khung pyrrolidin, tốt hơn là một nguyên tử cacbon hoặc nguyên tử nitơ bất kỳ trong vòng có 5 cạnh, và tốt hơn nữa là nguyên tử cacbon ở vị trí 2 (C-2) hoặc nguyên tử nitơ trong vòng có 5 cạnh. Ví dụ về khung pyrrolidin bao gồm khung prolin và prolinol. Khung prolin, khung prolinol, và khung tương tự có độ an toàn rất cao do chúng là các chất có trong cơ thể sống và các chất khử của chúng.

Khung piperidin có thể khung của dẫn xuất piperidin thu được bằng cách thế ít nhất một nguyên tử cacbon trong vòng piperidin có 6 cạnh. Trong trường hợp này, tốt hơn nếu thế nguyên tử cacbon không phải C-2. Nguyên tử cacbon có thể được thế bằng nguyên tử nitơ, oxy, hoặc lưu huỳnh. Khung piperidin có thể chứa liên kết đôi cacbon-cacbon hoặc liên kết đôi cacbon-nitơ trong vòng piperidin 6 cạnh, chẳng hạn. Trong khung piperidin, các nguyên tử cacbon và nitơ tạo thành vòng piperidin có 6 cạnh, mỗi liên kết này đều có một nguyên tử hydro liên kết với chúng hoặc nhóm thế được mô tả dưới đây liên kết với chúng. Vùng liên kết (Lx) có thể liên kết với vùng (X) và (Xc) qua nhóm bất kỳ trong khung piperidin, tốt hơn là nguyên tử cacbon bất kỳ hoặc nguyên tử

nitơ trong vòng có 6 cạnh, và tốt hơn nữa là nguyên tử cacbon ở vị trí 2 (C-2) hoặc nguyên tử nitơ trong vòng có 6 cạnh. Nguyên tắc tương tự cũng áp dụng cho vùng liên kết (Ly).

Mỗi vùng liên kết có thể gồm (các) gốc không phải nucleotit chỉ có cấu trúc không phải nucleotit, hoặc có thể chứa (các) gốc không phải nucleotit có cấu trúc không phải nucleotit và (các) gốc nucleotit.

Vùng liên kết có công thức (I) sau đây.



... (I)

Trong công thức (I),

mỗi nhóm X^1 và X^2 độc lập là H_2 , O, S, hoặc NH;

mỗi nhóm Y^1 và Y^2 độc lập là liên kết đơn, CH_2 , NH, O, hoặc S;

R^3 là nguyên tử hydro hoặc nhóm thế liên kết với C-3, C-4, C-5, hoặc C-6 trên vòng A;

nhóm thế là OH, OR^4 , NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , SH, SR^4 , hoặc nhóm oxo ($=O$);

khi R^3 là nhóm thế, có thể có một nhóm thế R^3 , hai hoặc nhiều nhóm thế R^3 , hoặc không có nhóm thế R^3 , và khi có nhiều nhóm thế R^3 , chúng có thể giống hoặc khác nhau;

mỗi nhóm R^4 và R^5 là nhóm thế hoặc nhóm bảo vệ, và chúng có thể giống hoặc khác nhau;

L^1 là mạch alkylen gồm n nguyên tử, và (các) nguyên tử hydro trên các nguyên tử cacbon của alkylen có thể được thế hoặc không được thế bằng nhóm OH, OR^a , NH_2 , NHR^a , NR^aR^b , SH, hoặc SR^a , hoặc,

L^1 là mạch polyete thu được bằng cách thế ít nhất một nguyên tử cacbon trên

mạch alkylen bằng một nguyên tử oxy,

với điều kiện là: khi Y^1 là NH, O, hoặc S, nguyên tử liên kết với Y^1 trong L^1 là nguyên tử cacbon, nguyên tử liên kết với OR^1 trong L^1 là nguyên tử cacbon, và các nguyên tử oxy không liền kề với nhau;

L^2 là mạch alkylen gồm m nguyên tử, và (các) nguyên tử hydro trong mạch cacbon alkylen có thể được thế hoặc không được thế bằng nhóm OH, OR^c , NH_2 , NHR^c , NR^cR^d , SH, hoặc SR^c , hoặc

L^2 là mạch polyete thu được bằng cách thế ít nhất một nguyên tử cacbon trên mạch alkylen bằng một nguyên tử oxy,

với điều kiện là: khi Y^2 là NH, O, hoặc S, nguyên tử liên kết với Y^2 trong L^2 là nguyên tử cacbon, nguyên tử liên kết với OR^2 trong L^2 là nguyên tử cacbon, và các nguyên tử oxy không liền kề với nhau;

mỗi nhóm R^a , R^b , R^c , và R^d độc lập là nhóm thế hoặc nhóm bảo vệ;

l bằng 1 hoặc 2;

m là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 30;

n là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 30;

trên vòng A, một nguyên tử cacbon không phải C-2 có thể được thế bằng nguyên tử nitơ, oxy, hoặc lưu huỳnh, và

vòng A có thể chứa liên kết đôi cacbon-cacbon hoặc liên kết đôi cacbon-nitơ. Khi vùng liên kết (L_x) có công thức (I), mỗi vùng (X_c) và (X) sẽ liên kết với vùng liên kết (L_x) qua nhóm $-OR^1-$ hoặc $-OR^2-$. Hơn nữa, khi vùng liên kết (L_y) có công thức (I), mỗi vùng (Y_c) và (Y) sẽ liên kết với vùng liên kết (L_y) qua nhóm $-OR^1-$ hoặc $-OR^2-$. Cần lưu ý rằng R^1 và R^2 có thể có mặt hoặc không có mặt, và nếu chúng có mặt, mỗi nhóm R^1 và R^2 độc lập là gốc nucleotit hoặc cấu trúc có công thức (I).

Trong công thức (I), mỗi nhóm X^1 và X^2 độc lập là H_2 , O, S, hoặc NH. Trong công thức (I), " X^1 là H_2 " nghĩa là X^1 sẽ tạo thành nhóm CH_2 (nhóm metylen) cùng với nguyên tử cacbon liên kết với X^1 . Nguyên tắc tương tự áp dụng cho X^2 .

Trong công thức (I), l trong vòng A bằng 1 hoặc 2. Khi l = 1, vòng A là vòng có

5 cạnh, vòng này là khung pyrrolidin. Khung pyrrolidin có thể là khung prolin, khung prolinol, hoặc khung tương tự, và ví dụ cụ thể bao gồm cấu trúc hóa trị hai của khung prolin và khung prolinol. Khi $l = 2$, vòng A là vòng có 6 cạnh, vòng này là khung piperidin. Trên vòng A, một nguyên tử cacbon không phải C-2 có thể được thế bằng nguyên tử nitơ, oxy, hoặc lưu huỳnh. Hơn nữa, vòng A có thể chứa liên kết đôi cacbon-cacbon hoặc liên kết đôi cacbon-nitơ. Vòng A có thể ở dạng L hoặc D.

Trong công thức (I), mỗi nhóm Y^1 và Y^2 độc lập là liên kết đơn, CH_2 , NH , O , hoặc S .

Trong công thức (I), R^3 là nguyên tử hydro hoặc nhóm thế liên kết với C-3, C-4, C-5, hoặc C-6 trên vòng A. Nhóm thế là nhóm OH , OR^4 , NH_2 , NHR^4 , NR^4R^5 , SH , SR^4 , hoặc nhóm oxo ($=O$). Khi R^3 là nhóm thế, có thể có một nhóm thế R^3 , hai hoặc nhiều nhóm thế R^3 , hoặc không có nhóm thế R^3 , và khi có nhiều nhóm thế R^3 , chúng có thể giống hoặc khác nhau. Mỗi nhóm R^4 và R^5 là nhóm thế hoặc nhóm bảo vệ, và chúng có thể giống hoặc khác nhau.

Các ví dụ về nhóm thế bao gồm halogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, haloalkyl, aryl, heteroaryl, arylalkyl, xycloalkyl, xycloalkenyl, xycloalkylalkyl, xyclylalkyl, hydroxyalkyl, alkoxyalkyl, aminoalkyl, heteroxyclylalkenyl, heteroxyclylalkyl, heteroarylalkyl, silyl, và silyloxyalkyl.

Nhóm bảo vệ là nhóm chức có khả năng bất hoạt nhóm chức có hoạt tính cao. Ví dụ về nhóm bảo vệ bao gồm các nhóm bảo vệ đã biết. Về nhóm bảo vệ, có thể tham khảo tài liệu (J. F. W. McOmie, "Protecting Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, London and New York, 1973) được đưa vào đây để tham khảo. Nhóm bảo vệ không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ về nhóm bảo vệ bao gồm nhóm tert-butyldimethylsilyl (TBDMS), nhóm bis(2-axetoxyetyloxy)methyl (ACE), nhóm triisopropylsilyloxymethyl (TOM), nhóm 1-(2-xyanoetoxy)ethyl (CEE), nhóm 2-xyanoetoxymethyl (CEM), nhóm tolylsulfonyltoxymethyl (TEM), và nhóm dimetoxytrityl (DMTr). Khi R^3 là OR^4 , nhóm bảo vệ không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ về nhóm bảo vệ bao gồm nhóm TBDMS, nhóm ACE, nhóm TOM, nhóm CEE, nhóm CEM, và nhóm TEM. Các ví dụ khác về nhóm bảo vệ bao gồm nhóm chứa

silyl được mô tả dưới đây.

Trong công thức (I), L^1 là mạch alkylen gồm n nguyên tử. (Các) nguyên tử hydro trên (các) nguyên tử cacbon trong mạch alkylen có thể được thế hoặc không được thế bằng nhóm OH, OR^a , NH_2 , NHR^a , NR^aR^b , SH, hoặc SR^a . Theo cách khác, L^1 có thể là mạch polyete thu được bằng cách thế ít nhất một nguyên tử cacbon trên mạch alkylen bằng nguyên tử oxy. Mạch polyete có thể là polyetylen glycol. Khi Y^1 là NH, O, hoặc S, nguyên tử liên kết với Y^1 trong L^1 là cacbon, nguyên tử liên kết với OR^1 trong L^1 là cacbon, và các nguyên tử oxy không liền kề với nhau. Nghĩa là khi Y^1 là O, nguyên tử oxy này và nguyên tử oxy trong L^1 không nằm cạnh nhau, và nguyên tử oxy trong OR^1 và nguyên tử oxy trong L^1 cũng không nằm cạnh nhau.

Trong công thức (I), L^2 mạch alkylen gồm m nguyên tử. (Các) nguyên tử hydro liên kết với nguyên tử cacbon trong mạch alkylen có thể được thế hoặc không được thế bằng nhóm OH, OR^c , NH_2 , NHR^c , NR^cR^d , SH, hoặc SR^c . Theo cách khác, L^2 có thể là mạch polyete thu được bằng cách thế ít nhất một nguyên tử cacbon trên mạch alkylen bằng nguyên tử oxy. Khi Y^2 là NH, O, hoặc S, nguyên tử liên kết với Y^2 trong L^2 là cacbon, nguyên tử liên kết với OR^2 trong L^2 là cacbon, và các nguyên tử oxy không liền kề với nhau. Nghĩa là khi Y^2 là O, nguyên tử oxy này và nguyên tử oxy trong L^2 không nằm cạnh nhau, và nguyên tử oxy trong OR^2 và nguyên tử oxy trong L^2 cũng không nằm cạnh nhau.

Giá trị n của L^1 và giá trị m của L^2 không bị giới hạn một cách cụ thể, và giới hạn dưới của mỗi giá trị này có thể bằng 0, chẳng hạn, và giới hạn trên của chúng cũng không bị giới hạn một cách cụ thể. Các giá trị n và m có thể được thiết lập một cách thích hợp tùy theo chiều dài của vùng liên kết (L_x). Chẳng hạn, theo quan điểm chi phí sản xuất, hiệu suất và các yếu tố tương tự, tốt hơn nếu mỗi giá trị n và m nằm trong khoảng từ 0 đến 30, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0 đến 20, và vẫn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0 đến 15. Các giá trị n và m có thể giống nhau ($n = m$) hoặc khác nhau. Tổng giá trị $n + m$ có thể nằm trong khoảng từ 0 đến 30, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0 đến 20, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0 đến 15.

Mỗi nhóm R^a , R^b , R^c , và R^d có thể độc lập là nhóm thế hoặc nhóm bảo vệ. Nhóm

thể và nhóm bảo vệ này là giống như các nhóm đã mô tả trên đây.

Trong công thức (I), mỗi nguyên tử hydro có thể độc lập được thế bằng nguyên tử halogen như Cl, Br, F, hoặc I.

Khi vùng liên kết (Lx) có công thức (I), các vùng (Xc) và (X) được liên kết với vùng liên kết (Lx) qua nhóm $-OR^1-$ hoặc $-OR^2-$. Nhóm R^1 và R^2 có thể có mặt hoặc không có mặt. Nếu nhóm R^1 và R^2 có mặt, mỗi nhóm R^1 và R^2 độc lập là gốc nucleotit hoặc cấu trúc có công thức (I). Khi R^1 và/hoặc R^2 là gốc nucleotit, vùng liên kết (Lx) gồm gốc không phải nucleotit có cấu trúc có công thức (I) ngoại trừ gốc nucleotit R^1 và/hoặc R^2 , và các gốc nucleotit. Khi R^1 và/hoặc R^2 là cấu trúc có công thức (I), cấu trúc của vùng liên kết (Lx) thỏa mãn điều kiện hai hoặc nhiều gốc không phải nucleotit có cấu trúc có công thức (I) được liên kết với nhau. Số lượng cấu trúc có công thức (I) có thể là 1, 2, 3, hoặc 4. Nếu vùng liên kết (Lx) bao gồm nhiều cấu trúc, các cấu trúc có công thức (I) có thể được liên kết với nhau một cách trực tiếp hoặc qua các gốc nucleotit. Mặt khác, nếu nhóm R^1 và R^2 không có mặt, vùng liên kết (Lx) chỉ gồm gốc không phải nucleotit có cấu trúc có công thức (I). Nếu vùng liên kết (Lx) có công thức (I), phần mô tả vùng liên kết (Lx) nêu trên cũng áp dụng cho vùng (Yc), vùng (Y), và vùng liên kết (Ly).

Tổ hợp của các vùng (Xc) và (X) với nhóm $-OR^1-$ và $-OR^2-$, và tổ hợp của các vùng (Yc) và (Y) với nhóm $-OR^1-$ và $-OR^2-$ không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể là điều kiện bất kỳ trong các điều kiện sau đây.

Điều kiện (1):

các vùng (Xc) và (X) được liên kết với cấu trúc có công thức (I) lần lượt qua nhóm $-OR^2-$ và $-OR^1-$; và

các vùng (Yc) và (Y) được liên kết với cấu trúc có công thức (I) lần lượt qua nhóm $-OR^1-$ và $-OR^2-$.

Điều kiện (2):

các vùng (Xc) và (X) được liên kết với cấu trúc có công thức (I) lần lượt qua nhóm $-OR^2-$ và $-OR^1-$; và

các vùng (Yc) và (Y) được liên kết với cấu trúc có công thức (I) lần lượt qua nhóm $-OR^2-$ và $-OR^1-$.

Điều kiện (3):

các vùng (Xc) và (X) được liên kết với cấu trúc có công thức (I) lần lượt qua nhóm $-OR^1-$ và $-OR^2-$; và

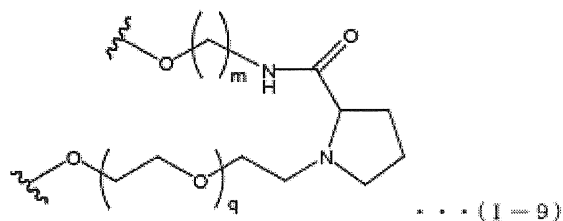
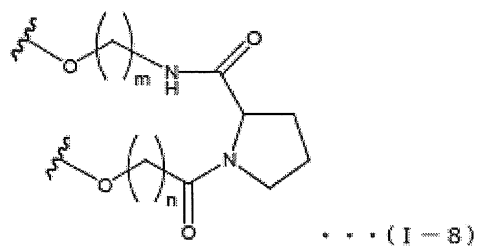
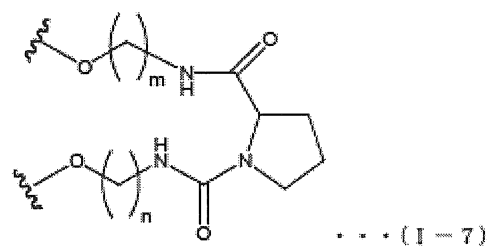
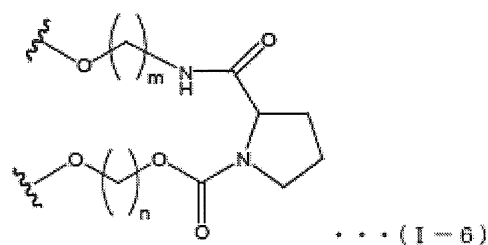
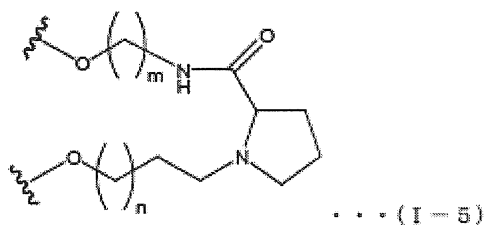
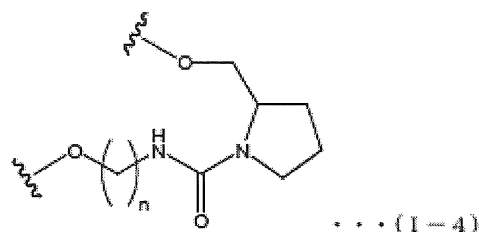
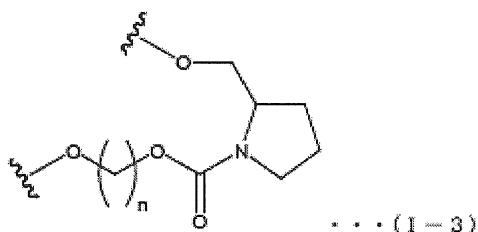
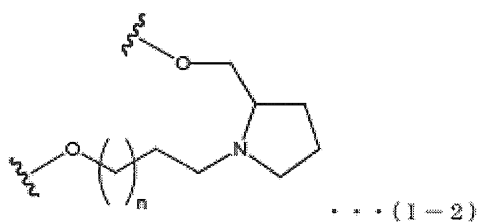
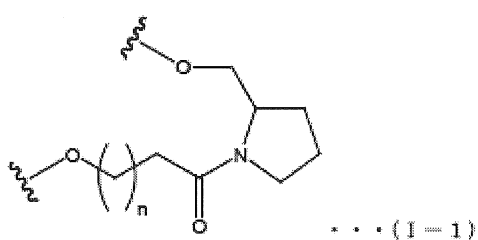
các vùng (Yc) và (Y) được liên kết với cấu trúc có công thức (I) lần lượt qua nhóm $-OR^1-$ và $-OR^2-$.

Điều kiện (4):

các vùng (Xc) và (X) được liên kết với cấu trúc có công thức (I) lần lượt qua nhóm $-OR^1-$ và $-OR^2-$; và

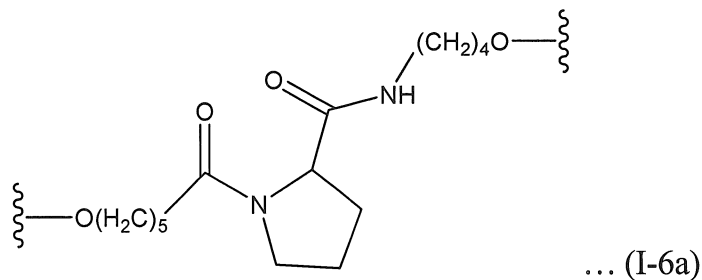
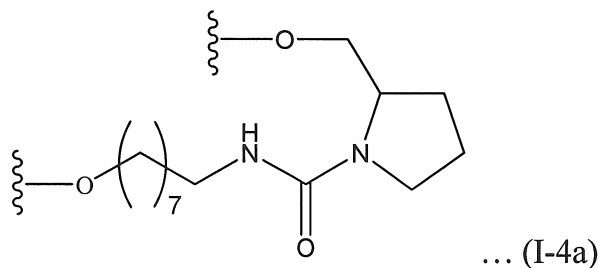
các vùng (Yc) và (Y) được liên kết với cấu trúc có công thức (I) lần lượt qua nhóm $-OR^2-$ và $-OR^1-$.

Các ví dụ về cấu trúc có công thức (I) bao gồm các cấu trúc có công thức từ (I-1) đến (I-9) sau đây. Trong các công thức sau đây, giá trị n và m là giống như trong công thức (I), q là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 10.



Trong các công thức từ (I-1) đến (I-9), các giá trị của n , m , và q không bị giới hạn một cách cụ thể, và có giá trị như đã mô tả trên đây. Các ví dụ cụ thể là như sau: trong công thức (I-1), $n = 8$; trong công thức (I-2), $n = 3$; trong công thức (I-3), $n = 4$ hoặc 8 ; trong công thức (I-4), $n = 7$ hoặc 8 ; trong công thức (I-5), $n = 3$ và $m = 4$; trong công thức (I-6), $n = 8$ và $m = 4$; trong công thức (I-7), $n = 8$ và $m = 4$; trong công thức (I-8), $n = 5$ và $m = 4$; và trong công thức (I-9), $q = 1$ và $m = 4$. Công thức (I-4a) sau đây

là ví dụ về công thức (I-4) ($n = 8$), và công thức (I-6a) sau đây là ví dụ về công thức (I-6) ($n = 5, m = 4$).



Theo sáng chế, thuật ngữ “alkyl” để chỉ nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Số lượng nguyên tử cacbon trong nhóm alkyl không bị giới hạn một cách cụ thể, và nằm trong khoảng từ 1 đến 30, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 6 hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 4. Các ví dụ về nhóm alkyl bao gồm: metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, n-pentyl, isopentyl, neopentyl, n-hexyl, isohexyl, n-heptyl, n-octyl, n-nonyl, và n-dexyl. Trong số chúng, được ưu tiên là nhóm metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, n-pentyl, isopentyl, neopentyl, n-hexyl, isohexyl, và nhóm tương tự.

Theo sáng chế, thuật ngữ “alkenyl” để chỉ alkenyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Các ví dụ về nhóm alkenyl bao gồm nhóm alkyl đã mô tả trên đây có một hoặc nhiều liên kết đôi. Số lượng nguyên tử cacbon trong nhóm alkenyl không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể bằng số lượng nguyên tử cacbon trong nhóm alkyl, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 8. Các ví dụ về nhóm alkenyl bao gồm vinyl, 1-propenyl, 2-propenyl, 1-butenyl, 2-butenyl, 3-butenyl, 1,3-butadienyl, và 3-metyl-2-butenyl.

Theo sáng chế, thuật ngữ “alkynyl” để chỉ nhóm alkynyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Ví dụ về nhóm alkynyl bao gồm nhóm alkyl đã mô tả trên đây có một hoặc nhiều liên kết ba. Số lượng nguyên tử cacbon trong nhóm alkynyl không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể bằng số lượng nguyên tử cacbon trong nhóm alkyl, tốt hơn là

nằm trong khoảng từ 2 đến 8. Các ví dụ về nhóm alkynyl bao gồm etynyl, propynyl, và butynyl. Nhóm alkynyl này có thể còn bao gồm một hoặc nhiều liên kết đôi.

Theo sáng chế, thuật ngữ “aryl” để chỉ nhóm hydrocacbon thơm đơn vòng và hydrocacbon thơm đa vòng. Ví dụ về nhóm hydrocacbon thơm đơn vòng là phenyl. Các ví dụ về hydrocacbon thơm đa vòng bao gồm 1-naphtyl, 2-naphtyl, 1-antryl, 2-antryl, 9-antryl, 1-phenantryl, 2-phenantryl, 3-phenantryl, 4-phenantryl, và 9-phenantryl. Trong số chúng, được ưu tiên là nhóm phenyl, naphtyl như 1-naphtyl và 2-naphtyl, và nhóm tương tự.

Theo sáng chế, thuật ngữ “heteroaryl” để chỉ nhóm dị vòng thơm đơn vòng và dị vòng thơm ngưng tụ. Các ví dụ về nhóm heteroaryl bao gồm furyl (ví dụ: 2-furyl, 3-furyl), thienyl (ví dụ: 2-thienyl, 3-thienyl), pyrolyl (ví dụ: 1-pyrolyl, 2-pyrolyl, 3-pyrolyl), imidazolyl (ví dụ: 1-imidazolyl, 2-imidazolyl, 4-imidazolyl), pyrazolyl (ví dụ: 1-pyrazolyl, 3-pyrazolyl, 4-pyrazolyl), triazolyl (ví dụ: 1,2,4-triazol-1-yl, 1,2,4-triazol-3-yl, 1,2,4-triazol-4-yl), tetrazolyl (ví dụ: 1-tetrazolyl, 2-tetrazolyl, 5-tetrazolyl), oxazolyl (ví dụ: 2-oxazolyl, 4-oxazolyl, 5-oxazolyl), isoxazolyl (ví dụ: 3-isoxazolyl, 4-isoxazolyl, 5-isoxazolyl), thiazolyl (ví dụ: 2-thiazolyl, 4-thiazolyl, 5-thiazolyl), thiadiazolyl, isothiazolyl (ví dụ: 3-isothiazolyl, 4-isothiazolyl, 5-isothiazolyl), pyridyl (ví dụ: 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl), pyridazinyl (ví dụ: 3-pyridazinyl, 4-pyridazinyl), pyrimidinyl (ví dụ: 2-pyrimidinyl, 4-pyrimidinyl, 5-pyrimidinyl), furazanyl (ví dụ: 3-furazanyl), pyrazinyl (ví dụ: 2-pyrazinyl), oxadiazolyl (ví dụ: 1,3,4-oxadiazol-2-yl), benzofuryl (ví dụ: 2-benzo[b]furyl, 3-benzo[b]furyl, 4-benzo[b]furyl, 5-benzo[b]furyl, 6-benzo[b]furyl, 7-benzo[b]furyl), benzothienyl (ví dụ: 2-benzo[b]thienyl, 3-benzo[b]thienyl, 4-benzo[b]thienyl, 5-benzo[b]thienyl, 6-benzo[b]thienyl, 7-benzo[b]thienyl), benzimidazolyl (ví dụ: 1-benzimidazolyl, 2-benzimidazolyl, 4-benzimidazolyl, 5-benzimidazolyl), dibenzofuryl, benzoxazolyl, benzothiazolyl, quinoxalyl (ví dụ: 2-quinoxalyl, 5-quinoxalyl, 6-quinoxalyl), xinolyl (ví dụ: 3-xinolyl, 4-xinolyl, 5-xinnolyl, 6-xinnolyl, 7-xinnolyl, 8-xinnolyl), quinazolyl (ví dụ: 2-quinazolyl, 4-quinazolyl, 5-quinazolyl, 6-quinazolyl, 7-quinazolyl, 8-quinazolyl), quinolyl (ví dụ: 2-quinolyl, 3-quinolyl, 4-quinolyl, 5-quinolyl, 6-quinolyl,

7-quinolyl, 8-quinolyl), phtalazinyl (ví dụ: 1-phtalazinyl, 5-phtalazinyl, 6-phtalazinyl), isoquinolyl (ví dụ: 1-isoquinolyl, 3-isoquinolyl, 4-isoquinolyl, 5-isoquinolyl, 6-isoquinolyl, 7-isoquinolyl, 8-isoquinolyl), puryl, pteridiny (ví dụ: 2-pteridiny, 4-pteridiny, 6-pteridiny, 7-pteridiny), carbazolyl, phenantridiny, acridiny (ví dụ: 1-acridiny, 2-acridiny, 3-acridiny, 4-acridiny, 9-acridiny), indolyl (ví dụ: 1-indolyl, 2-indolyl, 3-indolyl, 4-indolyl, 5-indolyl, 6-indolyl, 7-indolyl), isoindolyl, phenazinyl (ví dụ: 1-phenazinyl, 2-phenazinyl), và phenothiazinyl (ví dụ: 1-phenothiazinyl, 2-phenothiazinyl, 3-phenothiazinyl, 4-phenothiazinyl).

Theo sáng chế, thuật ngữ “xycloalkyl” để chỉ nhóm hydrocacbon vòng no chẳng hạn, và số lượng nguyên tử cacbon trong nhóm xycloalkyl nằm trong khoảng từ 3 đến 15. Các ví dụ về nhóm xycloalkyl bao gồm xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl, xycloheptyl, xyclooctyl, nhóm hydrocacbon vòng có liên kết cầu, và nhóm hydrocacbon vòng xoắn. Trong số chúng, được ưu tiên là nhóm xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl, hydrocacbon vòng có liên kết cầu, và nhóm tương tự.

Theo sáng chế, ví dụ về “nhóm hydrocacbon dạng vòng có liên kết cầu” bao gồm bixyclo[2.1.0]pentyl, bixyclo[2.2.1]heptyl, bixyclo[2.2.2]octyl, và bixyclo[3.2.1]octyl, trixyclo[2.2.1.0]heptyl, bixyclo[3.3.1]nonan, 1-adamantyl, và 2-adamantyl.

Theo sáng chế, ví dụ về “nhóm hydrocacbon vòng xoắn” là spiro[3.4]octyl.

Theo sáng chế, thuật ngữ “xycloalkenyl” để chỉ nhóm hydrocacbon vòng béo không no, và số lượng nguyên tử cacbon trong nhóm xycloalkenyl nằm trong khoảng từ 3 đến 7. Các ví dụ về nhóm xycloalkenyl bao gồm xyclopropenyl, xyclobutenyl, xyclopentenyl, xyclohexenyl, và xycloheptenyl. Trong số chúng, được ưu tiên là nhóm xyclopropenyl, xyclobutenyl, xyclopentenyl, xyclohexenyl, và nhóm tương tự. Thuật ngữ “xycloalkenyl” còn để chỉ nhóm hydrocacbon vòng có liên kết cầu và hydrocacbon vòng xoắn có liên kết chưa no trong vòng của chúng.

Theo sáng chế, ví dụ về nhóm “arylalkyl” bao gồm benzyl, 2-phenetyl, và

naphthalenylmetyl. Các ví dụ về nhóm “xycloalkylalkyl” và “xyclylalkyl” bao gồm xyclohexylmetyl và adamantylmetyl. Các ví dụ về nhóm “hydroxyalkyl” bao gồm hydroxymetyl và 2-hydroxymetyl.

Theo sáng chế, thuật ngữ “alkoxy” để chỉ nhóm bao gồm nhóm bất kỳ trong số các nhóm alkyl đã mô tả trên đây và nguyên tử oxy (nhóm alkyl-O-), và ví dụ về các nhóm alkoxy bao gồm metoxy, etoxy, n-propoxy, isopropoxy, và n-butoxy. Ví dụ về nhóm “alkoxyalkyl” là metoxymetyl. Ví dụ về nhóm “aminoalkyl” là 2-aminoetyl.

Theo sáng chế, các ví dụ về nhóm “heteroxyclyl” bao gồm 1-pyrolinyl, 2-pyrolinyl, 3-pyrolinyl, 1-pyrolidinyl, 2-pyrolidinyl, 3-pyrolidinyl, pyrolidinon, 1-imidazoliny, 2-imidazoliny, 4-imidazoliny, 1-imidazolidinyl, 2-imidazolidinyl, 4-imidazolidinyl, imidazolidinon, 1-pyrazolinyl, 3-pyrazolinyl, 4-pyrazolinyl, 1-pyrazolidinyl, 3-pyrazolidinyl, 4-pyrazolidinyl, piperidinon, piperidino, 2-piperidinyl, 3-piperidinyl, 4-piperidinyl, 1-piperazinyl, 2-piperazinyl, piperazinon, 2-morpholinyl, 3-morpholinyl, morpholino, tetrahydropyranyl, và tetrahydrofuranyl.

Theo sáng chế, ví dụ về nhóm “heteroxyclylalkyl” bao gồm piperidinylmetyl và piperazinylmetyl. Ví dụ về nhóm “heteroxyclylalkenyl” là 2-piperidinyl etenyl. Các ví dụ về nhóm “heteroarylalkyl” bao gồm pyridylmetyl và quinolin-3-ylmetyl.

Theo sáng chế, thuật ngữ “silyl” để chỉ các nhóm có công thức R_3Si- , trong đó R độc lập có thể được chọn từ các nhóm alkyl, aryl, và xycloalkyl đã mô tả trên đây. Các ví dụ về nhóm silyl bao gồm nhóm trimetylsilyl và nhóm tert-butyldimetylsilyl. Ví dụ về nhóm “silyloxy” là nhóm trimetylsilyloxy. Ví dụ về nhóm “silyloxyalkyl” là nhóm trimetylsilyloxymetyl.

Theo sáng chế, các ví dụ về nhóm “alkylen” bao gồm metylen, etylen, và propylen.

Theo sáng chế, các nhóm khác nhau đã mô tả trên đây có thể được thế. Các ví dụ về nhóm thế bao gồm nhóm hydroxy, carboxy, halogen, alkyl halogenua (ví dụ: CF_3 , CH_2CF_3 , CH_2CCl_3), nitro, nitroso, xyano, alkyl (ví dụ: metyl, etyl, isopropyl, tert-butyl), alkenyl (ví dụ: vinyl), alkynyl (ví dụ: etynyl), xycloalkyl (ví dụ: xyclopropyl,

adamantyl), xycloalkylalkyl (ví dụ: xyclohexylmetyl, adamantylmetyl), xycloalkenyl (ví dụ: xyclopropenyl), aryl (ví dụ: phenyl, naphtyl), arylalkyl (ví dụ: benzyl, phenetyl), heteroaryl (ví dụ: pyridyl, furyl), heteroarylalkyl (ví dụ: pyridylmetyl), heteroxyclyl (ví dụ: piperidyl), heteroxyclylalkyl (ví dụ: morpholylmetyl), alkoxy (ví dụ: metoxy, etoxy, propoxy, butoxy), alkoxy được halogen hóa (ví dụ: OCF_3), alkenyloxy (ví dụ: vinyloxy, allyloxy), aryloxy (ví dụ: phenyloxy), alkyloxyacacbonyl (ví dụ: metoxyacacbonyl, etoxyacacbonyl, tert-butoxyacacbonyl), arylalkyloxy (ví dụ: benzyloxy), amino [alkylamino (ví dụ: metylamino, etylamino, dimetylamino), acylamino (ví dụ: axetylamino, benzoylamino), arylalkylamino (ví dụ: benzylamino, tritylamino), hydroxyamino], alkylaminoalkyl (ví dụ: dietylaminoalkyl), sulfamoyl, và oxo.

4. Phương pháp tổng hợp phân tử ssNc theo sáng chế

Phương pháp tổng hợp phân tử ssNc theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các ví dụ về phương pháp tổng hợp bao gồm phương pháp tổng hợp theo kỹ thuật di truyền và phương pháp tổng hợp hóa học. Các ví dụ về kỹ thuật di truyền bao gồm: phương pháp tổng hợp bằng cách sử dụng quá trình phiên mã *in vitro*; các phương pháp sử dụng vector; và các phương pháp được tiến hành bằng cách sử dụng kỹ thuật PCR. Vector không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ về vector bao gồm vector không có nguồn gốc virus như plasmit, và vector virus. Các phương pháp tổng hợp hóa học không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ bao gồm phương pháp phosphoramidit và phương pháp H-phosphonat. Phương pháp tổng hợp hóa học có thể được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị tổng hợp axit nucleic tự động có bán trên thị trường. Trong phương pháp tổng hợp hóa học, thường sử dụng amidit. Amidit không bị giới hạn một cách cụ thể. Ví dụ về các amidit có bán trên thị trường bao gồm ARN phosphoramidit (2'-O-TBDMSi, tên thương mại, Samchully Pharm. Co., Ltd.), ACE amidit, TOM amidit, CEE amidit, CEM amidit, và TEM amidit.

5. Chế phẩm

Chế phẩm ức chế theo sáng chế, như đã mô tả trên đây, là chế phẩm để ức chế sự

biểu hiện của gen đích, chứa phân tử ssNc theo sáng chế. Chế phẩm theo sáng chế khác biệt ở chỗ, chế phẩm này chứa phân tử ssNc theo sáng chế, và các cấu hình khác của phân tử ssNc theo sáng chế không bị giới hạn. Chế phẩm ức chế theo sáng chế cũng có thể được gọi là chất phản ứng ức chế.

Bằng cách cho đối tượng sử dụng chế phẩm trong đó gen đích có mặt, có thể ức chế sự biểu hiện của gen đích.

Hơn nữa, như đã mô tả trên đây, chế phẩm được theo sáng chế chứa phân tử ssNc theo sáng chế. Chế phẩm được theo sáng chế khác biệt ở chỗ nó chứa phân tử ssNc theo sáng chế, và các cấu hình khác của phân tử ssNc theo sáng chế không bị giới hạn. Chế phẩm được theo sáng chế cũng có thể được gọi là dược phẩm.

Bằng cách cho bệnh nhân bị bệnh do gen gây ra sử dụng dược phẩm, có thể ức chế sự biểu hiện của gen, nhờ đó có thể điều trị bệnh. Theo sáng chế, thuật ngữ “điều trị” bao gồm: sự ngăn ngừa bệnh; cải thiện tình trạng bệnh; và cải thiện mức độ tiên lượng bệnh và thuật ngữ này có thể có nghĩa bất kỳ trong số các thuật ngữ nêu trên.

Bệnh cần được điều trị không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ về bệnh bao gồm bệnh do sự biểu hiện của gen gây ra. Tùy thuộc vào loại bệnh, gen gây bệnh có thể được thiết lập là gen đích, và ngoài ra, tùy theo gen đích, trình tự ức chế sự biểu hiện có thể được thiết lập một cách thích hợp.

Ví dụ cụ thể là như sau. Bằng cách thiết lập gen TGF- β 1 làm gen đích và kết hợp trình tự ức chế sự biểu hiện của gen này vào phân tử ssNc, phân tử ssNc có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm, cụ thể là tổn thương phổi cấp tính và các bệnh tương tự.

Phương pháp sử dụng chế phẩm và dược phẩm ức chế theo sáng chế (sau đây, cả hai dạng này sẽ được gọi đơn giản là “chế phẩm”) không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ về phương pháp sử dụng là sử dụng phân tử ssNc cho đối tượng có gen đích.

Ví dụ về đối tượng có thể được cho sử dụng phân tử ssNc theo sáng chế bao gồm tế bào, mô, và cơ quan. Ví dụ về đối tượng còn bao gồm người và động vật không phải người như động vật có vú không phải người, nghĩa là động vật có vú ngoại trừ

người. Việc sử dụng này có thể được thực hiện *in vivo* hoặc *in vitro*. Các tế bào không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ về tế bào bao gồm: các loại tế bào được nuôi cấy khác nhau như tế bào HeLa, tế bào 293, tế bào NIH3T3, và tế bào COS; tế bào gốc như tế bào ES và tế bào gốc tạo máu; và tế bào được phân lập từ cơ thể sống, như tế bào được nuôi cấy sơ cấp.

Phương pháp sử dụng không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể được xác định tùy theo đối tượng. Khi đối tượng là tế bào được nuôi cấy, phương pháp sử dụng có thể là phương pháp sử dụng chất phản ứng chuyển nhiễm, phương pháp biến nạp điện hoặc các phương pháp tương tự.

Mỗi chế phẩm theo sáng chế có thể chỉ chứa phân tử ssNc theo sáng chế hoặc có thể còn chứa (các) chất phụ trợ, ngoài phân tử ssNc. Chất phụ trợ không bị giới hạn một cách cụ thể, và tốt hơn nếu là chất phụ trợ được dụng. Loại chất phụ trợ không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể được chọn một cách thích hợp tùy theo loại đối tượng.

Trong chế phẩm theo sáng chế, phân tử ssNc có thể tạo phức với chất phụ trợ. Chất phụ trợ này có thể còn được gọi là chất tạo phức. Sự tạo ra phức chất cho phép phân tử ssNc được giải phóng một cách hiệu quả. Liên kết giữa phân tử ssNc và chất tạo phức không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ của chúng bao gồm liên kết không cộng hóa trị. Phức chất có thể là phức chất thể vùi.

Chất tạo phức không bị giới hạn một cách cụ thể, và các ví dụ bao gồm polyme, cyclodextrin, và adamantin. Các ví dụ về cyclodextrin bao gồm copolyme cyclodextrin mạch thẳng và copolyme cyclodextrin mạch thẳng được oxy hóa.

Các ví dụ khác về chất phụ trợ bao gồm chất mang, chất liên kết để liên kết với tế bào đích, chất ngưng tụ, chất kích thích dung hợp, và tá dược.

Tốt hơn, nếu chất mang là polyme, tốt hơn nữa nếu là polyme sinh học. Tốt hơn, nếu chất mang có khả năng phân hủy sinh học. Các ví dụ về chất mang bao gồm: protein như albumin huyết thanh của người (hSA), lipoprotein tỷ trọng thấp (low-density lipoprotein: LDL), và globulin; hydrat cacbon như dextran, pululan, chitin, chitosan, inulin, cyclodextrin, và axit hyaluronic; và lipid. Có thể sử dụng polyme tổng

hợp như poly axit amin tổng hợp làm chất mang. Ví dụ về poly axit amin bao gồm polylysine (PLL), poly axit L-aspartic, poly axit L-glutamic, copolyme styren-anhydrit maleic, copolyme poly(L-lactit-co-glycol), copolyme divinyl ete-maleic anhydrit, copolyme N-(2-hydroxypropyl)metacrylamit (HMPA), polyetylen glycol (PEG), rượu polyvinyl (PVA), polyuretan, poly(axit 2-etylacrylic), polyme N-isopropylacrylamit, và polyphosphazin.

Các ví dụ về chất liên kết bao gồm hormon kích thích tuyến giáp, hormon kích thích tế bào sắc tố, lectin, glycoprotein, chất hoạt động bề mặt protein A, mucin hydrat cacbon, lactoza đa hóa trị, galactoza đa hóa trị, N-acetyl-galactosamin, N-acetyl-gulucosamin, mannoza đa hóa trị, fucosa đa hóa trị, polyaxit amin được glycol hóa, galactoza đa hóa trị, transferrin, bisphosphonat, poly axit glutamic, poly axit aspartic, lipid, cholesterol, steroid, axit mật, folat, vitamin B12, biotin, Neproxin, peptit RGD, và phân tử bắt chước peptit RGD.

Các ví dụ về chất kích thích dung hợp và chất ngưng tụ bao gồm chuỗi polyamino như polyetylenimin (PEI). PEI có thể có mạch thẳng hoặc mạch nhánh, và cũng có thể có nguồn gốc tổng hợp hoặc tự nhiên. PEI có thể được thế bằng alkyl hoặc lipid. Có thể sử dụng polyhistidin, polyimidazol, polypyridin, polypropylenimin, melitin, polyaxetal (ví dụ, polyaxetal cation hoặc chất tương tự), hoặc chất tương tự làm chất kích thích dung hợp. Chất kích thích dung hợp có thể có cấu trúc xoắn α . Chất kích thích dung hợp có thể là chất phá vỡ màng như melitin.

Đối với chế phẩm theo sáng chế, sự tạo ra phức chất và các quá trình tương tự được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 6509323, Công bố đơn đăng ký sáng chế Mỹ số US 2003/0008818 và Công bố đơn quốc tế WO 2004 080406 (đơn quốc tế số PCT/US04/07070).

Các ví dụ khác về chất phụ trợ là phân tử lưỡng tính. Phân tử lưỡng tính này là phân tử có cả vùng kỵ nước và vùng ưa nước. Tốt hơn, nếu phân tử lưỡng tính là polyme. Polyme này có thể có cấu trúc bậc hai, tốt hơn là cấu trúc bậc hai lặp lại. Cụ thể, được ưu tiên là polypeptit, và được ưu tiên hơn nữa là polypeptit xoắn α và các phân tử tương tự.

Polyme lưỡng tính có thể là polyme có hai hoặc nhiều cấu trúc dưới phân tử lưỡng tính. Ví dụ về cấu trúc dưới phân tử bao gồm các cấu trúc dưới phân tử có cấu trúc vòng có ít nhất một nhóm ưa nước và một nhóm kỵ nước. Cấu trúc dưới phân tử có thể chứa steroid như axit cholic, cấu trúc thơm, và cấu trúc tương tự. Polyme có thể chứa cả cấu trúc dưới phân tử có cấu trúc vòng, chẳng hạn như cấu trúc dưới phân tử thơm, và axit amin.

6. Phương pháp ức chế

Sự biểu hiện của gen đích có thể được ức chế khi phân tử ssNc theo sáng chế được sử dụng. Phương pháp có tác dụng ức chế này khác biệt ở chỗ, phân tử ssNc theo sáng chế được sử dụng, và các bước khác và điều kiện tiến hành không bị giới hạn.

Cơ chế mà trong đó sự biểu hiện của gen bị ức chế là không bị giới hạn một cách cụ thể, và ví dụ về cơ chế này bao gồm ức chế sự biểu hiện bằng cách can thiệp ARN hoặc hiện tượng giống như sự can thiệp ARN. Phương pháp ức chế theo sáng chế là phương pháp tạo ra sự can thiệp ARN để ức chế sự biểu hiện của gen đích, và còn được gọi là phương pháp ức chế, khác biệt ở chỗ, phương pháp này sử dụng phân tử ssNc theo sáng chế.

Phương pháp ức chế theo sáng chế bao gồm bước cho đối tượng sử dụng phân tử ssNc mà trong đó gen đích có mặt. Nhờ bước này, phân tử ssNc sẽ được cho tiếp xúc với đối tượng sử dụng phân tử ssNc. Theo phương pháp *in vitro* của sáng chế, phân tử ssNc được sử dụng cho tế bào, mô, và cơ quan. Các ví dụ về đối tượng còn bao gồm người và động vật không phải người như động vật có vú không phải người, nghĩa là động vật có vú ngoại trừ người. Việc sử dụng có thể được thực hiện *in vivo* hoặc *in vitro*.

Trong phương pháp ức chế theo sáng chế, phân tử ssNc có thể được sử dụng một mình, hoặc chế phẩm theo sáng chế chứa phân tử ssNc có thể được sử dụng. Phương pháp sử dụng không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể được chọn một cách thích hợp tùy theo loại đối tượng.

7. Phương pháp điều trị

Bệnh có thể được điều trị bằng phương pháp bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng phân tử ssNc theo sáng chế, và phân tử ssNc này bao gồm trình tự ức chế sự biểu hiện là trình tự ức chế sự biểu hiện của gen gây bệnh. Phương pháp điều trị theo sáng chế khác biệt ở chỗ trong đó phân tử ssNc theo sáng chế được sử dụng, và các bước tiến hành khác và điều kiện không bị giới hạn.

Phần mô tả về phương pháp ức chế theo sáng chế cũng áp dụng cho phần mô tả về phương pháp điều trị theo sáng chế. Phương pháp sử dụng không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể là sử dụng qua đường miệng hoặc sử dụng ngoài đường tiêu hóa.

8. Sử dụng phân tử ssNc

Phân tử ssNc theo sáng chế được sử dụng để ức chế sự biểu hiện của gen đích. Ngoài ra, phân tử ssNc theo sáng chế được sử dụng để tạo ra sự can thiệp ARN.

Phân tử ARN theo sáng chế là phân tử ARN để sử dụng trong điều trị bệnh. Phân tử ARN là phân tử ssNc theo sáng chế, và phân tử ssNc bao gồm trình tự ức chế sự biểu hiện là trình tự ức chế sự biểu hiện của gen gây bệnh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Trong phần sau đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết ở dạng các ví dụ. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng sáng chế sẽ không bị giới hạn ở bất kỳ một phương án ví dụ nào dưới đây.

Ví dụ A1: Tổng hợp ARN

Phân tử ARN sợi đơn (NK-0016) được thể hiện dưới đây được tổng hợp để làm phân tử ARN (Ex) trong ví dụ này. NK-0016 bao gồm trình tự ức chế sự biểu hiện 19 đơn phân (SEQ ID NO: 1) để ức chế sự biểu hiện của gen GAPDH. Trong trình tự của NK-0016, vùng ở giữa vùng (Xc) và vùng (X) là vùng liên kết (Lx), và vùng ở giữa vùng (Y) và vùng (Yc) là vùng liên kết (Ly) (ở đây hai vùng liên kết là như nhau). Trong trình tự này, vùng 5' (Xc) và vùng 3' (Yc) được thể hiện bằng các chữ thường.

Trình tự ức chế sự biểu hiện đối với gen GAPDH (SEQ ID NO: 1)

5'-GUUGUCAUACUUCUCAUGG-3'

Ex: NK-0016 (SEQ ID NO: 2)

5'- caugagaaguaugacaacagccCCACACC**GGCUGUUGUCAVACUUCUCAUGGUUCUUCG**gaa -3'

Xc X Y Yc

Để làm ARN trong ví dụ so sánh, ARN sợi kép (NI-0011) được thể hiện dưới đây được tổng hợp để sử dụng làm đối chứng dương can thiệp ARN (Pc). NI-0011 có đoạn nhô ra ngoài hai bazơ ở đầu 3' của mỗi sợi đơn, và sợi đơn trong SEQ ID NO: 4 có trình tự ức chế sự biểu hiện 19 đơn phân nêu trên tương tự như NK-0016.

Pc: NI-0011

5' - CCAUGAGAAGUAUGACAACAG -3' (SEQ ID NO: 3)
3' - UUGGUACUCUUCAUACUGUUG -5' (SEQ ID NO: 4)

ARN được tổng hợp dựa trên phương pháp phosphoramidit sử dụng thiết bị tổng hợp axit nucleic (tên thương mại: ABI Expedite (nhãn hiệu đã đăng ký) 8909 Nucleic Acid Synthesis System, Applied Biosystems). Trong quá trình tổng hợp, ARN Phosphoramidit (2'-O-TBDMSi, tên thương mại, Samchully Pharm. Co., Ltd.) được sử dụng làm ARN amidit. Amidit được khử bảo vệ bằng phương pháp thông thường. ARN tổng hợp được tinh chế bằng phương pháp HPLC. Mỗi ARN đã tinh chế được làm đông khô nhanh. Trong các ví dụ sau, quá trình tổng hợp ARN được tiến hành theo phương pháp tương tự như ví dụ này, trừ khi được quy định theo cách khác.

ARN đã đông khô nhanh được hòa tan trong nước cất dùng để tiêm (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., sau đây là như nhau) đến nồng độ mong muốn.

Ví dụ A2: Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen GAPDH trong tế bào HCT116

Sự ức chế mức độ biểu hiện của gen GAPDH *in vitro* được thử nghiệm bằng cách sử dụng ARN sợi đơn theo sáng chế.

(1) Vật liệu và phương pháp

Phân tử ARN sợi đơn (NK-0016) trong ví dụ A1 được sử dụng làm phân tử ARN (Ex) trong ví dụ này.

Ex: NK-0016 (SEQ ID NO: 2)

5' - caugagaag^{Xc}augacaacagccCCACACC^XGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCG^Ygaa^{Yc} - 3'

Dung dịch ARN được điều chế bằng cách hòa tan ARN trong nước cất dùng để tiêm để đạt được nồng độ mong muốn. Tế bào HCT116 (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) được sử dụng làm tế bào. Môi trường McCoy's 5A chứa FBS 10% (Invitrogen) được sử dụng làm môi trường. Điều kiện nuôi cấy được thiết lập là 37°C và CO₂ 5%.

Trước tiên, các tế bào HCT116 được nuôi cấy trong môi trường, và được phân tán vào đĩa có 24 lỗ sao cho mỗi lỗ chứa 400µl môi trường để tạo đạt được mật độ tế bào là 2×10^4 tế bào/lỗ. Các tế bào trong lỗ được nuôi cấy trong 24 giờ nữa. Sau đó, các tế bào được chuyển nhiễm bằng ARN bằng cách sử dụng chất phản ứng chuyển nhiễm Lipofectamin 2000 (tên thương mại, Invitrogen) theo quy trình được cung cấp kèm theo. Cụ thể, quá trình chuyển nhiễm được tiến hành bằng cách thiết lập thành phần trong một lỗ như sau. Nồng độ cuối của ARN trong lỗ được thiết lập là 5 nmol/l, 10 nmol/l, 20 nmol/l, hoặc 40 nmol/l.

Bảng 1. Thành phần trong một lô (μl)

Môi trường	400
(A) Lipofectamin 2000	1,5
(B) Opti-MEM (Invitrogen)	98
<u>(C) dung dịch ARN</u>	<u>0,5</u>
Tổng số	500

Sau khi chuyển nhiễm, tế bào trong lỗ được nuôi cấy trong 48 giờ, và sau đó, ARN được thu gom bằng cách sử dụng kit RNeasy Mini (tên thương mại, Qiagen) theo quy trình được cung cấp kèm theo. Tiếp đó, ADN bổ trợ được tổng hợp từ ARN bằng cách sử dụng enzym transcriptaza ngược (tên thương mại: SuperScript III, Invitrogen) theo quy trình được cung cấp kèm theo. Sau đó, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN bổ trợ tổng hợp được làm khuôn, và mức độ biểu hiện của gen GAPDH và gen β -actin làm chất chuẩn nội được xác định. Mức độ biểu hiện của gen GAPDH được hiệu

chỉnh theo mức độ biểu hiện của gen β -actin.

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng chất phản ứng LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (tên thương mại, Roche) và thiết bị Light Cycler DX400 (tên thương mại, Roche) (sau đây là như nhau). Gen GAPDH và gen β -actin được khuếch đại bằng cách sử dụng lần lượt các cặp đoạn mồi sau.

Cặp đoạn mồi đối với gen GAPDH

5'-GGAGAAGGCTGGGGCTCATTTGC-3' (SEQ ID NO: 9)

5'-TGGCCAGGGGTGCTAAGCAGTTG-3' (SEQ ID NO: 10)

Cặp đoạn mồi đối với gen β -actin

5'-GCCACGGCTGCTTCCAGCTCCTC-3' (SEQ ID NO: 11)

5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGTCAC-3' (SEQ ID NO: 12)

Để làm đối chứng 1, tế bào chỉ được thêm 100 μ l (B), mức độ biểu hiện của gen cũng được xác định (-). Tiếp theo, để làm đối chứng 2, tế bào được tiến hành theo quy trình chuyển nhiễm tương tự nhưng dung dịch ARN không được thêm vào và (B) và 1,5 μ l (A) được thêm vào sao cho tổng lượng (A) và (B) sẽ là 100 μ l, mức độ biểu hiện của gen cũng được xác định (đối chứng giả).

Sau đó, mức độ biểu hiện của gen GAPDH được hiệu chỉnh trong đối chứng (-) được thiết lập là 1, và mức độ biểu hiện trong tế bào được chuyển nhiễm ARN tại mỗi nồng độ được thể hiện là giá trị tương đối so với mức độ biểu hiện trong đối chứng (-).

(2) Kết quả

Kết quả của thử nghiệm được thể hiện trên Fig.4. Fig.4 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH. Như có thể thấy trên Fig.4, khi NK-0016 được sử dụng, mức độ biểu hiện của gen là nhỏ hơn so với mức độ biểu hiện của gen trong mẫu đối chứng (-) không được bổ sung ARN. Do đó, đã phát hiện được rằng NK-0016 ức chế sự biểu hiện của gen GAPDH. Tương tự, có thể thấy trên Fig.4, đã phát hiện được rằng NK-0016 có tác dụng ức chế theo cách phụ thuộc liều.

Ví dụ A3: Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen GAPDH trong tế bào HCT116

Sự ức chế mức độ biểu hiện của gen GAPDH *in vitro* được thử nghiệm bằng cách sử dụng ARN sợi đơn theo sáng chế.

(1) Vật liệu và phương pháp

Phân tử ARN sợi đơn (NK-0016) trong ví dụ A1 được sử dụng làm phân tử ARN (Ex) trong ví dụ này. Để làm ARN trong ví dụ so sánh, phân tử ARN sợi kép (NI-0011) được sử dụng làm đối chứng dương can thiệp ARN (Pc). Dung dịch ARN được điều chế bằng cách hòa tan mỗi loại ARN trong nước cất dùng để tiêm để đạt được nồng độ là 40 $\mu\text{mol/l}$.

Mức độ biểu hiện của gen GAPDH trong tế bào HCT116 được thử nghiệm theo cách tương tự như trong ví dụ A2, ngoại trừ việc sử dụng dung dịch ARN nêu trên. Nồng độ ARN tại thời điểm chuyển nhiễm được thiết lập là 40 nmol/l.

(2) Kết quả

Kết quả được thể hiện trên Fig.5. Fig.5 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH, và trục tung thể hiện mức độ biểu hiện của gen tương đối. Như có thể thấy trên Fig.5, NK-0016 trong ví dụ có hoạt tính ức chế rất mạnh so với NI-0011 trong ví dụ so sánh.

Ví dụ A4: Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen GAPDH trong tế bào A549 và 293

Sự ức chế mức độ biểu hiện của gen GAPDH *in vitro* được thử nghiệm bằng cách sử dụng ARN sợi đơn theo sáng chế.

(1) Vật liệu và phương pháp

Phân tử NK-0016 trong ví dụ A1 và Ex-ARN sợi đơn (PK-0004) được thể hiện dưới đây được sử dụng làm ARN (Ex) trong ví dụ này. Trong phân tử PK-0004, vùng liên kết (Lx) và vùng liên kết (Ly) được tạo ra bằng cách liên kết hợp chất có công thức 10 (L-prolin-diamit-amidit) trong sơ đồ 3 của ví dụ B lần lượt giữa vùng Xc và X và giữa vùng Yc và Y. Công thức hóa học của cả hai vùng liên kết được thể hiện dưới đây. Trình tự của NK-0016 và PK-0004 là giống nhau ngoại trừ vùng liên kết (Lx) giữa vùng Xc và X và vùng liên kết (Ly) giữa vùng Yc và Y.

Ex: NK-0016 (SEQ ID NO: 2)

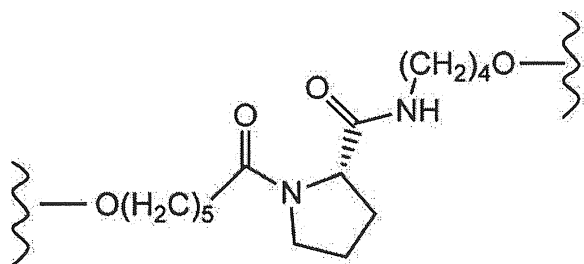
5'- caugagaaguaugacaacagccCCACACC**GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCG**gaa -3'

Xc X Y Yc

Ex:PK-0004 (SEQ ID NO: 13)

5'- caugagaaguaugacaacagcc-Lx-GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC-Ly-gaa-3'

Xc Z Yc



Dung dịch ARN được điều chế bằng cách hòa tan mỗi loại ARN trong nước cất dùng để tiêm để đạt được nồng độ là 20μmol/l. Tế bào A549 và 293 (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) được sử dụng làm tế bào. DMEM chứa FBS 10% (Invitrogen) được sử dụng làm môi trường cho loại tế bào thứ nhất. MEM chứa FBS 10% (Invitrogen) được sử dụng làm môi trường cho loại tế bào thứ hai. Điều kiện nuôi cấy được thiết lập là 37°C và CO₂ 5%.

Trước tiên, mỗi loại tế bào được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy, và được phân tán vào đĩa có 24 lỗ sao cho mỗi lỗ chứa 400μl môi trường để đạt được mật độ là 5×10^4 tế bào/lỗ. Tế bào trong lỗ được nuôi cấy trong 24 giờ nữa. Sau đó, tế bào được chuyển nhiễm bằng ARN bằng cách sử dụng chất phản ứng chuyển nhiễm Lipofectamin 2000 (tên thương mại, Invitrogen) theo quy trình được cung cấp kèm theo. Cụ thể, quá trình chuyển nhiễm được tiến hành bằng cách thiết lập thành phần trong một lỗ là như sau đối với tế bào A549 và tế bào 293. Trong thành phần sau đây, (B) là Opti-MEM (tên thương mại, Invitrogen), và (C) là dung dịch ARN nồng độ 20μmol/l, và các thành phần được bổ sung sao cho tổng lượng (B) và (C) là 98,5μl hoặc 99μl. Nồng độ cuối của ARN trong lỗ được thiết lập là 1nmol/l, 3nmol/l, hoặc

10nmol/l.

Bảng 2

(Thành phần trong một lỗ:µl)

	<u>tế bào A549 tế bào 293</u>	
Môi trường	400	400
(A) Lipofectamin 2000	1,5	1
<u>(B) + (C)</u>	<u>98,5</u>	<u>99</u>
Tổng số	500	500

Sau khi chuyển nhiễm, tế bào được nuôi cấy trong 48 giờ. Sau đó, việc thu gom ARN, tổng hợp ADN bổ trợ, và PCR được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A2, và mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH được xác định.

(2) Kết quả

Kết quả được thể hiện trên Fig.6 và Fig.7. Fig.6 thể hiện kết quả thu được đối với tế bào A549, và Fig.7 thể hiện kết quả thu được đối với tế bào 293. Fig.6 và Fig.7 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH. Như có thể thấy trên Fig.6 và Fig.7, đã phát hiện được rằng NK-0016 và PK-0004 trong ví dụ này có hoạt tính ức chế mạnh, và có tác dụng ức chế theo cách phụ thuộc liều.

Ví dụ A5: Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen TGF-β1 trong tế bào Hepal-6

Tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen TGF-β1 *in vitro* được thử nghiệm bằng cách sử dụng ARN sợi đơn theo sáng chế.

(1) Vật liệu và phương pháp

Phân tử ARN sợi đơn (NK-0033) được thể hiện dưới đây được sử dụng làm phân tử ARN (Ex) trong ví dụ này. NK-0033 bao gồm trình tự 21 đơn phân ức chế sự biểu hiện của gen TGF-β1. Trình tự này được thiết kế dựa trên siARN được sử dụng bởi Cheng và các đồng tác giả (Mol. Pharm., 2009, 6, pp. 772-779).

Trình tự ức chế sự biểu hiện của gen TGF-β1 (SEQ ID NO: 16)

5'-AAAGUCAAUGUACAGCUGCUU-3'

Phân tử ARN sợi đơn (NK-0035) được thể hiện dưới đây được sử dụng làm đối chứng âm can thiệp ARN (Nc) trong ví dụ so sánh. NK-0035 được thiết kế để chứa, thay vì trình tự ức chế sự biểu hiện, một trình tự khác không có liên quan đến sự ức chế mức độ biểu hiện.

Ex: NK-0033 (SEQ ID NO: 80)

5' - cagcuguacauugacuuuagcccCCACACCGGCUAAAGUCAUGUACAGCUGCUUCUUCGgaa-3'
Xc Z Yc

Nc: NK-0035 (SEQ ID NO: 15)

5' - ugucagugcucauuuacaagcccCCACACCGGCUUGUAAAUGAGCACUGACACUUCUUCGgaa-3'
Xc Z Yc

Dung dịch ARN được điều chế bằng cách hòa tan mỗi loại ARN trong nước cất dùng để tiêm. Tế bào Hepal-6 (The RIKEN BioResource Center) được sử dụng làm tế bào, và DMEM chứa FBS 10% (Invitrogen) được sử dụng làm môi trường. Điều kiện nuôi cấy được thiết lập là 37°C và CO₂ 5%.

Trước tiên, tế bào Hepal-6 được nuôi cấy trong môi trường và được phân tán vào đĩa có 24 lỗ sao cho mỗi lỗ chứa 400µl môi trường để đạt được mật độ tế bào là 3×10^4 tế bào/lỗ. Tế bào trong lỗ được nuôi cấy trong 24 giờ nữa. Sau đó, tế bào được chuyển nhiễm bằng ARN sợi đơn bằng cách sử dụng chất phản ứng chuyển nhiễm Lipofectamin 2000 (tên thương mại, Invitrogen) theo quy trình được cung cấp kèm theo. Cụ thể, quá trình chuyển nhiễm được tiến hành bằng cách thiết lập thành phần trong một lỗ như sau. Trong thành phần sau đây, (B) là Opti-MEM (tên thương mại, Invitrogen), và (C) là dung dịch ARN 20µmol/l, và các thành phần được bổ sung sao cho tổng lượng (B) và (C) là 98,5µl. Nồng độ cuối của ARN trong lỗ được thiết lập là 10 nmol/l, 25 nmol/l, 50 nmol/l, hoặc 100 nmol/l.

Bảng 3

(Thành phần trong một lỗ:µl)

Môi trường	400
(A) Lipofectamin 2000	1,5

(B) + (C)	98,5
Tổng số	500

Sau khi chuyển nhiễm, tế bào trong lỗ được nuôi cấy trong 48 giờ, và sau đó, ARN được thu gom bằng cách sử dụng kit RNeasy Mini (tên thương mại, Qiagen) theo quy trình được cung cấp kèm theo. Sau đó, ADN bổ trợ được tổng hợp từ ARN bằng cách sử dụng transcriptaza ngược (tên thương mại: SuperScript III, Invitrogen) theo quy trình được cung cấp kèm theo. Sau đó, PCR được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A2, ngoại trừ việc sử dụng cặp đoạn mồi đối với gen TGF- β 1 và cặp đoạn mồi đối với gen β -actin sau đây, và mức độ biểu hiện của gen TGF- β 1 và gen β -actin là chất chuẩn nội được xác định. Mức độ biểu hiện của gen TGF- β 1 được hiệu chỉnh so với mức độ biểu hiện của gen β -actin.

Cặp đoạn mồi đối với gen TGF- β 1

5'-CCATTGCTGTCCCGTGCAGAGCTG-3' (SEQ ID NO: 17)

5'-ATGGTAGCCCTTGGGCTCGTGGATC-3' (SEQ ID NO: 18)

Cặp đoạn mồi đối với gen β -actin amplification

5'-GTCGTACCACAGGCATTGTGATGG-3' (SEQ ID NO: 19)

5'-GCAATGCCTGGGTACATGGTGG-3' (SEQ ID NO: 20)

Đối với mỗi đối chứng (-) và đối chứng (đối chứng giả), mức độ biểu hiện được xác định theo cách giống như trong ví dụ A2. Mức độ biểu hiện của gen TGF- β 1 đã hiệu chỉnh trong đối chứng (-) được thiết lập là 1, và mức độ biểu hiện trong tế bào được chuyển nhiễm ARN được thể hiện là giá trị tương đối so với mức độ biểu hiện trong đối chứng.

(2) Kết quả

Kết quả được thể hiện trên Fig.8. Fig.8 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen TGF- β 1. Như có thể thấy trên Fig.8, NK-0033 trong ví dụ này ức chế sự biểu hiện của gen TGF- β 1 *in vitro*. Mặt khác, NK-0035 là đối chứng âm không ức chế sự biểu hiện của gen TGF- β 1.

Ví dụ A6: Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen TGF- β 1 và tổn thương phổi cấp tính *in vivo*

Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen và tổn thương phổi cấp tính *in vivo* được thử nghiệm bằng cách sử dụng phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế. Các tác dụng này được xác định theo phương pháp trong tài liệu của Takagi và các đồng tác giả (J. Thromb Hemost 2009; 7: pp. 2053-2063).

(1) Vật liệu và phương pháp

(1.1) Sử dụng ARN sợi đơn trên chuột bị tổn thương phổi cấp tính

Phân tử ARN sợi đơn (NK-0033) của ví dụ A5 được sử dụng làm phân tử ARN (Ex) trong ví dụ này. Phân tử ARN sợi đơn (NK-0035) làm đối chứng âm can thiệp ARN (Nc) trong ví dụ A5 được sử dụng làm ARN trong ví dụ so sánh.

Dung dịch ARN được điều chế bằng cách hòa tan 100 μ g ARN sợi đơn trong 80 μ l dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn (Nippon Kayaku Co., Ltd., sau đây là như nhau). Mặt khác, dung dịch LPS được điều chế bằng cách hòa tan 100 μ g lipopolysaccharit (LPS) trong 50 μ l dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn.

Trước tiên, 80 μ l dung dịch ARN được truyền vào khí quản của chuột. Tiếp đó, 1 giờ sau khi truyền, 50 μ l dung dịch LPS được truyền vào khí quản của chuột để gây tổn thương phổi.

Để làm đối chứng âm đối với LPS, 50 μ l dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn không chứa LPS được sử dụng thay cho dung dịch LPS. Tương tự, để làm đối chứng âm đối với dung dịch ARN, 80 μ l dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn được sử dụng.

Các nhóm sử dụng được thể hiện dưới đây. Mỗi nhóm sử dụng có từ 4 đến 6 con chuột.

Nhóm sử dụng 1:

1 giờ sau khi sử dụng 80 μ l dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn, 50 μ l dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn được sử dụng.

Nhóm sử dụng 2:

1 giờ sau khi sử dụng 80 μ l dung dịch ARN (NK-0033), 50 μ l dung dịch nước

muối sinh lý vô khuẩn được sử dụng.

Nhóm sử dụng 3:

1 giờ sau khi sử dụng 80µl dung dịch ARN (NK-0035), 50µl dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn được sử dụng.

Nhóm sử dụng 4:

1 giờ sau khi sử dụng 80µl dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn, 50µl dung dịch LPS được sử dụng.

Nhóm sử dụng 5:

1 giờ sau khi sử dụng dung dịch ARN (NK-0033), 50µl dung dịch LPS được sử dụng.

Nhóm sử dụng 6:

1 giờ sau khi sử dụng dung dịch ARN (NK-0035), 50µl dung dịch LPS được sử dụng.

(1.2) Lấy mẫu dịch rửa phế quản-phế nang (BALF)

24 giờ sau khi truyền dung dịch LPS, chuột được gây chết êm ái bằng cách sử dụng lượng dư pentobarbital vào khoang bụng, và chuột được sử dụng làm mẫu để phân tích sinh học và mô học. Để làm đối chứng âm, dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn được sử dụng thay cho dung dịch LPS.

Mẫu máu được lấy bằng cách chọc tim của chuột. Mỗi mẫu máu được cho vào ống nghiệm chứa dung dịch natri xitrat trong nước 3,8%. Lượng (thể tích) dung dịch natri xitrat trong nước được kiểm soát bằng 1/10 thể tích mẫu máu. Mẫu BALF được thu gom từ hỗn hợp này theo cách trong tài liệu của Yasui và các đồng tác giả (Am J Respir Crit Care Med 2001; 163: 1660-8). Sau đó, tổng số tế bào trong mẫu BALF được xác định sử dụng máy đếm Nucleo (tên thương mại, ChemoMetec).

Mẫu BALF được ly tâm, và dịch nổi bề mặt của mẫu BALF được thu gom. Dịch nổi bề mặt này được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi tiến hành phân tích sinh học. Hơn nữa, để đếm các loại tế bào khác nhau có trong mẫu BALF, mẫu BALF này được ly tâm bằng cách sử dụng thiết bị Cytospin, và các tế bào tách ra được nhuộm

Giemsa bằng cách sử dụng chất phản ứng May-Grunwald-Giemsa (tên thương mại, Merck). Tương tự, mô phổi được lấy từ chuột và sau đó được nhuộm HE.

(2) Kết quả

(2.1) Sự ức chế mức độ biểu hiện của TGF- β 1 trong phổi

Trong mỗi mẫu phổi của chuột, mức độ biểu hiện của gen TGF- β 1 trên một đơn vị trọng lượng phổi được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA kiểu bánh mì kẹp chả so màu TGF- β 1 Quantikine (tên thương mại, R&D Systems).

Kết quả được thể hiện trên Fig.9. Fig.9 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện của TGF- β 1 trên một đơn vị trọng lượng phổi trong mỗi nhóm sử dụng. Ở nhóm sử dụng 4 (LPS (+)/ARN (-)), mức độ biểu hiện của TGF- β 1 tăng lên do việc xử lý bằng LPS, so với mức độ biểu hiện của TGF- β 1 trong nhóm sử dụng 1 (LPS (-)/ARN (-)). Trong nhóm sử dụng 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)) của ví dụ này, sự gia tăng mức độ biểu hiện của TGF- β 1 bị ức chế so với mức độ biểu hiện ở nhóm sử dụng 4 (LPS (+)/ARN (-)). Không quan sát được tác dụng ức chế này ở nhóm sử dụng 6 (LPS (+)/đối chứng âm NK-0035 (+)). Các kết quả này chứng minh rằng NK-0033 của ví dụ này có thể ức chế một cách hiệu quả sự biểu hiện của gen TGF- β 1.

(2.2) Tác dụng ức chế đối với tổn thương phổi cấp tính

Hiện tượng viêm trong tổn thương phổi cấp tính là do sự thâm nhiễm các tế bào như bạch cầu trung tính vào phổi gây ra. Do đó, các dược chất ức chế sự thâm nhiễm tế bào như bạch cầu trung tính vào phổi có thể được sử dụng làm chất điều trị tình trạng viêm trong tổn thương phổi cấp tính. Vì vậy, tác dụng dược lý của ARN sợi đơn theo sáng chế được thử nghiệm bằng cách đếm số lượng tế bào trong dịch rửa phế quản-phế nang (BALF) là chỉ số của số lượng tế bào đã thâm nhiễm vào phổi.

Kết quả đếm số lượng tế bào trong mẫu BALF được thể hiện trên Fig.10. Fig.10 là biểu đồ thể hiện số lượng tế bào trong mẫu BALF của mỗi nhóm sử dụng. Ở nhóm sử dụng 4 (LPS (+)/ARN (-)), số lượng tế bào trong mẫu BALF tăng lên do việc xử lý bằng LPS, so với số lượng tế bào trong mẫu BALF của nhóm sử dụng 1 (LPS (-)/ARN (-)). Điều này cho thấy rằng LPS đã kích thích quá trình viêm, do đó xảy ra quá trình

thâm nhiễm của tế bào vào phổi. Ở nhóm sử dụng 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)) của ví dụ này, sự tăng số lượng tế bào bị ức chế so với sự tăng số lượng tế bào trong nhóm sử dụng 4 (LPS (+)/ARN (-)). Điều này cho thấy rằng tình trạng viêm trong tổn thương phổi cấp tính đã bị ức chế bởi NK-0033. Không quan sát được tác dụng ức chế này ở nhóm sử dụng 6 (LPS (+)/đối chứng âm NK-0035 (+)). Kết quả này chứng minh rằng NK-0033 trong ví dụ này có thể ức chế hiện tượng viêm trong tổn thương phổi cấp tính một cách hiệu quả.

Kết quả xác định số lượng bạch cầu trung tính trong mẫu BALF được thể hiện trên Fig.11. Fig.11 là biểu đồ thể hiện số lượng bạch cầu trung tính trong mẫu BALF của mỗi nhóm sử dụng. Ở nhóm sử dụng 4 (LPS (+)/ARN (-)), số lượng bạch cầu trung tính trong mẫu BALF tăng lên do việc xử lý bằng LPS, so với số lượng bạch cầu trung tính trong mẫu BALF ở nhóm sử dụng 1 (LPS (-)/ARN (-)). Điều này cho thấy rằng LPS đã kích thích quá trình viêm, do đó xảy ra quá trình thâm nhiễm bạch cầu trung tính vào phổi. Ở nhóm sử dụng 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)) của ví dụ này, sự tăng số lượng bạch cầu trung tính trong mẫu BALF bị ức chế so với sự tăng số lượng bạch cầu trung tính trong mẫu BALF ở nhóm sử dụng 4 (LPS (+)/ARN (-)). Điều này cho thấy rằng hiện tượng viêm trong tổn thương phổi cấp tính bị ức chế bởi NK-0033. Không quan sát được tác dụng ức chế này ở nhóm sử dụng 6 (LPS (+)/đối chứng âm NK-0035 (+)). Kết quả này chứng minh rằng NK-0033 trong ví dụ này có thể ức chế hiện tượng viêm trong tổn thương phổi cấp tính một cách hiệu quả.

(2.3) Quan sát mô học: nhuộm Giemsa

Kết quả nhuộm Giemsa được thể hiện trên Fig.12. Fig.12 là các ảnh chụp (độ phóng đại 100 lần), mỗi ảnh thể hiện kết quả nhuộm Giemsa của tế bào trong mẫu BALF. Fig.12A thể hiện kết quả thu được ở nhóm sử dụng 4 (LPS (+)/ARN (-)). Fig.12B thể hiện kết quả thu được ở nhóm sử dụng 6 (LPS (+)/đối chứng âm NK-0035 (+)). Fig.12C thể hiện kết quả thu được ở nhóm sử dụng 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)).

Như có thể thấy trên Fig.12, ở nhóm sử dụng 5 (Fig.12C: LPS (+)/NK-0033 (+)) của ví dụ này, số lượng tế bào đã thâm nhiễm vào phổi là thấp hơn đáng kể so với số lượng tế bào thâm nhiễm vào phổi ở nhóm sử dụng 4 (Fig.12A: LPS (+)/ARN (-)) và

nhóm sử dụng 6 (Fig.12B: LPS (+)/đối chứng âm NK-0035 (+)). Kết quả quan sát mô học này tương ứng với kết quả đếm số lượng tế bào trong mẫu BALF đã mô tả trên đây.

(2.4) Quan sát mô học: nhuộm HE

Kết quả nhuộm HE được thể hiện trên Fig.13. Fig.13 là các ảnh chụp (độ phóng đại 10 lần), mỗi ảnh thể hiện kết quả nhuộm HE của mô phổi. Fig.13A thể hiện kết quả thu được ở nhóm sử dụng 4 (LPS (+)/ARN (-)). Fig.13B thể hiện kết quả thu được ở nhóm sử dụng 6 (LPS (+)/đối chứng âm NK-0035 (+)). Fig.13C thể hiện kết quả thu được ở nhóm sử dụng 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)). Trên Fig.13, đã phát hiện được rằng sự thâm nhiễm tế bào như bạch cầu trung tính vào vùng lân cận của mạch máu, khoang phế nang, thành phế nang, và vùng lân cận của phế quản giảm đi và mức độ tổn thương mô phổi cũng giảm.

Ví dụ A7: Đánh giá tác dụng phụ khi sử dụng mức độ kích thích interferon làm chỉ số

Đã biết rằng các chất can thiệp ARN thông thường có tác dụng phụ là kích thích interferon theo kiểu phụ thuộc vào trình tự, và tác dụng phụ này được cho là một vấn đề. Do đó, tác dụng phụ kích thích interferon của ARN sợi đơn theo sáng chế được đánh giá.

(1) Vật liệu và phương pháp

Phân tử ARN sợi đơn được sử dụng cho chuột bị tổn thương phổi cấp tính theo cách và ở điều kiện giống như trong ví dụ A6. Tiếp đó, 24 giờ sau khi truyền dung dịch LPS hoặc dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn (đối chứng âm đối với LPS), chuột được gây chết êm ái, mô phổi được lấy mẫu.

Bảng 4

Nhóm sử dụng	ARN	LPS
1	—	—
2	Ex: NK-0033	—
4	—	+
5	Ex: NK-0033	+
EX: ARN theo ví dụ		

Để xác định mức độ biểu hiện của mỗi gen, ARN được phân lập từ mỗi mô phổi bằng cách sử dụng TRIZOL (tên thương mại, Invitrogen). Sau đó, ADN bổ trợ được tổng hợp từ ARN bằng cách sử dụng enzym transcriptaza ngược (tên thương mại: SuperScript III, Invitrogen) theo quy trình được cung cấp kèm theo. Tiếp đó, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng ADN bổ trợ tổng hợp được làm khuôn, và mức độ biểu hiện của gen TGF- β 1, gen IFN- α , và gen IFN- β được xác định.

PCR được tiến hành bằng cách sử dụng chất phản ứng Gold AmpliTaq (tên thương mại, Applied Biosystem, Mỹ) và thiết bị đo AB Applied Biosystem 7600 (tên thương mại, Applied Biosystem). Gen TGF- β 1, gen IFN- α , và gen IFN- β được khuếch đại bằng cách sử dụng lần lượt các cặp đoạn mồi sau.

Cặp đoạn mồi đối với gen GAPDH

5'-CCCTTATTGACCTCAACTACATGGT-3' (SEQ ID NO: 21)

5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG-3' (SEQ ID NO: 22)

Cặp đoạn mồi đối với gen TGF- β 1

5'-ACTCCACGTGGAAATCAACGG-3' (SEQ ID NO: 23)

5'-TAGTAGACGATGGGCAGTGG-3' (SEQ ID NO: 24)

Cặp đoạn mồi đối với gen IFN- α

5'-ATGGCTAGRCTCTGTGCTTCCT-3' (SEQ ID NO: 25)

5'-AGGGCTCTCCAGAYTTCTGCTCTG-3' (SEQ ID NO: 26)

Cặp đoạn mồi đối với gen IFN- β

5'-CATCAACTATAAGCAGCTCCA-3' (SEQ ID NO: 27)

5'-TTCAAGTGGAGAGCAGTTCAG-3 (SEQ ID NO: 28)

Sau đó, mỗi sản phẩm PCR thu được được tiến hành điện di trên gel agarosa. Phép phân tích mật độ gel agarosa được thực hiện bằng cách sử dụng máy chụp ảnh NIH, và mức độ biểu hiện của các gen tương ứng được xác định. Mức độ biểu hiện của gen TGF- β 1, gen IFN- α , và gen IFN- β được đánh giá so với mức độ biểu hiện của gen GAPDH là giá trị chuẩn. Cụ thể, mật độ xác định được của sản phẩm PCR thu được

bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi đối với GAPDH được cho là 1, và mật độ xác định được của sản phẩm PCR thu được đối với các gen tương ứng được đánh giá là giá trị tương đối so với gen GAPDH.

(2) Kết quả và bàn luận

Kết quả phân tích định lượng mức độ biểu hiện của gen TGF- β 1, gen IFN- α , và gen IFN- β được thể hiện lần lượt trên các biểu đồ của các hình vẽ từ Fig.14A đến Fig.14C. Các nhóm sử dụng được thể hiện dưới đây và giống như trong ví dụ A6.

Fig.14A thể hiện kết quả xác định mức độ biểu hiện của gen TGF- β 1. Như có thể thấy trên Fig.14A, ở nhóm sử dụng 5 của ví dụ này, NK-0033 được sử dụng, sự gia tăng mức độ biểu hiện của gen TGF- β 1 do LPS bị ức chế so với mức độ biểu hiện của gen TGF- β 1 ở nhóm sử dụng 4 (ARN (-)). Kết quả này có tương quan với kết quả xác định mức độ biểu hiện của TGF- β 1 trong ví dụ A5 được thể hiện trên Fig.8.

Fig.14B thể hiện kết quả xác định mức độ biểu hiện của gen IFN- α , và Fig.14C thể hiện kết quả xác định mức độ biểu hiện của gen IFN- β . Trên Fig.14B và Fig.14C, khi LPS không được sử dụng, có thể thấy từ kết quả so sánh giữa nhóm sử dụng 1 (ARN (-)) và nhóm sử dụng 2 (ARN (+)) rằng cả sự biểu hiện của gen IFN- α và gen IFN- β đều là interferon typ I, không được kích thích do sử dụng ARN sợi đơn. Tương tự, như có thể thấy trên Fig.14B và Fig.14C, khi LPS được sử dụng, có thể thấy từ kết quả so sánh giữa nhóm sử dụng 4 (ARN (-)) và nhóm sử dụng 5 (NK-0033 (+)) rằng sự biểu hiện của cả hai gen IFN- α và gen IFN- β không bị kích thích do sử dụng ARN sợi đơn.

Kết quả này trái ngược với thực tế là việc sử dụng siARN thông thường gây ra tác dụng phụ là kích thích interferon typ I. Như vậy, đã bất ngờ chứng minh được rằng ARN sợi đơn theo sáng chế không có tác dụng phụ là kích thích interferon là một vấn đề gặp phải trong siARN thông thường.

Ví dụ A8: Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen TGF- β 1 trong tế bào Hepal-6

Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen TGF- β 1 *in vitro* của ARN sợi đơn theo sáng chế được thử nghiệm.

(1) Vật liệu và phương pháp

NK-0033 trong ví dụ A5 và NK-0061, NK-0055, và NK-0062 được thể hiện dưới đây được sử dụng làm ARN (Ex) trong ví dụ này. Trong các trình tự sau, ký hiệu “*” thể hiện bazơ không kết cặp.

Ex: NK-0033 (SEQ ID NO: 80)



Ex: NK-0061 (SEQ ID NO: 29)



Ex: NK-0055 (SEQ ID NO: 30)

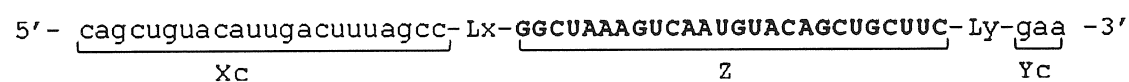


Ex: NK-0062 (SEQ ID NO: 31)

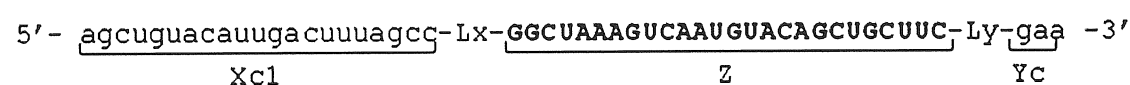


Tương tự, PK-0007, PK-0026, PK-0027, và PK-0028 được thể hiện dưới đây được sử dụng làm ARN (Ex) trong ví dụ này. Trong mỗi ARN sợi đơn, vùng liên kết (Lx) và vùng liên kết (Ly) được tạo ra bằng cách liên kết hợp chất có công thức 10 (L-prolin-diamit-amidit) trong sơ đồ 3 trong ví dụ B giữa vùng Xc và X, và giữa vùng Yc và Y.

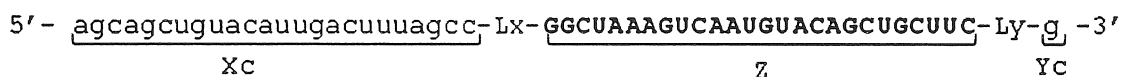
Ex: PK-0007 (SEQ ID NO: 32)



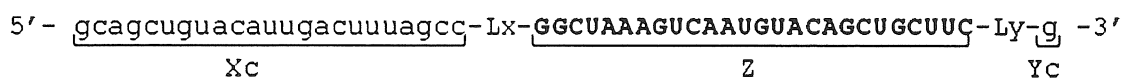
Ex: PK-0026 (SEQ ID NO: 33)



Ex: PK-0027 (SEQ ID NO: 34)



Ex: PK-0028 (SEQ ID NO: 35)



Các trình tự của NK-0033, NK-0061, NK-0055 và NK-0062 là giống với trình tự của PK-0007, PK-0026, PK-0027 và PK-0028, ngoại trừ vùng liên kết thứ nhất (L1) và vùng liên kết thứ hai (L2). Tất cả các phân tử này đều có trình tự ức chế sự biểu hiện của gen TGF- β 1 (SEQ ID NO: 16).

(1.2) Ức chế sự biểu hiện của gen

Dung dịch ARN được điều chế bằng cách hòa tan mỗi loại ARN được bảo quản lạnh trong nước cất dùng để tiêm để đạt được nồng độ là 20 μ mol/l. Sau đó, quá trình chuyển nhiễm ARN sợi đơn vào tế bào Hepal-6, thu gom ARN, tổng hợp ADN bổ trợ, PCR, và xác định mức độ biểu hiện tương đối của gen TGF- β 1 được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A5, ngoại trừ việc sử dụng dung dịch ARN nêu trên. Nồng độ ARN tại thời điểm chuyển nhiễm được thiết lập là 1 nmol/l.

(2) Kết quả

Các kết quả được thể hiện trên Fig.15 và Fig.16. Mỗi Fig.15 và Fig.16 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen TGF- β 1. Fig.15 thể hiện kết quả thu được khi sử dụng NK-0033, NK-0061, NK-0055, và NK-0062, và Fig.16 thể hiện kết quả thu được khi sử dụng PK-0007, PK-0026, PK-0027, và PK-0028. Như có thể thấy trên Fig.15 và Fig.16, tất cả các phân tử ARN sợi đơn đều có hoạt tính ức chế mạnh.

Ví dụ A9: Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen TGF- β 1 và tổn thương phổi cấp tính *in vivo*

(A9-1) Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen TGF- β 1 *in vivo*

Tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen TGF- β 1 *in vivo* được thử nghiệm bằng cách sử dụng ARN sợi đơn theo sáng chế.

(1) Vật liệu và phương pháp

Việc sử dụng ARN trên chuột bị tổn thương phổi cấp tính được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A6, trừ khi được quy định theo cách khác.

Phân tử PK-0007 và NK-0033 trong ví dụ A8 được sử dụng làm ARN (Ex) trong ví dụ này. Hơn nữa, để làm ARN trong ví dụ so sánh, PK-0008 và NK-0035 được sử dụng làm đối chứng âm can thiệp ARN (Nc), ARN sợi kép (NI-0030) được sử dụng làm đối chứng dương can thiệp ARN (Pc), và ARN sợi kép (NI-0031) được thể hiện dưới đây được sử dụng làm đối chứng âm can thiệp ARN (Nc). Phân tử PK-0008 làm đối chứng âm có các vùng liên kết Lx và Ly thu được từ các amidit đã mô tả trên đây (hợp chất có công thức 10 trong sơ đồ 3: L-prolin-diamit-amidit), và các vùng liên kết này là giống như các vùng liên kết trong PK-0007.

Ex: PK-0007 (SEQ ID NO: 32)

5' - cagcuguacauugacuuuagcc - Lx - GGCUAAAGUCA AUGUACAGCUGCUUC - Ly - gaa - 3'
Xc Z Yc

Nc: PK-0008 (SEQ ID NO: 36)

5' - ugucagugcucuuuacaagcc - Lx - GGCUUGUAAAUGAGCACUGACACUUC - Ly - gaa - 3'
Xc Z Yc

Ex: NK-0033 (SEQ ID NO: 80)

5' - cagcuguacauugacuuuagccCCACACCGGCUAAAGUCA AUGUACAGCUGCUUCUUCgaa - 3'
Xc Z Yc

Nc: NK-0035 (SEQ ID NO: 15)

5' - ugucagugcucuuuacaagccCCACACCGGCUUGUAAAUGAGCACUGACACUUCUUCgaa - 3'
Xc Z Yc

Pc: NI-0030

5' - GCAGCUGUACAUUGACUUUAG - 3' (SEQ ID NO: 39)
3' - UUCGUCGACAUGUAAACUGAAA - 5' (SEQ ID NO: 40)

Nc: NI-0031

5' - GUGUCAGUGCUCAUUUACAAG - 3' (SEQ ID NO: 41)
3' - UUCACAGUCACGAGUAAAUGU - 5' (SEQ ID NO: 42)

Dung dịch ARN được điều chế bằng cách hòa tan 100µg mỗi loại ARN trong

75µl dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn. Mặt khác, dung dịch LPS được điều chế bằng cách hòa tan 100µg lipopolysaccharit (LPS) trong 50µl dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn.

Các nhóm sử dụng được thể hiện dưới đây. Trừ khi được quy định theo cách khác, việc sử dụng được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A6. Mỗi nhóm sử dụng có từ 4 đến 6 chuột.

Nhóm sử dụng 1:

5 phút sau khi sử dụng 75µl dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn, 50µl dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn được sử dụng.

Nhóm sử dụng 2:

5 phút sau khi sử dụng 75µl dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn, 50µl dung dịch LPS được sử dụng.

Nhóm sử dụng 3:

5 phút sau khi sử dụng 75µl dung dịch ARN (PK-0007), 50µl dung dịch LPS được sử dụng.

Nhóm sử dụng 4:

5 phút sau khi sử dụng 75µl dung dịch ARN (PK-0008), 50µl dung dịch LPS được sử dụng.

Nhóm sử dụng 5:

5 phút sau khi sử dụng 75µl dung dịch ARN (NK-0033), 50µl dung dịch LPS được sử dụng.

Nhóm sử dụng 6:

5 phút sau khi sử dụng 75µl dung dịch ARN (NK-0035), 50µl dung dịch LPS được sử dụng.

Nhóm sử dụng 7:

5 phút sau khi sử dụng 75µl dung dịch ARN (NI-0030), 50µl dung dịch LPS được sử dụng.

Nhóm sử dụng 8:

5 phút sau khi sử dụng 50µl dung dịch ARN (NI-0031), 50µl dung dịch LPS được sử dụng.

Sau đó, mẫu phổi được lấy và mức độ biểu hiện của TGF-β1 trên một đơn vị trọng lượng phổi được xác định theo cách giống như trong ví dụ A6.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.17. Fig.17 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện TGF-β1 trên một đơn vị trọng lượng phổi trong mỗi nhóm sử dụng. Ở nhóm sử dụng 3 (LPS (+)/PK-0007 (+)) và nhóm sử dụng 5 (LPS (+)/NK-0033 (+)), mức độ biểu hiện của gen TGF-β1 bị ức chế so với mức độ biểu hiện TGF-β1 ở nhóm sử dụng 2 (LPS (+)/ARN sợi đơn (-)). Đã phát hiện được rằng tác dụng ức chế này là mạnh hơn so với tác dụng ức chế ở nhóm sử dụng 7 (LPS (+)/đối chứng dương NI-0030). Cụ thể, ở nhóm sử dụng 3 (LPS (+)/PK-0007 (+)), đã quan sát được tác dụng ức chế. Ở nhóm sử dụng sử dụng ARN đối chứng âm, cụ thể là nhóm sử dụng 4 (PK-0008), nhóm sử dụng 6 (NK-0035), và nhóm sử dụng 8 (NI-0031), không quan sát được tác dụng ức chế.

(A9-2) Tác dụng sai đích *in vivo*

Tác dụng sai đích *in vivo* và tác dụng phụ được đánh giá bằng cách sử dụng ARN sợi đơn theo sáng chế.

Phân tử ARN sợi đơn (PK-0007) trong ví dụ A8 được sử dụng làm ARN trong ví dụ này. Để làm ARN trong ví dụ so sánh, ARN sợi đơn (PK-0008) được sử dụng làm đối chứng âm can thiệp ARN (Nc), ARN sợi kép (NI-0030) được sử dụng làm đối chứng dương can thiệp ARN (Pc), và ARN sợi kép (NI-0031) trong ví dụ A9-1 được sử dụng làm đối chứng âm can thiệp ARN. Dung dịch ARN được điều chế bằng cách hòa tan 100µg mỗi loại ARN trong 75µl dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn.

Các nhóm sử dụng được thể hiện dưới đây. Mỗi nhóm sử dụng có từ 2 đến 4 chuột.

Nhóm sử dụng 1:

75µl dung dịch nước muối sinh lý vô khuẩn được sử dụng.

Nhóm sử dụng 2:

75 μ l dung dịch ARN (PK-0007) được sử dụng.

Nhóm sử dụng 3:

75 μ l dung dịch ARN (PK-0008) được sử dụng.

Tiếp đó, 24 giờ sau khi sử dụng, mẫu BALF được lấy từ chuột và thu được dịch nổi bề mặt của mẫu BALF theo cách giống như trong ví dụ A6. Lượng TNF- α và lượng IFN- β trong mỗi dịch nổi bề mặt được xác định. Lượng TNF- α được định lượng bằng cách sử dụng Mouse TNF set II (tên thương mại, Beckton Dickinson and Company) theo hướng dẫn sử dụng. Lượng IFN- β được định lượng bằng cách sử dụng đĩa ELISA được tạo ra bằng cách sử dụng Interferon β của thỏ kháng chuột (tên thương mại, PBL Interferon Source) và Biotin Labeling Kit-NH2 (tên thương mại, Dojindo Laboratories) theo hướng dẫn sử dụng.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.18. Fig.18A là biểu đồ thể hiện lượng TNF- α trong mẫu BALF của mỗi nhóm sử dụng, và Fig.18B là biểu đồ thể hiện lượng IFN- β trong mẫu BALF của mỗi nhóm sử dụng. Trên Fig.18A và Fig.18B, trục hoành thể hiện lượng tương ứng. Ở nhóm sử dụng 2 (PK-0007 (+)), sự biểu hiện TNF- α và IFN- β không bị kích thích so với nhóm sử dụng 1 (ARN (-)).

Ví dụ A10: Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen LAMA1 trong tế bào 293

Tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen LAMA1 *in vitro* được thử nghiệm bằng cách sử dụng ARN sợi đơn theo sáng chế.

(1) Vật liệu và phương pháp

Phân tử NK-0043 và NK-0064 được thể hiện dưới đây được sử dụng làm phân tử ARN (Ex) trong ví dụ này. Trong các trình tự sau đây, ký hiệu “*” để chỉ bazơ không kết cặp.

Ex: NK-0043 (SEQ ID NO: 43)

5'- uguuuugucucgguacaauaucccCCACACCGGAUAUUGUAACGAGACAAACACUCCUUCGgga-3'

Xc
Z
Yc

Ex: NK-0064 (SEQ ID NO: 44)

5'- aguguuuugucucguuacaauauccCCACACCGGAUUUGUAACGAGACAAAACUC^{*}CUUCg-3'

Xc
Z
Yc

Quá trình chuyển nhiễm tế bào 293 được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A4, ngoại trừ việc sử dụng các phân tử ARN nêu trên, và tế bào được nuôi cấy trong 48 giờ. Nồng độ ARN tại thời điểm chuyển nhiễm được thiết lập là 10 nmol/l. Sau đó, việc thu gom ARN, tổng hợp ADN bổ trợ, và PCR được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A2, ngoại trừ việc sử dụng cặp đoạn mồi đối với gen LAMA1 được thể hiện dưới đây, và mức độ biểu hiện của gen LAMA1 và mức độ biểu hiện của gen β -actin là chất chuẩn nội được xác định. Mức độ biểu hiện của gen LAMA1 được hiệu chỉnh so với mức độ biểu hiện của gen β -actin là chất chuẩn nội.

Cặp đoạn môi đối với gen LAMA1

5'-AAAGCTGCCAATGCCCCTCGACC-3' (SEQ ID NO: 45)

5'-TAGGTGGGTGGCCCTCGTCTTG-3' (SEQ ID NO: 46)

Đối với mỗi đối chứng 1 (-) và đối chứng 2 (đối chứng giả), mức độ biểu hiện được xác định theo cách giống như trong ví dụ A2. Mức độ biểu hiện của gen LAMA1 trong đối chứng (-) đã hiệu chỉnh được thiết lập là 1, và mức độ biểu hiện trong tế bào được chuyển nhiễm ARN được thể hiện là giá trị tương đối so với mức độ biểu hiện trong mẫu đối chứng.

(2) Kết quả

Các kết quả được thể hiện trên Fig.19. Fig.19 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen LAMA1 trong tế bào 293. Như có thể thấy trên Fig.19, đã phát hiện được rằng NK-0043 và NK-0064 trong ví dụ đều có hoạt tính ức chế mạnh.

Ví dụ A11: Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen LMNA trong tế bào A549

Tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen LAMA1 *in vitro* bằng cách can thiệp ARN được thử nghiệm bằng cách sử dụng ARN sợi đơn theo sáng chế.

(1) Vật liệu và phương pháp

Phân tử NK-0063 và NK-0066 được thể hiện dưới đây được sử dụng làm phân tử ARN (Ex) trong ví dụ này. Trong các trình tự sau đây, ký hiệu “*” để chỉ bazơ không kết cặp.

Ex: NK-0063 (SEQ ID NO: 47)

5' - cgucacccaaaaagcgcaauuccCCACACCGGAAUUGCGCUUUUUGGUGACGC*UUCGgaa -3'
Xc Z Yc

Ex: NK-0066 (SEQ ID NO: 48)

5' - agcgucacccaaaaagcgcaauuccCCACACCGGAAUUGCGCUUUUUGGUGACGC*UUCGg -3'
Xc Z Yc

Quá trình chuyển nhiễm tế bào A549 được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A4, ngoại trừ việc sử dụng mỗi ARN trong số các phân tử ARN nêu trên, và tế bào được nuôi cấy trong 48 giờ. Nồng độ ARN tại thời điểm chuyển nhiễm được thiết lập là 3 nmol/l. Sau đó, việc thu gom ARN, tổng hợp ADN bổ trợ, và PCR được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A2, ngoại trừ việc sử dụng cặp đoạn mỗi đối với gen LAMA1 được thể hiện dưới đây, và mức độ biểu hiện của gen LAMA1 và mức độ biểu hiện của gen β -actin là chất chuẩn nội được xác định. Mức độ biểu hiện của gen LAMA1 được hiệu chỉnh so với mức độ biểu hiện của gen β -actin là chất chuẩn nội.

Cặp đoạn mỗi đối với gen LMNA

5'-CTGGACATCAAGCTGGCCCTGGAC-3' (SEQ ID NO: 49)

5'-CACCAGCTTGCGCATGGCCACTTC-3' (SEQ ID NO: 50)

Đối với mỗi đối chứng 1 (–) và đối chứng 2 (đối chứng giả), mức độ biểu hiện được xác định theo cách giống như trong ví dụ A2. Mức độ biểu hiện của gen LAMA1 trong đối chứng (–) đã hiệu chỉnh được thiết lập là 1, và mức độ biểu hiện trong tế bào được chuyển nhiễm ARN được thể hiện là giá trị tương đối so với mức độ biểu hiện trong đối chứng.

(2) Kết quả

Các kết quả được thể hiện trên Fig.20. Fig.20 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen LMNA trong tế bào A549. Như có thể thấy trên Fig.20, đã phát

hiện được rằng mỗi phân tử NK-0063 và NK-0066 của ví dụ này đều có hoạt tính ức chế mạnh.

Ví dụ A12: Chiều dài của Xc và Yc

Trên phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế, chiều dài của vùng đầu 5' (Xc) hỗ trợ cho vùng bên trong đầu 5' (X) và chiều dài của vùng đầu 3' (Yc) hỗ trợ cho vùng bên trong đầu 3' (Y) được thay đổi, và tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen GAPDH *in vitro* được thử nghiệm.

(1) Vật liệu và phương pháp

Phân tử ARN sợi đơn được thể hiện trên Fig.21 được sử dụng làm ARN sợi đơn trong ví dụ này. Trên Fig.21, các con số ở bên phải thể hiện số nhận biết trình tự. Trên Fig.21, từ đầu 5', vùng được thể hiện bằng chữ thường gạch chân là vùng (Xc); vùng được thể hiện bằng chữ in gạch chân là vùng bên trong (Z); và vùng được thể hiện bằng chữ thường gạch chân là vùng (Yc). Vùng giữa Xc và Z là vùng liên kết (Lx), và vùng giữa Z và Yc là vùng liên kết (Ly). Tương tự, "Xc/Yc" thể hiện tỷ lệ giữa chiều dài bazơ (Xc) của vùng (Xc) và chiều dài bazơ (Yc) của vùng (Yc). Trên Fig.21, ký hiệu "*" để chỉ bazơ không kết cặp.

Trong mỗi phân tử ARN sợi đơn, chiều dài bazơ của vùng bên trong (Z) được thiết lập là 26, chiều dài bazơ của vùng liên kết (Lx) được thiết lập là 7, và chiều dài bazơ của vùng liên kết (Ly) được thiết lập là 4. Trong phân tử NK-0036 và NK-0040, tổng số bazơ (Xc + Yc) ở vùng (Xc) và (Yc) được thiết lập là 26. Trong các phân tử ARN sợi đơn không phải là NK-0036 và NK-0040, tổng số bazơ (Xc + Yc) ở vùng (Xc) và (Yc) được thiết lập là 25. Sau đó, trong các điều kiện nêu trên, chiều dài bazơ của vùng (Xc) và (Yc) được thay đổi. Kết quả là NK-0036 và NK-0040 trở thành các phân tử không có bazơ không kết cặp. Hơn nữa, mỗi phân tử ARN sợi đơn không phải NK-0036 và NK-0040 trở thành phân tử trong đó vùng bên trong (Z) chỉ bao gồm một bazơ không kết cặp không tạo thành sợi kép và vị trí của bazơ không kết cặp ở vùng bên trong (Z) được chuyển đổi từ đầu 3' thành đầu 5'.

Quá trình chuyển nhiễm tế bào HCT116, nuôi cấy tế bào, thu gom ARN, tổng

hợp ADN hỗ trợ, và PCR được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A2, ngoại trừ việc sử dụng mỗi phân tử ARN nêu trên, và mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH được xác định. Nồng độ ARN tại thời điểm chuyển nhiễm được thiết lập là 10 nmol/l.

(2) Kết quả và bàn luận

Các kết quả được thể hiện trên Fig.22. Fig.22 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH khi mỗi phân tử ARN được sử dụng với nồng độ cuối là 10 nmol/l. Như có thể thấy trên Fig.22, đã phát hiện được rằng tất cả các phân tử ARN sợi đơn có chiều dài vùng đầu 5' (Xc) và vùng đầu 3' (Yc) khác nhau đều ức chế sự biểu hiện của gen GAPDH.

Cụ thể, đã phát hiện được rằng, khi sự khác biệt giữa chiều dài bazơ của vùng (Xc) và chiều dài bazơ của vùng (Yc) càng lớn, mức độ biểu hiện của gen càng giảm, nghĩa là hoạt tính ức chế tăng lên. Điều này có nghĩa là đã phát hiện được rằng, bằng cách thiết lập vị trí của bazơ không kết cặp ở vùng bên trong (Z) càng gần với đầu 5' hoặc đầu 3' so với vị trí giữa của vùng bên trong, có thể cải thiện hoạt tính ức chế.

Trong ví dụ A2, đã phát hiện được rằng NK-0016 có hoạt tính ức chế rất mạnh. Trong ví dụ này, đã phát hiện được rằng hoạt tính ức chế của NK-0025 và NK-0037 thậm chí còn cao hơn so với NK-0016.

Đối với vị trí của bazơ không kết cặp, cũng thu được tác dụng tương tự trong các ví dụ trong đó các gen khác nhau được thử nghiệm, chẳng hạn, ví dụ A8 (gen TGF- β 1), ví dụ A10 (gen LAMA1), và ví dụ A11 (gen LMNA).

Nghĩa là trong ví dụ A8, như được thể hiện trong các trình tự nêu trên, cả NK-0033 và NK-0055 đều có một bazơ không kết cặp. Trong NK-0033, bazơ không kết cặp là bazơ thứ tư tính từ đầu 3' của vùng bên trong (Z). Trong NK-0055, bazơ không kết cặp là bazơ thứ hai tính từ đầu 3' của vùng bên trong (Z). Như vậy, có thể thấy trên Fig.15 đã mô tả trên đây, NK-0055 có bazơ không kết cặp ở vị trí gần đầu 3' hơn có hoạt tính ức chế cao hơn. Thu được kết quả tương tự khi so sánh NK-0061 với NK-0062, mỗi phân tử này đều có hai bazơ không kết cặp. Tương tự, trong ví dụ A9 và

A10, vị trí của bazơ không kết cặp được thay đổi trong cùng điều kiện như trong ví dụ A8. Kết quả là ARN sợi đơn có bazơ không kết cặp ở vị trí gần đầu 3' hơn có hoạt tính ức chế cao hơn.

Cũng từ các kết quả trên, có thể thấy rõ rằng ARN sợi đơn theo sáng chế có hoạt tính tương tự bất kể loại gen đích và trình tự ức chế sự biểu hiện đối với gen đích. Do đó, có thể kết luận rằng ARN sợi đơn theo sáng chế là công cụ hữu hiệu bất kể loại gen đích.

Ví dụ A13: Chiều dài của X, Xc, Y, và Yc

Trên phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế, chiều dài của vùng bên trong đầu 5' (X), vùng đầu 5' (Xc), vùng bên trong đầu 3' (Y), và vùng đầu 3' (Yc) được thay đổi, và tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen GAPDH *in vitro* được thử nghiệm.

(1) Vật liệu và phương pháp

Phân tử ARN sợi đơn được thể hiện trên Fig.23 được sử dụng làm ARN sợi đơn trong ví dụ này. Trên Fig.23, các số ở bên phải thể hiện số nhận biết trình tự. Trên Fig.23, từ đầu 5', vùng được thể hiện bằng chữ thường gạch chân là vùng (Xc); vùng được thể hiện bằng chữ in gạch chân là vùng bên trong (Z); và vùng được thể hiện bằng chữ thường gạch chân là vùng (Yc). Tương tự, "Xc+Yc/X+Y" thể hiện tỷ lệ giữa tổng chiều dài bazơ của các vùng (Xc) và (Yc) và tổng chiều dài bazơ của các vùng (X) và (Y). Trên Fig.23, ký hiệu "*" để chỉ bazơ không kết cặp.

Trong mỗi phân tử ARN sợi đơn, chiều dài bazơ của vùng liên kết (Lx) được thiết lập là 7, chiều dài bazơ của vùng liên kết (Ly) được thiết lập là 4, chiều dài bazơ của vùng (Yc) được thiết lập là 1, và bazơ thứ hai tính từ đầu 3' của vùng bên trong (Z) được thiết lập là bazơ không kết cặp. Sau đó, chiều dài bazơ của vùng bên trong (Z) và chiều dài bazơ của vùng (Xc) được thay đổi.

Trừ khi được quy định theo cách khác, quá trình chuyển nhiễm ARN vào tế bào HCT116, nuôi cấy tế bào, thu gom ARN, tổng hợp ADN bổ trợ, và PCR được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A2, và mức độ biểu hiện của gen GAPDH được xác định. Quá trình chuyển nhiễm được tiến hành bằng cách thiết lập thành phần trong một

lỗ là như sau. Trong thành phần sau đây, (B) là Opti-MEM (tên thương mại, Invitrogen), và (C) là dung dịch ARN 20 μ mol/l, và các thành phần được bổ sung sao cho tổng lượng (B) và (C) là 98,5 μ l. Nồng độ cuối của ARN trong lỗ được thiết lập là 1 nmol/l. Việc hiệu chỉnh bằng chất chuẩn nội và tính giá trị tương đối của mức độ biểu hiện cũng được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A2.

Bảng 5

(Thành phần trong một lỗ: μ l)

Môi trường	400
(A) Lipofectamin 2000	1,5
<u>(B) + (C)</u>	<u>98,5</u>
Tổng số	500

(2) Kết quả và bàn luận

Kết quả được thể hiện trên Fig.24. Fig.24 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH khi mỗi phân tử ARN được sử dụng với nồng độ cuối là 1 nmol/l. Như có thể thấy trên Fig.24, đã phát hiện được rằng tất cả các phân tử ARN sợi đơn có chiều dài vùng (X), (Xc), (Y), và (Yc) khác nhau đều ức chế sự biểu hiện của gen GAPDH. Trong ví dụ A2, đã phát hiện được rằng NK-0016 có hoạt tính ức chế rất mạnh. Trong ví dụ này, đã phát hiện được rằng hoạt tính ức chế của tất cả các phân tử ARN sợi đơn, ngoại trừ NK-0016, thậm chí còn cao hơn so với NK-0016.

Ví dụ A14: Chiều dài của Xc

Trên phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế, chiều dài của vùng đầu 5' (Xc) hỗ trợ cho vùng bên trong đầu 5' (X) được thay đổi, và tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen GAPDH *in vitro* được thử nghiệm.

(1) Vật liệu và phương pháp

Phân tử ARN sợi đơn được thể hiện trên Fig.25 được sử dụng làm ARN sợi đơn trong ví dụ này. Trên Fig.25, từ đầu 5', vùng được thể hiện bằng chữ thường gạch chân là vùng (Xc); vùng được thể hiện bằng chữ in gạch chân là vùng bên trong đầu 5' (X);

và vùng được thể hiện bằng chữ thường gạch chân là vùng (Yc). Tương tự, “Xc/X” thể hiện tỷ số giữa chiều dài bazơ (Xc) của vùng (Xc) và chiều dài bazơ (X) của vùng (X). Trên Fig.25, ký hiệu “*” để chỉ bazơ không kết cặp. Trình tự của các phân tử ARN được thể hiện trong các trình tự SEQ ID NO: 74 - 76.

Trong mỗi phân tử ARN sợi đơn, chiều dài bazơ của vùng bên trong (Z) được thiết lập là 26; chiều dài bazơ của vùng (X) được thiết lập là 25, chiều dài bazơ của vùng (Y) được thiết lập là 1, chiều dài bazơ của vùng (Yc) được thiết lập là 1, chiều dài bazơ của vùng liên kết (Lx) được thiết lập là 7, và chiều dài bazơ của vùng liên kết (Ly) được thiết lập là 4. Tiếp đó, trong các điều kiện trên, chiều dài bazơ của vùng (Xc) được thay đổi. Do đó, trong mỗi phân tử ARN sợi đơn, sự có mặt và hoặc không có mặt của bazơ không kết cặp không tạo thành sợi kép và số lượng bazơ không kết cặp được thay đổi. NK-0001 có bazơ không kết cặp.

Quá trình chuyển nhiễm tế bào HCT116, nuôi cấy tế bào, thu gom ARN, tổng hợp ADN bổ trợ, và PCR được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A13, ngoại trừ việc sử dụng mỗi phân tử ARN nêu trên, và mức độ biểu hiện của gen GAPDH được xác định. Việc hiệu chỉnh bằng chất chuẩn nội và tính giá trị tương đối của mức độ biểu hiện cũng được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A13.

(2) Kết quả và bàn luận

Kết quả được thể hiện trên Fig.26. Fig.26 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH khi mỗi phân tử ARN được sử dụng với nồng độ cuối là 1 nmol/l. Như có thể thấy trên Fig.26, đã phát hiện được rằng tất cả các phân tử ARN sợi đơn có chiều dài vùng đầu 5'(Xc) khác nhau đều ức chế sự biểu hiện của gen GAPDH. Cụ thể, khi ARN sợi đơn có một bazơ không kết cặp, có thể cho rằng hoạt tính ức chế được cải thiện khi số lượng bazơ không kết cặp thấp hơn. Trong ví dụ A2, đã phát hiện được rằng NK-0016 có hoạt tính ức chế rất mạnh. Trong ví dụ này, đã phát hiện được rằng tất cả các phân tử ARN sợi đơn được sử dụng trong ví dụ này khác với NK-0016 đều có hoạt tính ức chế vượt trội so với hoạt tính ức chế của NK-0016.

Về số lượng bazơ không kết cặp, tác dụng tương tự như trong ví dụ này cũng thu

được trong ví dụ A8 trong đó gen được thử nghiệm (gen TGF- β 1) khác với gen được khảo sát trong ví dụ này. Nghĩa là trong ví dụ A8, như được thể hiện trong trình tự nêu trên, NK-0033 có một bazơ không kết cặp, và NK-0061 có hai bazơ không kết cặp. Như vậy, có thể thấy trên Fig.15, NK-0033 có số lượng bazơ không kết cặp ít hơn có hoạt tính ức chế cao hơn. Hơn nữa, NK-0055 và NK-0062 trong đó vị trí của bazơ không kết cặp được thay đổi càng gần với đầu 3' của vùng bên trong (Z) so với các bazơ không kết cặp trong NK-0033 và NK-0061 có hoạt tính ức chế cao như được mô tả trong ví dụ A12. Cũng từ các kết quả trên, rõ ràng là ARN sợi đơn theo sáng chế có hoạt tính tương tự bất kể loại gen đích và trình tự ức chế sự biểu hiện đối với gen đích. Do đó, có thể kết luận rằng ARN sợi đơn theo sáng chế là công cụ hữu hiệu bất kể loại gen đích.

Ví dụ A15: Khả năng thay đổi lẫn nhau của các vùng liên kết

Trên phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế, vùng liên kết (Lx) giữa vùng bên trong đầu 5' (X) và vùng đầu 5' (Xc) và vùng liên kết (Ly) giữa vùng bên trong đầu 3' (Y) và vùng đầu 3' (Yc) được thay đổi, và tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen GAPDH *in vitro* được thử nghiệm.

(1) Vật liệu và phương pháp

ARN sợi đơn được thể hiện trên Fig.27 được sử dụng làm ARN sợi đơn trong ví dụ này. Trên Fig.27, từ đầu 5', vùng được thể hiện bằng chữ thường gạch chân là vùng đầu 5' (Xc), vùng được thể hiện bằng chữ in gạch chân là vùng bên trong (Z), và vùng được thể hiện bằng chữ thường gạch chân là vùng đầu 3' (Yc). Trình tự giữa X và Xc là vùng liên kết (Lx), và trình tự giữa Y và Yc là vùng liên kết (Ly). Hơn nữa, đối với mỗi ARN, tỷ lệ (Lx/Ly) giữa chiều dài bazơ (Lx) của vùng liên kết (Lx) và chiều dài bazơ (Ly) của vùng liên kết (Ly) được thể hiện. Trên Fig.27, ký hiệu “*” để chỉ bazơ không kết cặp.

Quá trình chuyển nhiễm tế bào HCT116, nuôi cấy tế bào, thu gom ARN, tổng hợp ADN bổ trợ, và PCR được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A13, ngoại trừ việc sử dụng mỗi phân tử ARN nêu trên, và mức độ biểu hiện của gen GAPDH được xác định. Việc hiệu chỉnh bằng chất chuẩn nội và tính giá trị tương đối của mức

độ biểu hiện cũng được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A13.

(2) Kết quả và bàn luận

Các kết quả được thể hiện trên Fig.28. Fig.28 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH khi mỗi phân tử ARN được sử dụng với nồng độ cuối là 1 nmol/l. Như có thể thấy trên Fig.28, tất cả các phân tử ARN sợi đơn với các điều kiện khác nhau của vùng liên kết (Lx) và (Ly), nghĩa là về chiều dài, tỷ lệ giữa chiều dài, trình tự và các điều kiện tương tự được thay đổi, đều ức chế sự biểu hiện của gen GAPDH. Từ kết quả này, đã phát hiện được rằng điều kiện của vùng liên kết (Lx) và (Ly) không bị giới hạn một cách cụ thể, và chúng có thể được thiết kế để có chiều dài, trình tự và các đặc điểm tương tự khác nhau.

Ví dụ A16: Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen GAPDH trong tế bào HCT116

Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen GAPDH trong tế bào HCT116 được thử nghiệm bằng cách sử dụng ARN sợi đơn đã được thể bằng vùng liên kết có prolin hoặc prolinol.

(1) Vật liệu và phương pháp

ARN (Ex ssARN) được thể hiện dưới đây được tổng hợp làm phân tử ARN (Ex) trong ví dụ này. Hơn nữa, để làm ARN trong ví dụ so sánh, Nc ARN sợi đơn được thể hiện dưới đây được tổng hợp làm đối chứng âm can thiệp ARN (Nc). Trong mỗi trình tự sau, vùng liên kết (Lx) và vùng liên kết (Ly) được tạo ra bằng cách liên kết amidit có prolin hoặc prolinol được thể hiện trong bảng dưới đây (xem ví dụ B) giữa Xc và X và giữa Yc và Y.

Ex ARN sợi đơn (SEQ ID NO: 13)

5' - caugagaagauagacaacagcc - Lx - GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC - Ly - gaa - 3'
Xc Z Yc

Nc ARN sợi đơn (SEQ ID NO: 38)

5' - ccaaucaacgaauagugaaagcc - Lx - GGCUUUCACUUAUCGUUGAUGGCUUC - Ly - gaa - 3'
Xc Z Yc

Bảng 6

ARN sợi đơn		Amidit được sử dụng trong Lx và Ly
Ví dụ so sánh	Ví dụ	
PK-0003	PK-0004	L-prolin-di-amit-amidit (hợp chất có công thức 10 trong sơ đồ 3)
PK-0005	PK-0006	prolinol-uretan-amidit (hợp chất có công thức 6 trong sơ đồ 7)
PK-0009	PK-0010	prolin-amit-amin-amidit (hợp chất có công thức 12 trong sơ đồ 3)
PK-0011	PK-0012	prolin-amit-ureide-amidit (hợp chất có công thức 17 trong sơ đồ 3)
PK-0015	PK-0016	prolinol-ureide-amidit (hợp chất có công thức 7 trong sơ đồ 7)

Quá trình chuyển nhiễm tế bào HCT116, nuôi cấy tế bào, thu gom ARN, tổng hợp ADN bổ trợ, và PCR được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A13, ngoại trừ việc sử dụng mỗi phân tử ARN nêu trên, và mức độ biểu hiện của gen GAPDH được xác định. Việc hiệu chỉnh bằng chất chuẩn nội và tính giá trị tương đối của mức độ biểu hiện cũng được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A13.

(2) Kết quả

Các kết quả được thể hiện trên Fig.29. Fig.29 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH. Như có thể thấy trên Fig.29, đã phát hiện được rằng tất cả các Ex ARN sợi đơn có prolin hoặc prolinol làm vùng liên kết (Lx) và vùng liên kết (Ly) đều có hoạt tính ức chế mạnh, và chúng có hoạt tính ức chế theo cách phụ thuộc liều. Mặt khác, không quan sát được tác dụng ức chế khi ARN sợi đơn làm đối chứng âm được sử dụng.

Ví dụ A17: Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen GAPDH trong tế bào HCT116

Tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện của gen GAPDH trong tế bào HCT116

được thử nghiệm bằng cách sử dụng ARN sợi đơn đã được thể bằng vùng liên kết có prolin.

(1) Vật liệu và phương pháp

ARN (Ex ssARN) được thể hiện dưới đây được tổng hợp làm phân tử ARN (Ex) trong ví dụ này. Hơn nữa, để làm ARN trong ví dụ so sánh, Nc ARN sợi đơn được thể hiện dưới đây được tổng hợp làm đối chứng âm can thiệp ARN (Nc). Trong mỗi trình tự sau đây, vùng liên kết (Lx) và vùng liên kết (Ly) được tạo ra bằng cách liên kết amidit có prolin được thể hiện trong bảng dưới đây (xem ví dụ B) giữa Xc và X và giữa Yc và Y.

Ex ARN sợi đơn (SEQ ID NO: 13)



Nc ARN sợi đơn (SEQ ID NO: 38)



Bảng 7

ARN sợi đơn		Amidit được sử dụng trong Lx và Ly
Ví dụ so sánh	Ví dụ	
PK-0033	PK-0034	D-prolin-diamit-amidit (hợp chất có công thức 9 trong sơ đồ 3)
PK-0035	PK-0036	prolin-diamit-amidit (typ B) (hợp chất có công thức 22 trong sơ đồ 4)
PK-0003	PK-0004	L-prolin-diamit-amidit (hợp chất có công thức 10 trong sơ đồ 3)

Quá trình chuyển nhiễm tế bào HCT116, nuôi cấy tế bào, thu gom ARN, tổng hợp ADN bổ trợ, và PCR được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A13, ngoại trừ việc sử dụng mỗi phân tử ARN nêu trên, và mức độ biểu hiện của gen GAPDH

được xác định. Việc hiệu chỉnh bằng chất chuẩn nội và tính giá trị tương đối của mức độ biểu hiện cũng được tiến hành theo cách giống như trong ví dụ A13.

(2) Kết quả

Các kết quả được thể hiện trên Fig.30. Fig.30 là biểu đồ thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen GAPDH trong tế bào HCT116. Như có thể thấy trên Fig.30, Ex ARN sợi đơn có prolin làm vùng liên kết (Lx) và vùng liên kết (Ly) có hoạt tính ức chế mạnh và đã phát hiện được rằng có hoạt tính ức chế theo cách phụ thuộc liều. Mặt khác, không quan sát được tác dụng ức chế khi ARN sợi đơn đối chứng âm được sử dụng.

Ví dụ A18: Tính kháng ribonucleaza

Tính kháng ribonucleaza được thử nghiệm bằng cách sử dụng phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế.

(1) Vật liệu và phương pháp

NK-0033 trong ví dụ A5 và PK-0007 trong ví dụ A8 được sử dụng làm ARN sợi đơn trong ví dụ này. Hơn nữa, để làm ARN trong ví dụ so sánh, ARN sợi kép (NI-0030) trong ví dụ A9 được sử dụng làm đối chứng dương (Pc).

Trước tiên, 60 pmol của mỗi loại ARN trên đây, 5×10^{-5} đơn vị ARNaza A (Roche), và 5×10^{-5} đơn vị ARNaza T1 (Roche) được trộn lẫn với Tris-HCl 20 mmol/l (độ pH = 8), và hỗn hợp tạo thành được ủ ở nhiệt độ 37°C. Sau khi ủ 10 phút, 20 phút, và 30 phút, phản ứng của ARNaza được làm ngừng theo phương pháp thông thường. Sau đó, dung dịch phản ứng được điện di bằng cách sử dụng gel polyacrylamit 15%. Tiếp đó, gel được nhuộm bằng SYBR Green II (Lonza, Thụy Sĩ) và tiếp đó được phân tích bằng cách sử dụng E-BOX-VX2 (M & S Instruments Inc., Tokyo).

(2) Kết quả

Các kết quả được thể hiện trên Fig.31. Fig.31 là hình ảnh điện di thể hiện tính kháng ribonucleaza. Trên Fig.31, làn “M” thể hiện trọng lượng phân tử, và “phút” là thời gian ủ.

Như có thể thấy trên Fig.31, NI-0030 của ví dụ so sánh bị phân hủy gần như

hoàn toàn sau khi ủ 10 phút. Ngược lại, NK-0033 và PK-0007 của ví dụ này vẫn còn nguyên ngay cả sau khi ủ 10 phút. Các kết quả này chứng minh rằng ARN sợi đơn theo sáng chế có tính kháng ribonucleaza vượt trội so với ARN sợi kép.

Ví dụ A19: Tính kháng nucleaza

Tính kháng nucleaza được thử nghiệm bằng cách sử dụng phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế.

(1) Vật liệu và phương pháp

ARN giống như trong ví dụ A18 được sử dụng. Trước tiên, 60 pmol của mỗi ARN và 0,5 đơn vị S7 nucleaza (Roche) được trộn lẫn với Tris-HCl 50mmol/l (độ pH = 8) chứa CaCl_2 5 mmol/l, và hỗn hợp tạo thành được ủ ở nhiệt độ 37°C. 0,5 giờ sau khi ủ (0 giờ), phản ứng của S7 nucleaza được làm ngừng theo phương pháp thông thường. Sau đó, dung dịch phản ứng được tiến hành điện di bằng cách sử dụng ure 7M -gel polyacrylamit 15% theo phương pháp thông thường. Tiếp đó, gel được nhuộm bằng SYBR Green II (tên thương mại, Lonza) và sau đó được phân tích bằng cách sử dụng E-BOX-VX2 (tên thương mại, M & S Instruments Inc.).

(2) Kết quả

Các kết quả được thể hiện trên Fig.32. Fig.32 là hình ảnh điện di thể hiện tính kháng S7 nucleaza. Trên Fig.32, làn “M” thể hiện trọng lượng phân tử, và “giờ” là thời gian ủ.

Như có thể thấy trên Fig.32, NI-0030 của ví dụ so sánh bị phân hủy gần như hoàn toàn sau khi ủ 0,5 giờ. Ngược lại, NK-0033 và PK-0007 của ví dụ này vẫn còn nguyên ngay cả sau khi ủ 0,5 giờ. Các kết quả này chứng minh rằng ARN sợi đơn theo sáng chế có tính kháng S7 nucleaza vượt trội so với ARN sợi kép.

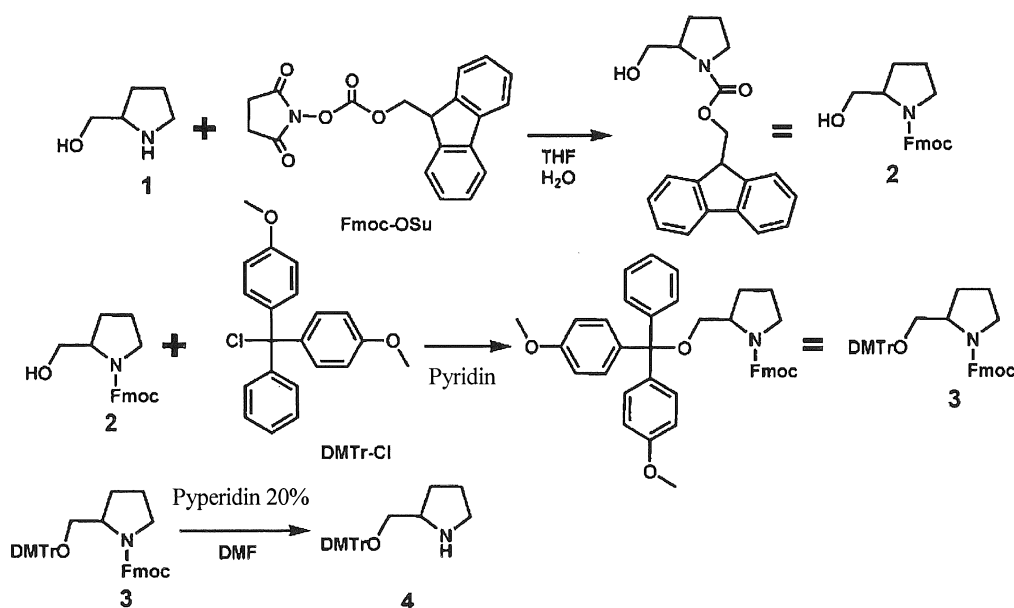
Từ các kết quả tương ứng thu được trong phần ví dụ A, đã phát hiện được rằng ARN sợi đơn theo sáng chế có thể được thiết kế bất kể loại gen đích. Cụ thể, đã phát hiện được rằng, trong phân tử ARN sợi đơn, có thể cải biến: chiều dài của sợi kép được

tạo ra bởi vùng (X) và (Xc) và chiều dài của sợi kép được tạo ra bởi vùng (Y) và (Yc); sự có mặt hoặc không có mặt của bazơ không kết cặp không tạo thành sợi kép ở vùng bên trong (Z), số lượng và vị trí của các bazơ không kết cặp; sự có mặt và không có mặt của vùng liên kết (Lx) và (Ly), loại và chiều dài của vùng liên kết (Lx) và (Ly); và các đặc điểm tương tự. Do đó, có thể kết luận rằng ARN sợi đơn theo sáng chế là công cụ linh hoạt mới có thể được sử dụng để ức chế sự biểu hiện của gen đích mà không phụ thuộc vào loại gen đích.

Ví dụ B1

1. Tổng hợp prolinol

Prolinol được bảo vệ bằng nhóm dimethoxytrityl được tổng hợp theo sơ đồ 1 dưới đây.



Sơ đồ 1

(1) Fmoc-L-prolinol (hợp chất có công thức 2)

L-prolinol (hợp chất có công thức 1) (0,61g, 6,0mmol) được hòa tan trong 70ml nước tinh khiết để thu được dung dịch nước L-prolinol. N-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide (Fmoc-OSu) (2,0g, 6,0mmol) được hòa tan trong 10ml THF. Dung dịch THF này được cho thêm vào dung dịch nước L-prolinol, và

hỗn hợp này được khuấy trong 1 giờ để L-prolinol phản ứng với Fmoc-OSu. Dung dịch phản ứng được tách thành phân đoạn lỏng và phân đoạn kết tủa. Các phân đoạn này lần lượt được chiết bằng etyl axetat, và các lớp hữu cơ tương ứng được thu gom. Các lớp hữu cơ thu được được trộn lẫn với nhau, và natri sulfat khan được thêm vào để hút ẩm (sau đây, quá trình này được gọi là quá trình “làm khô”). Lớp hữu cơ được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Phần cặn dư thu được được tinh chế bằng sắc ký cột trên silicagel (dung môi rửa giải là hexan: etyl axetat = 1: 1). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 2 (1,4g, hiệu suất 74%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,77 (2H, d, $J = 7,7$ Hz, Ar-H), 7,60 (2H, d, $J = 7,3$ Hz, Ar-H), 7,40 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, Ar-H), 7,31 (2H, t, $J = 7,6$ Hz, Ar-H), 4,40-4,50 (2H, m, COOCH_2), 4,22 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, Ar-CH), 3,20-3,80 (5H, m, H-5, H-6), 1,75 (3H, m, H-3, H-4), 1,40 (1H, m, H-3).

(2) Fmoc-DMTr-L-prolinol (hợp chất có công thức 3)

Fmoc-L-prolinol (hợp chất có công thức 2) (1,4g, 4,3mmol) được hòa tan trong 20ml pyridin và được làm đồng sôi ba lần. Phần cặn dư thu được được hòa tan trong 20ml pyridin. Trong khi khuấy dung dịch này trong bể nước đá trong môi trường argon, hợp chất 4,4'-dimethoxytrityl clorua (DMTr-Cl) (1,8g, 5,3mmol) được thêm vào. Phản ứng trong dung dịch phản ứng này được theo dõi bằng phương pháp TLC bằng cách sử dụng clorofom/metanol, và phản ứng được để diễn ra trong 4 giờ cho đến khi không còn quan sát được vết Fmoc-L-prolinol. Để làm ngừng phản ứng, lượng dư DMTr-Cl, 3ml metanol được cho thêm vào dung dịch phản ứng, và dung dịch này được khuấy trong 10 phút. Clorofom được cho thêm tiếp vào dung dịch phản ứng, và sau đó lớp hữu cơ được thu gom. Lớp hữu cơ thu được được rửa bằng nước muối bão hòa, sau đó rửa bằng dung dịch natri hydrocacbonat 5% trong nước, và rửa lại bằng nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ vừa rửa được làm khô bằng natri sulfat khan. Sau đó, lớp hữu cơ được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Phần cặn dư thu được được tinh chế bằng sắc ký cột trên silicagel (dung môi rửa giải là clorofom, pyridin 1%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 3 (2,0g, hiệu suất 74%). Kết quả phân tích NMR của

hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,77 (2H, d, $J = 7,7$ Hz, Ar-H), 7,60 (2H, d, $J = 7,3$ Hz, Ar-H), 7,40-7,18 (13H, m, Ar-H), 6,89 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 4,20-4,40 (2H, m, COOCH_2), 4,02 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, Ar-CH), 3,80-3,10 (5H, m, H-5, H-6), 3,73 (s, 6H, OCH_3), 1,84 (3H, m, H-3, H-4), 1,58 (1H, m, H-3).

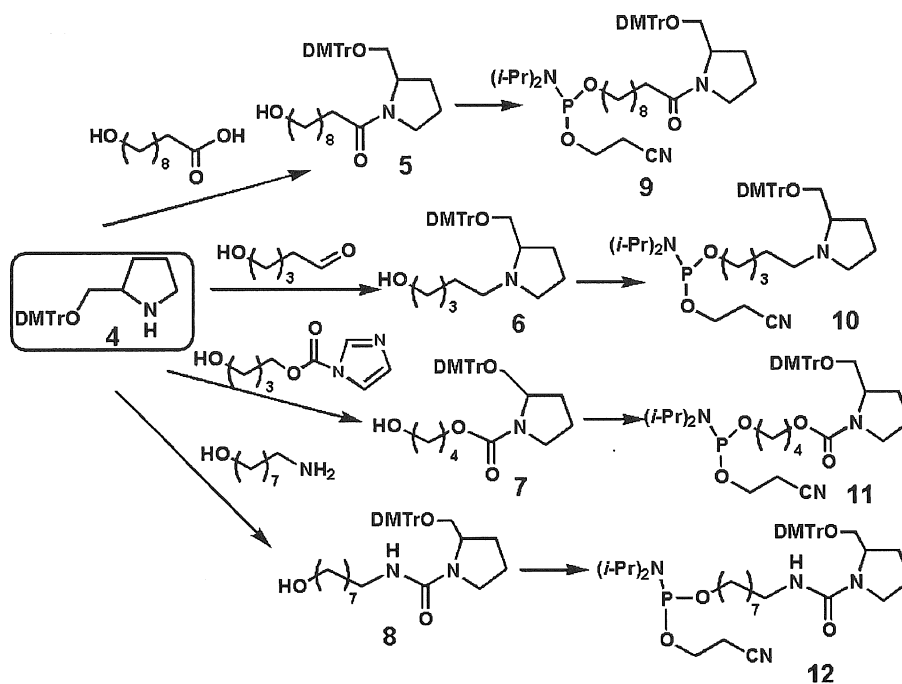
(3) DMTr-L-prolinol (hợp chất có công thức 4)

Fmoc-DMTr-L-prolinol (hợp chất có công thức 3) (2,0g, 3,2mmol) được hòa tan trong 25ml dung dịch DMF chứa piperidin 20%, và hỗn hợp được khuấy trong 12 giờ. Dung dịch được cô trong chân không, và phần cặn dư thu được được tinh chế bằng sắc ký cột trên silicagel (clorofom:metanol = 85:15, chứa pyridin 1%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 4 (1,0g, hiệu suất 78%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,31 (1H, m, H-6), 3,07 (2H, m, H-2, H-6), 2,90 (2H, m, H-5), 1,84 (3H, m, H-3, H-4), 1,40 (1H, m, H-3).

2. Tổng hợp dẫn xuất amidit

Tiếp theo, dẫn xuất amidit có prolinol được tổng hợp theo sơ đồ 2 dưới đây. Sau đây, hợp chất 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydroclorua được gọi là “EDC”, và N, N-dimethylaminopyridin (4-dimethylaminopyridin) được gọi là “DMAP”.



Sơ đồ 2

(1) DMTr-amit-L-prolinol (hợp chất có công thức 5)

DMTr-L-prolinol (hợp chất có công thức 4) (0,80g, 2,0mmol), EDC (0,46g, 2,4mmol), và DMAP (0,29g, 2,4mmol) được hòa tan trong 20ml diclometan, và sau đó hỗn hợp này được khuấy. Axit 10-hydroxydecanoic (0,45g, 2,4mmol) được cho thêm vào dung dịch này, và tiếp đó hỗn hợp được khuấy. Phản ứng trong dung dịch phản ứng được theo dõi bằng phương pháp TLC bằng cách sử dụng etyl axetat, và phản ứng được để diễn ra trong 20 giờ cho đến khi không còn quan sát được vết DMTr-L-prolinol. Sau đó, diclometan được cho thêm vào dung dịch phản ứng, và lớp hữu cơ được thu gom. Lớp hữu cơ thu được được rửa bằng nước muối bão hòa, và sau đó được làm khô bằng natri sulfat khan. Lớp hữu cơ được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Phần cặn dư được tinh chế bằng cách sắc ký cột trên silicagel (etyl axetat, chứa pyridin 1%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 5 (0,71g, hiệu suất 62%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,68-2,93 (7H, m, H-2, H-5, H-6), 2,27-1,72 (6H, m, alkyl, H-3, H-4), 1,58 (4H, s, alkyl), 1,30 (10H, s, alkyl).

(2) DMTr-alkyl-L-prolinol (hợp chất có công thức 6)

DMTr-L-prolinol (hợp chất có công thức 4) (0,80g, 2,0mmol) được hòa tan trong 15ml metanol. 5-hydroxypentanal (0,31g, 3,0mmol) được thêm vào, và sau đó hỗn hợp này được khuấy. Natri xyanoborohydrua (0,25g, 4,0mmol) được thêm vào dung dịch này, và hỗn hợp được khuấy tiếp. Phản ứng trong dung dịch phản ứng được theo dõi bằng phương pháp TLC bằng cách sử dụng ethyl axetat/hexan, và phản ứng được để diễn ra trong 24 giờ cho đến khi không còn quan sát được vết DMTr-L-prolinol. Ethyl axetat được cho thêm vào dung dịch phản ứng, và lớp hữu cơ được thu gom. Lớp hữu cơ thu được được rửa bằng nước muối bão hòa, và sau đó được làm khô bằng natri sulfat khan. Lớp hữu cơ được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Phần cặn dư được tinh chế bằng cách sắc ký cột trên silicagel (hexan:ethyl axetat = 1:1, chứa pyridin 1%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 6 (0,62g, hiệu suất 63%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,70-2,86 (4H, m, CH_2OH , H-6), 2,06-1,79 (5H, m, alkyl, H-2, H-5), 1,74-1,49 (6H, m, alkyl, H-3, H-4), 1,45-1,27 (4H, m, alkyl).

(3) DMTr-uretan-L-prolinol (hợp chất có công thức 7)

1,4-butan diol (0,90g, 10mmol) được hòa tan trong 30ml diclometan. Cacbonyldiimidazol (1,4g, 8,6mmol) được thêm tiếp vào, và hỗn hợp được khuấy trong 3 giờ. Lớp hữu cơ trong dung dịch phản ứng được rửa bằng nước muối bão hòa, và sau đó được làm khô bằng natri sulfat khan. Lớp hữu cơ được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Phần cặn dư được tinh chế bằng cách sắc ký cột trên silicagel (clorofom:metanol = 9:1). Nhờ đó, thu được hợp chất trong đó một đầu của hợp chất 1,4-butan diol được hoạt hóa bằng cacbonyldiimidazol (0,25g, 1,5mmol). Hợp chất này được hòa tan trong 15ml diclometan. DMTr-L-prolinol (hợp chất có công thức 4) (0,6g, 1,5mmol) được thêm vào, và hỗn hợp này được khuấy trong 24 giờ. Ethyl axetat được cho thêm tiếp vào hỗn hợp, và lớp hữu cơ được thu gom. Lớp hữu cơ thu được được rửa bằng nước muối bão hòa, và sau đó được làm khô bằng natri sulfat khan. Lớp hữu cơ được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Phần cặn

được tinh chế bằng cách sắc ký cột trên silicagel (hexan:etyl axetat = 1:1, chứa pyridin 1%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 7 (0,61g, hiệu suất 77%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH_2), 3,78 (s, 6H, OCH_3), 3,72-2,96 (7H, m, alkyl, H-2, H-5, H-6), 2,10-1,30 (8H, m, alkyl, H-3, H-4).

(4) DMTr-ureido-L-prolinol (hợp chất có công thức 8)

DMTr-L-prolinol (hợp chất có công thức 4) (0,50g, 1,2mmol) và triphosgen (0,12g, 0,40mmol) được hòa tan trong 8ml diclometan, và hỗn hợp tạo thành được khuấy trong bể nước đá trong môi trường argon. Hợp chất N,N-diisopropyletylamin (0,31g, 2,4mmol) được cho thêm vào dung dịch, và hỗn hợp này được khuấy trong 1 giờ. Sau đó, 8-amino-1-octanol (0,17g, 1,2mmol) được cho thêm tiếp vào, và hỗn hợp được khuấy trong 30 phút trong bể nước đá theo cách giống như trên đây. Sau đó, hỗn hợp được khuấy tiếp ở nhiệt độ phòng trong 20 giờ. Diclometan được cho thêm vào dung dịch, và lớp hữu cơ được thu gom. Lớp hữu cơ thu được được rửa bằng nước muối bão hòa, và sau đó được làm khô bằng natri sulfat khan. Lớp hữu cơ được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Phần cặn dư được tinh chế bằng cách sắc ký cột trên silicagel (hexan:etyl axetat = 4:1, chứa trietylamin 1%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 8 (0,44g, hiệu suất 62%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH_3), 3,68-3,25 (9H, m, CH_2NH , CH_2OH , H-2, H-5, H-6), 1,74-1,18 (16H, m, alkyl, H-3, H-4).

(5) Dẫn xuất amidit có prolinol (hợp chất có công thức từ 9 đến 12)

Hợp chất có công thức từ 9 đến 12 được tổng hợp theo cách sau đây bằng cách sử dụng lần lượt các hợp chất prolinol được cải biến (hợp chất có công thức từ 5 đến 8) làm nguyên liệu. Mỗi hợp chất prolinol được cải biến và 5-benzylthio-1H-tetrazol được hòa tan trong 3ml axetonitril. Lượng prolinol được cải biến được sử dụng là như sau:

hợp chất có công thức 5: 0,69g (1,2mmol); hợp chất có công thức 6: 0,60g (1,2mmol); hợp chất có công thức 7: 0,60g (1,2mmol); và hợp chất có công thức 8: 0,25g (0,43mmol). Lượng hợp chất 5-benzylthio-1H-tetrazol được sử dụng là: 0,15g (0,78mmol) đối với các hợp chất có công thức từ 5 đến 7; và 54mg (0,15mmol) đối với hợp chất có công thức 8. Trong môi trường argon, hợp chất 2-xyanoethyl N,N,N',N'-tetraisopropyl phosphorodiamidit được cho thêm vào dung dịch, và hỗn hợp này được khuấy trong 2 giờ. Lượng hợp chất 2-xyanoethyl N,N,N',N'-tetraisopropyl phosphorodiamidit được thêm vào là: 0,54g (1,8mmol) trong hệ phản ứng sử dụng các hợp chất có công thức từ 5 đến 7; và 0,19g (0,64mmol) trong hệ phản ứng sử dụng hợp chất có công thức 8. Sau đó, dung dịch natri hydrocacbonat bão hòa được cho thêm vào dung dịch, và lớp hữu cơ được chiết bằng diclometan và được thu gom. Lớp hữu cơ thu được được làm khô bằng natri sulfat khan. Lớp hữu cơ này được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Phần cặn dư được tinh chế bằng cách sắc ký cột trên silicagel (hexan: etyl axetat = 1: 1, chứa triethylamin 1%). Nhờ đó, thu được các hợp chất có công thức từ 9 đến 12. Kết quả phân tích NMR của các hợp chất này được thể hiện dưới đây.

DMTr-amit-L-prolinol amidit (hợp chất có công thức 9, 0,60g, hiệu suất 55%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,68-2,93 (11H, m, CH_2O , POCH_2 , CHCH_3 , H-2, H-5, H-6), 2,58 (2H, m, CH_2CN), 2,27-1,72 (6H, m, alkyl, H-3, H-4), 1,58 (4H, s, alkyl), 1,30 (22H, s, alkyl, CHCH_3).

DMTr-alkyl-L-prolinol amidit (hợp chất có công thức 10, 0,71g, hiệu suất 60%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,70-2,86 (8H, m, CH_2O , POCH_2 , CHCH_3 , H-6), 2,58 (2H, m, CH_2CN), 2,06-1,79 (5H, m, alkyl, H-2, H-5), 1,74-1,49 (6H, m, alkyl, H-3, H-4), 1,37-1,10 (16H, m, alkyl, CHCH_3).

DMTr-uretan-L-prolinol amidit (hợp chất có công thức 11, 0,67g, hiệu suất 52%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H),

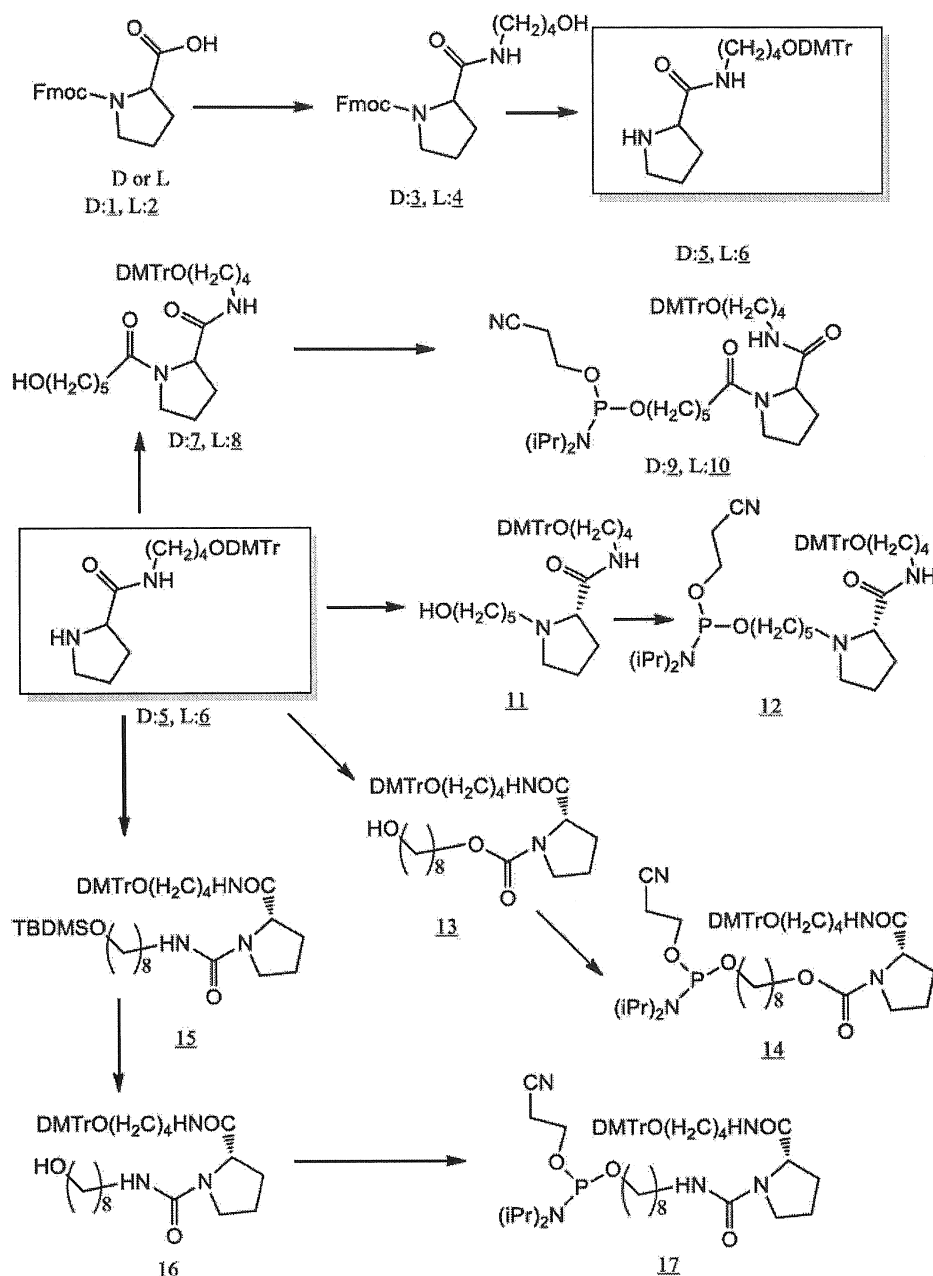
4,24-3,94 (2H, m, COOCH₂), 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,72-2,96 (11H, m, CH₂O, POCH₂, CHCH₃, H-2, H-5, H-6), 2,58 (2H, m, CH₂CN), 2,10-1,46 (8H, m, alkyl, H-3, H-4), 1,34-1,10 (12H, m, CHCH₃).

DMTr-ureido-L-prolinol amidit (hợp chất có công thức 12, 0,20g, hiệu suất 61%)

¹H-NMR (CDCl₃): δ7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,65-3,25 (13H, m, CH₂O, POCH₂, CHCH₃, H-2, CH₂NH, CH₂OH, H-2, H-5, H-6), 2,73 (2H, m, CH₂CN), 2,10-1,48 (16H, m, alkyl, H-3, H-4), 1,35-1,10 (12H, m, CHCH₃).

Ví dụ B2

Tiếp theo, dẫn xuất amidit có L-prolin được tổng hợp theo sơ đồ 3 dưới đây.



Sơ đồ 3

(1) DMTr-hydroxy amit amino-L-prolin (hợp chất có công thức 11)

Chất đệm axit axetic (7ml) được cho thêm vào dung dịch ethanol (7ml) chứa DMTr-amit-L-prolin (hợp chất có công thức 6) (1,00g, 2,05mmol) và 5-hydroxypentanal (0,33g, 3,07mmol) trong khi làm lạnh bằng nước đá. Hỗn hợp tạo thành được khuấy trong 20 phút trong khi làm lạnh bằng nước đá. Sau đó, natri cyanobo (0,77g, 12,28mmol) được cho thêm tiếp vào, và hỗn hợp được khuấy trong 7

giờ ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được pha loãng bằng diclometan, rửa bằng nước, và sau đó rửa tiếp bằng nước muối bão hòa. Tiếp đó, lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfat. Lớp hữu cơ này được lọc, và dung môi trong phần nước lọc tạo thành được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột trên silicagel (dung môi rửa giải là $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 98:2$, chứa pyridin 0,05%). Sau đó, sản phẩm thu được được sắc ký cột trên silicagel (dung môi rửa giải là $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 98:2$, chứa pyridin 0,05%), và sản phẩm thu được tiếp tục được sắc ký cột trên silica gel (dung môi rửa giải là diclometan:axeton = 7:3, chứa pyridin 0,05%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 11 ở dạng xi-rô không màu (0,49g, hiệu suất 41%).

Ms (FAB+): m/z 575 (M^+), 303 (DMTr^+)

(2) DMTr-amit amino-L-prolin amidit (hợp chất có công thức 12)

Hợp chất DMTr-hydroxy amit amino-L-prolin (hợp chất có công thức 11) (0,50g, 0,87mmol) thu được được trộn lẫn với axetonitril khan, và hỗn hợp này được làm khô đồng sôi ở nhiệt độ trong phòng. Phần cặn dư thu được được cho thêm diisopropylamoni tetrazolit (178mg, 1,04mmol). Hỗn hợp tạo thành được loại không khí dưới áp suất giảm và sục khí argon. Axetonitril khan (1ml) được cho thêm vào hỗn hợp, và dung dịch 2-xyanoetoxy-N,N,N',N'-tetraisopropyl phosphorodiamidit (313mg, 1,04mmol) trong axetonitril khan (1ml) được cho thêm tiếp vào hỗn hợp. Hỗn hợp này được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Sau đó, hỗn hợp này được pha loãng bằng diclometan, và được rửa bằng nước natri bicacbonat bão hòa và tiếp đó rửa bằng muối bão hòa. Lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfat. Sau đó, lớp hữu cơ được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột bằng cách sử dụng amino silic oxit làm chất độn (dung môi rửa giải là hexan:axeton = 7:3, chứa pyridin 0,05%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 12 ở dạng xi-rô không màu (0,57g, độ tinh khiết 93%, hiệu suất 79%). Độ tinh khiết được xác định bằng phương pháp HPLC. Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,28-7,32 (m, 4H, Ar-H), 7,25-7,27 (m, 2H, Ar-H), 7,18-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,84 (m, 4H, Ar-H), 3,73-3,84 (m, 1H), 3,79 (s, 6H, OCH_3), 3,47-3,64 (m, 3H), 3,12-3,26 (m, 2H), 3,05 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH_2), 2,98-2,02 (m, 2H), 2,61 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H, CH_2), 2,55-2,63 (m, 2H), 2,27-2,42 (m, 1H, CH), 2,31 (t, 7,8 Hz, 2H, CH_2), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,40-1,90 (m, 8H), 1,23-1,33 (m, 5H), 1,14-1,20 (m, 12H, CH_3);

P-NMR (CDCl_3): δ 146,91;

Ms (FAB+): m/z 774 (M^+), 303 (DMTr^+), 201 ($\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{OP}^+$).

(3) DMTr-hydroxy amit carbamoyl-L-prolin (hợp chất có công thức 13)

Dung dịch axetonitril khan (20ml) trong đó hợp chất 1-imidazo cacbonyloxy-8-hydroxyoctan (1,12g, 4,92mmol) đã hòa tan được cho thêm vào dung dịch axetonitril khan (10ml) trong đó hợp chất DMTr-amit-L-prolin (hợp chất có công thức 6) (1,00g, 2,05mmol) đã hòa tan, ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Hỗn hợp này được gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong 2 ngày, và sau đó được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 5 ngày. Dung môi trong hỗn hợp được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột trên silicagel (dung môi rửa giải là diclometan:axeton = 4:1, chứa pyridin 0,05%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 13 ở dạng xi-rô không màu (0,68g, hiệu suất 50%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,40-7,42 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 6H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,79-6,82 (m, 4H, Ar-H), 4,23-4,30 (m, 1H), 4,05-4,10 (m, 2H), 3,79 (s, 6H, OCH_3), 3,60-3,65 (m, 2H), 3,32-3,55 (m, 2H), 3,16-3,29 (m, 2H), 3,01-3,07 (m, 2H), 2,38-2,40 (m, 1H, CH), 1,83-1,90 (m, 2H), 1,57-1,69 (m, 8H), 1,26-1,36 (m, 2H);

Ms (FAB+): m/z 602 (M^+), 303 (DMTr^+).

(4) DMTr-amit carbamoyl-L-prolin amidit (hợp chất có công thức 14)

DMTr-hydroxy amit carbamoyl-L-prolin thu được (hợp chất có công thức 13) (0,63g, 1,00mmol) được trộn lẫn với pyridin khan, và hỗn hợp tạo thành được làm khô

đồng sôi ở nhiệt độ trong phòng. Diisopropylamoni tetrazolit (206mg, 1,20mmol) được cho thêm vào phần cặn dư thu được, và hỗn hợp tạo thành được loại không khí dưới áp suất giảm và được sục khí argon. Axetonitril khan (1ml) được cho thêm vào hỗn hợp, và dung dịch 2-xyanoetoxy-N,N,N',N'-tetraisopropyl phosphorodiamidit (282mg, 1,12mmol) trong axetonitril khan (1ml) được cho thêm tiếp vào. Hỗn hợp này được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Sau đó, hỗn hợp được pha loãng bằng diclometan, và được rửa bằng nước natri bicacbonat bão hòa và sau đó rửa bằng nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfat. Sau đó, lớp hữu cơ được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột bằng cách sử dụng amino silic oxit làm chất độn (dung môi rửa giải là hexan:axeton = 7:3, chứa pyridin 0,5%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 14 ở dạng xi-rô không màu (0,74g, độ tinh khiết 100%, hiệu suất 87%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

P-NMR (CDCl₃): δ 147,19;

Ms (FAB+): m/z 860 (M⁺), 303 (DMTr⁺), 201 (C₈H₁₉N₂OP⁺).

(5) DMTr-t-butyl dimetyl siloxy amit ureido-L-prolin (hợp chất có công thức 15)

Dung dịch tetrahydrofuran khan (10ml) được cho thêm vào triphosgen (1,22g, 4,10mmol) trong khi làm lạnh bằng nước đá trong môi trường argon. Dung dịch tetrahydrofuran khan (10ml) trong đó DMTr-amit-L-prolin (hợp chất có công thức 6) (1,00g, 2,05mmol) và DIEA (9,80g, 75,8mmol) đã hòa tan được cho thêm nhỏ giọt vào hỗn hợp này trong khi làm lạnh bằng nước đá trong môi trường argon trong 30 phút. Sau đó, hỗn hợp này được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch 10-amino-1-t-butyl dimetyl siloxy decan (2,66g, 10,25mmol) và DIEA (3,20g, 24,76mmol) trong tetrahydrofuran khan (20ml) được cho thêm nhỏ giọt vào hỗn hợp trong khi làm lạnh bằng nước đá trong môi trường argon trong 45 phút. Sau đó, hỗn hợp này được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Hỗn hợp này được pha loãng bằng etyl axetat (200ml), và lớp hữu cơ được thu gom. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước natri bicacbonat bão hòa và sau đó được rửa tiếp bằng nước muối bão hòa. Tiếp

đó, lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfat. Lớp hữu cơ này được lọc, và dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột trên silica gel (dung môi rửa giải là diclometan:axeton = 4:1, chứa pyridin 0,05%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 15 ở dạng xi-rô không màu (0,87g, hiệu suất 55%).

(6) DMTr-hydroxy amit ureido-L-prolin (hợp chất có công thức 16)

DMTr-t-butyl dimetyl siloxy amit ureido-L-prolin (hợp chất có công thức 15) (0,87g, 1,12mmol) được cho thêm dung dịch diclometan tetrahydrofuran khan (10ml) ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Sau đó, hỗn hợp được cho thêm dung dịch tetrahydrofuran chứa tetrabutylamoni florua 1mol/l (4,69ml, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.), và hỗn hợp này được khuấy trong 3 ngày ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Hỗn hợp được pha loãng bằng diclometan (150ml), và được rửa bằng nước và sau đó rửa tiếp bằng nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfat. Sau đó, lớp hữu cơ này được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột trên silicagel (dung môi rửa giải là diclometan:axeton = 1:1, chứa pyridin 0,05%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 16 ở dạng xi-rô không màu (0,68g, hiệu suất 92%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 4H, Ar-H), 7,19-7,26 (m, 2H, Ar-H), 7,19-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,83 (m, 4H, Ar-H), 4,34 (t, 2H, CH_2), 3,79 (s, 6H, OCH_3), 3,63 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz, CH_2), 3,61 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz, CH_2), 3,34-3,37 (m, 1H, CH), 3,16-3,27 (m, 5H), 3,04 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H, CH_2), 2,38-2,45 (m, 1H, CH), 1,83-2,05 (m, 3H), 1,45-1,64 (m, 8H), 1,25-1,38 (m, 7H).

(7) DMTr-amit ureido-L-prolin amidit (hợp chất có công thức 17)

DMTr-hydroxy amit ureido-L-prolin (hợp chất có công thức 16) (0,62g, 0,94mmol) được trộn lẫn với axetonitril khan, và hỗn hợp tạo thành được làm khô đồng sôi ở nhiệt độ trong phòng. Diisopropylamoni tetrazolit (192mg, 1,12mmol) được cho

thêm vào phần cặn dư thu được, và hỗn hợp tạo thành được loại không khí dưới áp suất giảm và được sục khí argon. Axetonitril khan (1ml) được cho thêm vào hỗn hợp, và dung dịch 2-cyanoetoxy-N,N,N',N'-tetraisopropyl phosphorodiamidit (282mg, 1,12mmol) trong axetonitril khan (1ml) được cho thêm tiếp vào. Hỗn hợp này được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Sau đó, hỗn hợp được pha loãng bằng diclometan, và được rửa bằng nước natri bicacbonat bão hòa và sau đó rửa bằng nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfat. Sau đó, lớp hữu cơ này được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột bằng cách sử dụng amino silic oxit làm chất độn (dung môi rửa giải là hexan:axeton = 1:1, chứa pyridin 0,05%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 17 ở dạng xi-rô không màu (0,77g, độ tinh khiết 88%, hiệu suất 84%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

¹H-NMR (CDCl₃): δ147,27;

Ms (FAB⁺): m/z 860 (M⁺+1), 303 (DMTr⁺), 201 (C₈H₁₉N₂OP⁺).

Ví dụ B3: Tổng hợp prolin-diamit-amidit

Để sản xuất phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm vùng liên kết có khung prolin, L-prolin-diamit-amidit và D-prolin-diamit-amidit được tổng hợp theo sơ đồ 3.

(B3-1) L-prolin-diamit-amidit

(1) Fmoc-hydroxy amit-L-prolin (hợp chất có công thức 4)

Hợp chất có công thức 2 (Fmoc-L-prolin) trong sơ đồ 3 được sử dụng làm nguyên liệu. Hợp chất có công thức 2 (10,00g, 29,64mmol), 4-amino-1-butanol (3,18g, 35,56mmol), và 1-hydroxybenzotriazol (10,90g, 70,72mmol) được trộn lẫn với nhau. Hỗn hợp này được loại không khí dưới áp suất giảm và được sục khí argon. Axetonitril khan (140ml) được cho thêm vào hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng, và dung dịch dicyclohexylcarbodiimide (7,34g, 35,56mmol) trong axetonitril khan (70ml) được thêm tiếp vào. Sau đó, hỗn hợp được khuấy trong 15 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Sau khi phản ứng kết thúc, phần kết tủa được loại bỏ bằng cách lọc, và

dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Diclometan (200ml) được cho thêm vào phần cặn dư thu được, và hỗn hợp được rửa bằng nước natri bicacbonat bão hòa (200ml). Sau đó, lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng magie sulfat. Tiếp đó, lớp hữu cơ này được lọc, và dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Diethyl ete (200ml) được cho thêm vào phần cặn dư, nhờ đó biến đổi phần cặn dư thành dạng bột. Bột thu được thu gom bằng cách lọc. Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 4 ở dạng bột không màu (10,34g, hiệu suất 84%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,76-7,83 (m, 2H, Ar-H), 7,50-7,63 (m, 2H, Ar-H), 7,38-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,28-7,33 (m, 2H, Ar-H), 4,40-4,46 (m, 1H, CH), 4,15-4,31 (m, 2H, CH_2), 3,67-3,73 (m, 2H, CH_2), 3,35-3,52 (m, 2H, CH_2), 3,18-3,30 (m, 2H, CH_2), 2,20-2,50 (m, 4H), 1,81-2,03 (m, 3H), 1,47-1,54 (m, 2H);

$\text{Ms (FAB+): m/z 409 (M+H}^+)$.

(2) DMTr-amit-L-prolin (hợp chất có công thức 6)

Fmoc-hydroxy amit-L-prolin (hợp chất có công thức 4) (7,80g, 19,09mmol) được trộn với pyridin khan (5ml), và hỗn hợp tạo thành được làm khô đồng sôi hai lần ở nhiệt độ trong phòng. Cho thêm 4,4'-dimetoxytiryl clorua (8,20g, 24,20mmol), DMAP (23mg, 0,19mmol), và pyridin khan (39ml) vào phần cặn dư thu được. Hỗn hợp này được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, metanol (7,8ml) được cho thêm vào, và hỗn hợp được khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được pha loãng bằng diclometan (100ml), và rửa bằng nước natri bicacbonat bão hòa (150ml). Sau đó, lớp hữu cơ được tách ra. Lớp hữu cơ này được làm khô bằng natri sulfat, và sau đó được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Dimetylformamit khan (39ml) và piperidin (18,7ml, 189mmol) được cho thêm vào phần cặn dư chưa được tinh chế thu được, và hỗn hợp được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi phản ứng kết thúc, dung môi trong hỗn hợp được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ trong phòng. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột trên silicagel (tên thương mại:

Wakogel C-300, dung môi rửa giải là $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 9:1$, chứa pyridin 0,05%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 6 ở dạng dầu màu vàng nhạt (9,11g, hiệu suất 98%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,39-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,30 (d, $J = 8,8$ Hz, 4H, Ar-H), 7,21 (tt, 1H, 4,9, 1,3 Hz, Ar-H), 6,81 (d, $J = 8,8$ Hz, 4H, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH_3), 3,71 (dd, H, $J = 6,3$ Hz, 5,4 Hz, CH), 3,21 (2H, 12,9, 6,3 Hz, 2H, CH_2), 3,05 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH_2), 2,85-2,91 (m, 2H, CH_2), 2,08-2,17 (m, 1H, CH), 1,85-2,00 (m, 3H), 1,55-1,65 (m, 5H):

Ms (FAB+); m/z 489 ($\text{M}+\text{H}^+$), 303 (DMTr^+).

(3) DMTr-hydroxy diamit-L-prolin (hợp chất có công thức 8)

Dung dịch diclometan khan được điều chế bằng cách trộn lẫn DMTr-amit-L-prolin (hợp chất có công thức 6) (6,01g, 12,28mmol), EDC (2,83g, 14,74mmol), 1-hydroxybenzotriazol (3,98g, 29,47mmol), và triethylamin (4,47g, 44,21mmol) trong diclometan khan (120ml). Axit 6-hydroxyhexanoic (1,95g, 14,47mmol) được cho thêm tiếp vào dung dịch này ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon, và hỗn hợp được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Hỗn hợp được pha loãng bằng diclometan (600ml), và được rửa ba lần bằng nước muối bão hòa (800ml). Sau đó, lớp hữu cơ được thu gom. Lớp hữu cơ này được làm khô bằng natri sulfat, và sau đó được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 8 ở dạng bột màu vàng nhạt (6,29g, hiệu suất 85%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 4H, Ar-H), 7,19-7,26 (m, 2H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,79-6,82 (m, 4H, Ar-H), 4,51-4,53 (m, 1H, CH), 3,79 (s, 6H, OCH_3), 3,61 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz, CH_2), 3,50-3,55 (m, 1H, CH), 3,36-3,43 (m, 1H, CH), 3,15-3,24 (m, 2H, CH_2), 3,04 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH_2), 2,38-2,45 (m, 1H, CH), 2,31 (t, 6,8 Hz, 2H, CH_2), 2,05-2,20 (m, 1H, CH), 1,92-2,00 (m, 1H, CH), 1,75-1,83 (m, 1H, CH), 1,48-1,71 (m, 8H), 1,35-1,44 (m, 2H, CH_2);

Ms (FAB⁺): m/z 602 (M⁺), 303 (DMTr⁺).

(4) DMTr-diamit-L-prolin amidit (hợp chất có công thức 10)

DMTr-hydroxy diamit-L-prolin (hợp chất có công thức 8) (8,55g, 14,18mmol) được trộn lẫn với axetonitril khan, và hỗn hợp tạo thành được làm khô đồng sôi ba lần ở nhiệt độ trong phòng. Cho thêm diisopropylamoni tetrazolit (2,91g, 17,02mmol) vào phần cặn dư thu được. Hỗn hợp tạo thành được loại không khí dưới áp suất giảm và được sục khí argon. Axetonitril khan (10ml) được cho thêm vào hỗn hợp, và dung dịch 2-xyanoetoxy-N,N,N',N'-tetraisopropyl phosphorodiamidit (5,13g, 17,02mmol) trong axetonitril khan (7ml) được cho thêm tiếp vào. Hỗn hợp này được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Sau đó, hỗn hợp được pha loãng bằng diclometan, và được rửa bằng nước natri bicacbonat bão hòa (200ml) ba lần và sau đó rửa bằng nước muối bão hòa (200ml). Lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfat. Sau đó, lớp hữu cơ này được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột bằng cách sử dụng amino silica gel làm chất độn (dung môi rửa giải là hexan:etyl axetat = 1:3, chứa pyridin 0,05%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 10 ở dạng xi-rô không màu (10,25g, độ tinh khiết 92%, hiệu suất 83%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

¹H-NMR (CDCl₃): δ7,40-7,42 (m, 2H, Ar-H), 7,29-7,31 (m, 4H, Ar-H), 7,25-7,27 (m, 2H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,82 (m, 4H, Ar-H), 4,51-4,53 (m, 1H, CH), 3,75-3,93 (m, 4H), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 3,45-3,60 (m, 4H), 3,35-3,45 (m, 1H, CH), 3,20-3,29 (m, 1H), 3,04 (t, J = 6,4 Hz, 2H, CH₂), 2,62 (t, J = 5,8 Hz, 2H, CH₂), 2,40-2,44 (m, 1H, CH), 2,31 (t, 7,8 Hz, 2H, CH₂), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,92-2,02 (m, 1H, CH), 1,70-1,83 (m, 1H, CH), 1,51-1,71 (m, 8H), 1,35-1,44 (m, 2H, CH₂), 1,18 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH₃), 1,16 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH₃);

P-NMR (CDCl₃): Msδ147,17;

Ms (FAB⁺): m/z 802 (M⁺), 303 (DMTr⁺), 201 (C₈H₁₉N₂OP⁺).

(B3-2) D-prolin-diamit-amidit

(1) Fmoc-hydroxy amit-D-prolin (hợp chất có công thức 3)

Hợp chất có công thức 1 (Fmoc-D-prolin) trong sơ đồ 3 được sử dụng làm nguyên liệu. Hỗn hợp của hợp chất có công thức 1 (1,5g, 4,45mmol), dicyclohexylcarbodiimide (1,1g, 5,34mmol), và 1-hydroxybenzotriazol (1,5g, 10,69mmol) được loại không khí dưới áp suất giảm và được sục khí argon. Axetonitril khan (24ml) được cho thêm vào hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng, và dung dịch 4-amino-1-butanol (0,48g, 5,34mmol) trong axetonitril khan (6ml) được cho thêm tiếp vào. Sau đó, hỗn hợp này được khuấy trong 15 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Sau khi phản ứng kết thúc, phần kết tủa tạo thành được loại bỏ bằng cách lọc, và dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Diclometan được cho thêm vào phần cặn dư thu được, và hỗn hợp được rửa bằng chất đệm axit axetic (độ pH = 4,0) ba lần và rửa tiếp bằng nước natri bicacbonat bão hòa ba lần. Sau đó, lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng magie sulfat. Tiếp đó, lớp hữu cơ được lọc, và dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Diethyl ete (50ml) được cho thêm vào phần cặn dư, nhờ đó chuyển phần cặn dư thành dạng bột. Bột thu được được thu gom bằng cách lọc. Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 3 ở dạng bột màu trắng. Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7,77 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H); 7,58 (br, 2H); 7,41 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 7,32 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H); 4,25-4,43 (m, 4H); 3,25-3,61 (m, 6H); 1,57-1,92 (m, 8H).

MS (FAB $^+$): m/z 409 ($\text{M}+\text{H}^+$).

(2) DMTr-amit-D-prolin (hợp chất có công thức 5)

Fmoc-hydroxy amit-D-prolin (hợp chất có công thức 3) (1,0g, 2,45mmol) được trộn lẫn với pyridin khan (5ml), và hỗn hợp tạo thành được làm khô đồng sôi hai lần ở nhiệt độ trong phòng. Cho thêm 4,4'-dimethoxytrityl clorua (1,05g, 3,10mmol), DMAP (3mg, 0,024mmol), và pyridin khan (5ml) vào phần cặn dư thu được. Hỗn hợp này

được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, metanol (1ml) được cho thêm vào, và hỗn hợp được khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp này được pha loãng bằng diclometan, và được rửa bằng nước natri bicacbonat bão hòa. Sau đó, lớp hữu cơ được tách ra. Lớp hữu cơ này được làm khô bằng natri sulfate, và sau đó được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Dimethylformamit khan (5ml) và piperidin (2,4ml, 24mmol) được cho thêm vào phần cặn dư chưa tinh chế, và hỗn hợp này được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi phản ứng kết thúc, dung môi trong hỗn hợp được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ trong phòng. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột trên silicagel (tên thương mại Wakogel C-300, dung môi rửa giải là $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 9:1$, chứa pyridin 0,05%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 5 ở dạng dầu màu vàng nhạt (1,26g, hiệu suất 96%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,62 (br, 1H); 7,41-7,44 (m, 2H); 7,26-7,33 (m, 6H); 7,17-7,22 (m, 1H); 6,80-6,84 (m, 4H); 3,78 (s, 6H); 3,71 (dd, $J = 8,8, 5,4$ Hz, 1H); 3,22 (q, 6,5 Hz, 2H); 3,07 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H); 2,97-3,03 (m, 1H); 2,85-2,91 (m, 1H); 1,85-2,15 (m, 3H); 1,55-1,73 (m, 6H).

MS (FAB⁺): m/z 489 ($\text{M}+\text{H}^+$), 303 (DMTr^+).

(3) DMTr-hydroxy diamit-D-prolin (hợp chất có công thức 7)

Dung dịch diclometan khan được điều chế bằng cách trộn lẫn DMTr-amit-D-prolin (hợp chất có công thức 5) (1,2g, 2,45mmol), EDC (566mg, 2,95mmol), 1-hydroxybenzotriazol (796mg, 5,89mmol), và triethylamin (1,2ml, 8,84mmol) trong diclometan khan (24ml). Axit 6-hydroxyhexanoic (390mg, 2,95mmol) được cho thêm tiếp vào dung dịch này ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon, và hỗn hợp được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Hỗn hợp được pha loãng bằng diclometan, và được rửa bằng nước natri bicacbonat bão hòa ba lần. Lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfate. Sau đó, lớp hữu cơ này được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 7 ở dạng dầu màu vàng nhạt

(1,4g, hiệu suất 95%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7,40-7,43 (m, 2H); 7,25-7,32 (m, 6H); 7,17-7,22 (m, 1H); 6,79-6,83 (m, 4H); 3,79 (s, 6H); 3,58-3,63 (m, 2H); 3,49-3,55 (m, 1H); 3,15-3,26 (m, 2H); 3,02-3,07 (m, 2H); 2,30-2,33 (m, 2H); 2,11-2,20 (m, 1H); 1,50-1,99 (m, 13H); 1,36-1,43 (m, 2H).

MS (FAB⁺): m/z 602 (M^+), 303 (DMTr^+).

(4) DMTr-diamit-D-prolin amidit (hợp chất có công thức 9)

DMTr-hydroxy diamit-D-prolin (hợp chất có công thức 7) (1,2g, 1,99mmol) được trộn lẫn với axetonitril khan, và hỗn hợp tạo thành được làm khô đồng sôi ba lần ở nhiệt độ trong phòng. Diisopropylamoni tetrazolit (410mg, 2,40mmol) được cho thêm vào phần cặn dư thu được. Hỗn hợp tạo thành được loại không khí dưới áp suất giảm và được sục khí argon. Axetonitril khan (2,4ml) được cho thêm vào hỗn hợp, và 2-xyanoetoxy-N,N,N',N'-tetraisopropyl phosphorodiamidit (722mg, 2,40mmol) được cho thêm tiếp vào. Hỗn hợp này được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Sau đó, hỗn hợp được pha loãng bằng diclometan, và được rửa bằng nước natri bicacbonat bão hòa ba lần và sau đó được rửa bằng nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfat. Sau đó, lớp hữu cơ được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột bằng cách sử dụng amino silicagel làm chất độn (dung môi rửa giải là hexan:ethyl axetat = 1:3). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 9 ở dạng dầu không màu (1,4g, độ tinh khiết 95 %, hiệu suất 83%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

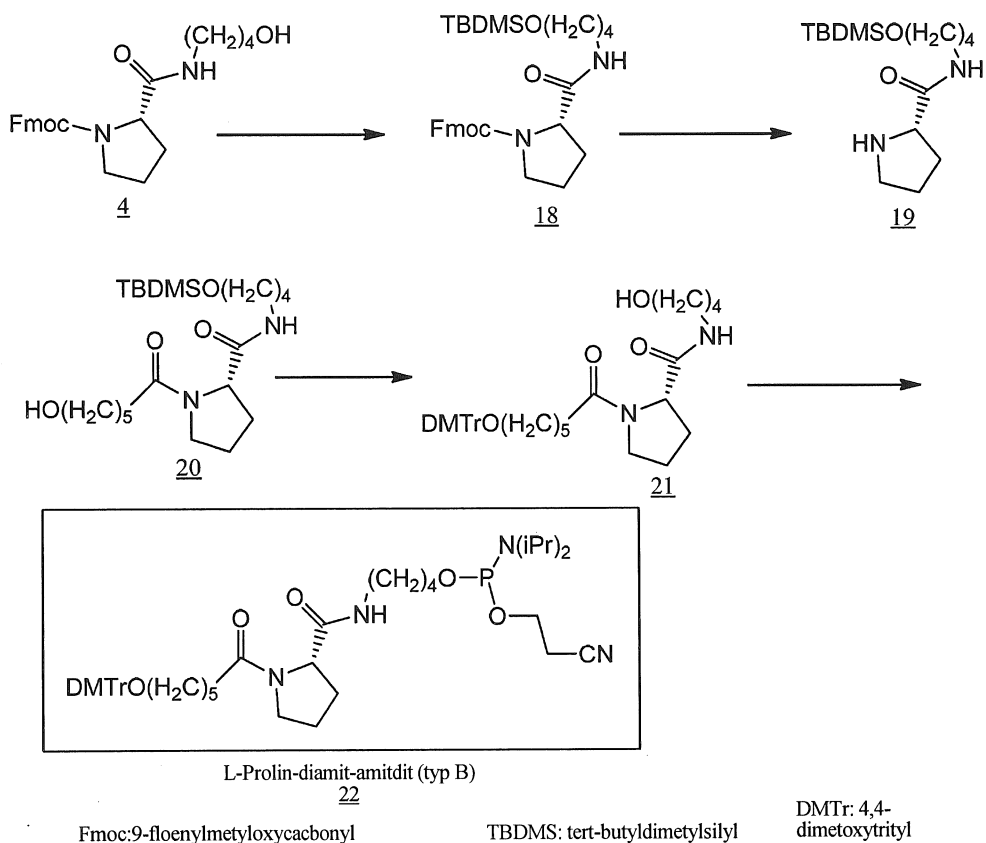
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7,40-7,43 (m, 2H); 7,25-7,32 (m, 6H); 7,14-7,21 (m, 1H); 6,80-6,83 (m, 4H); 3,80-3,85 (m, 2H); 3,79 (s, 6H); 3,49-3,65 (m, 5H); 3,02-3,06 (m, 2H); 2,60-2,63 (m, 2H); 2,29-2,33 (m, 2H); 1,77-1,82 (m, 2H); 1,56-1,68 (m, 8H); 1,38-1,43 (m, 2H); 1,15-1,29 (m, 18H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3): δ 146,94.

MS (FAB+): m/z 802 (M^+), 303 ($DMTr^+$), 201 ($C_8H_{19}N_2OP^+$).

Ví dụ B4

Để sản xuất phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm vùng liên kết có khung prolin, L-prolin-diamit-amidit (typ B) được tổng hợp theo sơ đồ 4 dưới đây.



Sơ đồ 4

(1) Fmoc-t-butyl-dimethyl siloxy amit-L-prolin (hợp chất có công thức 18)

Fmoc-hydroxy amit-L-prolin (hợp chất có công thức 4) (2,00g, 30mmol), t-butyl-dimethyl silyl clorua (1,11g, 35mmol), và imidazol (10,90g, 71mmol) được trộn lẫn với nhau. Hỗn hợp này được loại không khí dưới áp suất giảm và được sục khí argon. Axetonitril khan (20ml) được cho thêm vào hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng, và hỗn hợp này được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Sau khi phản ứng kết thúc, diclometan (150ml) được cho thêm vào hỗn hợp. Hỗn hợp tạo thành được rửa bằng nước ba lần và sau đó rửa bằng nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng magie sulfat. Sau đó, lớp hữu cơ được lọc. Dung môi

trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, và phần cặn dư được sắc ký cột trên silicagel (dung môi rửa giải là $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 95:5$). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 18 ở dạng xi-rô không màu (2,35g, hiệu suất 92%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,76-7,78 (m, 2H, Ar-H), 7,50-7,63 (m, 2H, Ar-H), 7,38-7,42 (m, 2H, Ar-H), 7,29-7,34 (m, 2H, Ar-H), 4,10-4,46 (m, 4H, CH_2), 3,47-3,59 (m, 4H, CH_2), 3,20-3,26 (m, 2H, CH), 1,85-1,95 (m, 2H), 1,42-1,55 (m, 6H), 0,96 (s, 9H, t-Bu), 0,02 (s, 6H, SiCH_3);

Ms (FAB+): m/z 523 ($\text{M}+\text{H}^+$).

(2) t-butyl-dimethyl siloxy amit-L-prolin (hợp chất có công thức 19)

Axetonitril khan (5ml) và piperidin (2,4ml) được cho thêm vào Fmoc-t-butyl-dimethyl siloxy amit-L-prolin (hợp chất có công thức 18) (1,18g, 2,5mmol), và hỗn hợp này được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi phản ứng kết thúc, axetonitril (50ml) được cho thêm vào hỗn hợp, và các chất không tan được loại bỏ bằng cách lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột trên silicagel (dung môi rửa giải là $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 9:1$). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 19 ở dạng xi-rô không màu (0,61g, hiệu suất 90%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 3,71 (dd, 1H, $J = 9,0 \text{ Hz}, 5,2 \text{ Hz}$, CH), 3,61-3,64 (m, 2H, CH_2), 3,22-3,28 (m, 2H, CH_2), 2,98-3,04 (m, 1H, CH), 2,86-2,91 (m, 1H, CH), 2,08-2,17 (m, 1H, CH), 1,86-1,93 (m, 1H, CH), 1,66-1,75 (m, 2H, CH_2), 1,52-1,57 (m, 4H), 0,89 (s, 9H, t-Bu), 0,05 (s, 6H, SiCH_3):

Ms (FAB+); m/z 301 ($\text{M}+\text{H}^+$).

(3) t-butyl-dimethyl siloxy amit hydroxy amit-L-prolin (hợp chất có công thức 20)

Dung dịch diclometan khan được điều chế bằng cách trộn lẫn t-butyl-dimethyl siloxy amit-L-prolin (hợp chất có công thức 19) (550mg, 1,8mmol), axit 6-hydroxyhexanoic (300mg, 2,3mmol), EDC (434mg, 2,3mmol), và 1-

hydroxybenzotriazol (695mg, 4,5mmol) trong diclometan khan (20ml). Trietylamin (689mg, 6,8mmol) được cho thêm vào dung dịch này ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon, và sau đó, hỗn hợp được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Hỗn hợp được rửa bằng nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ được thu gom, và lớp hữu cơ thu được được làm khô bằng natri sulfat. Sau đó, lớp hữu cơ này được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột trên silicagel (dung môi rửa giải là $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 9:1$). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 20 ở dạng xi-rô không màu (696mg, hiệu suất 92%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 4,54 (d, 1H, CH), 3,58-3,67 (m, 5H), 3,52-3,56 (m, 1H, CH), 3,32-3,39 (m, 1H), 3,20-3,25 (m, 2H), 2,40-2,43 (m, 1H, CH), 2,33 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, CH_2), 2,05-2,25 (m, 2H), 1,93-2,03 (m, 1H, CH), 1,75-1,85 (m, 1H, CH), 1,50-1,73 (m, 8H), 1,37-1,46 (m, 2H, CH_2), 0,87 (s, 9H, t-Bu), 0,04 (s, 6H, SiCH_3);

$\text{Ms (FAB+): } m/z$ 415 ($\text{M}^+ + 1$).

(4) DMTr-hydroxy diamit-L-prolin (typ B) (hợp chất có công thức 21)

T-butyl-dimetyl siloxy amit hydroxy amit-L-prolin (hợp chất có công thức 20) (640mg, 1,54mmol) được trộn lẫn với pyridin khan (1ml), và hỗn hợp này được làm khô đồng sôi ở nhiệt độ trong phòng. Cho thêm 4,4'-dimetoxytiryl clorua (657mg, 1,85mmol), DMAP (2mg), và pyridin khan (5ml) vào phần cặn dư thu được, và hỗn hợp được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, metanol (1ml) được cho thêm vào, và hỗn hợp được khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Hỗn hợp được pha loãng bằng diclometan, và được rửa bằng nước natri bicacbonat bão hòa. Lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfat. Sau đó, lớp hữu cơ này được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Cho thêm axetonitril khan (5ml) và dung dịch tetrabutylamoni florua 1mol/l trong tetrahydrofuran (1,42ml, tetrabutylamoni florua 1,42mmol) vào phần cặn dư thu được, và hỗn hợp này được khuấy qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi phản ứng kết thúc, etyl axetat (100ml) được cho thêm vào hỗn hợp. Hỗn hợp tạo thành được rửa bằng

nước và sau đó rửa bằng nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfat. Sau đó, lớp hữu cơ này được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột trên silicagel (dung môi rửa giải là $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 95:5$, chứa pyridin 0,05%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 21 ở dạng xi-rô không màu (680mg, hiệu suất 73%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,41-7,44 (m, 2H, Ar-H), 7,26-7,33 (m, 4H, Ar-H), 7,18-7,21 (m, 2H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,80-6,84 (m, 4H, Ar-H), 4,51-4,53 (d, 6,8 Hz, 1H, CH), 3,79 (s, 6H, OCH_3), 3,61 (dd, 2H, $J = 11$ Hz, 5,4 Hz, CH_2), 3,50-3,54 (m, 1H, CH), 3,36-3,43 (m, 1H, CH), 3,20-3,26 (m, 2H, CH_2), 3,05 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH_2), 2,38-2,45 (m, 1H, CH), 2,30 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H, CH_2), 2,05-2,25 (m, 1H, CH), 1,92-2,00 (m, 1H, CH), 1,75-1,83 (m, 1H, CH), 1,52-1,67 (m, 8H), 1,35-1,45 (m, 2H, CH_2);

Ms (FAB⁺): m/z 602 (M^+), 303 (DMTr^+).

(5) DMTr-diamit-L-prolin amidit (type B) (hợp chất có công thức 22)

DMTr-hydroxy diamit-L-prolin (typ B) (hợp chất có công thức 21) (637mg, 1,06mmol) được trộn lẫn với axetonitril khan, và hỗn hợp tạo thành được làm khô đồng sôi ở nhiệt độ trong phòng. Cho thêm diisopropylamoni tetrazolit (201mg, 1,16mmol) vào phần cặn dư thu được, và hỗn hợp tạo thành được loại không khí dưới áp suất giảm và được sục khí argon. Axetonitril khan (1ml) được cho thêm vào hỗn hợp, và dung dịch 2-xyanoetoxy-N,N,N',N'-tetraisopropyl phosphorodiamidit (350mg, 1,16mmol) trong axetonitril khan (1ml) được cho thêm tiếp vào. Hỗn hợp này được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Hỗn hợp được pha loãng bằng diclometan, và được rửa bằng nước natri bicacbonat bão hòa và nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfat. Sau đó, lớp hữu cơ này được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột bằng cách sử dụng amino silicagel làm chất độn (dung môi rửa giải là hexan:axeton = 7:3). Nhờ đó, thu được hợp chất có

công thức 22 ở dạng xi-rô không màu (680mg, độ tinh khiết 95%, hiệu suất 76%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

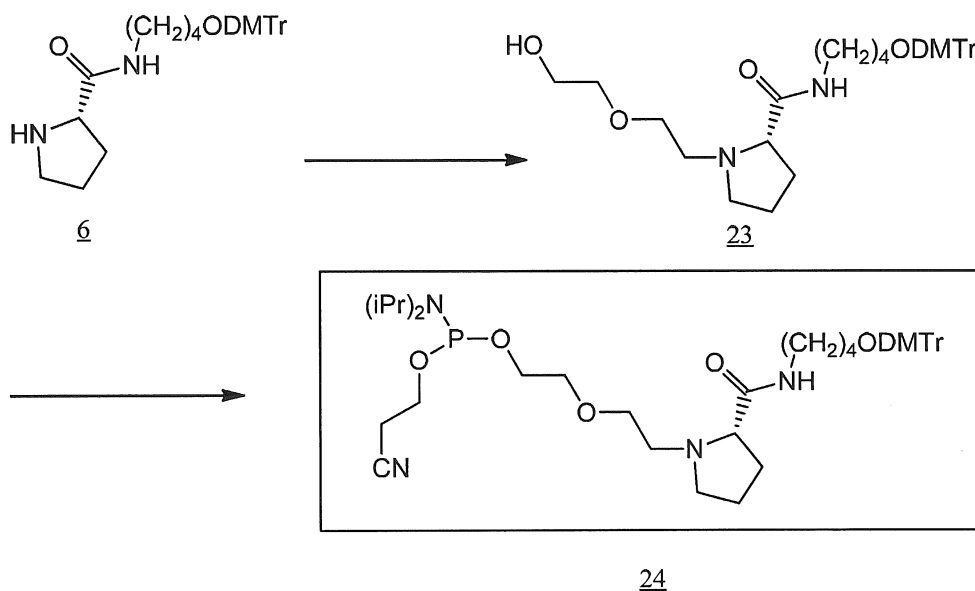
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,25-7,32 (m, 4H, Ar-H), 7,17-7,22 (m, 2H, Ar-H), 6,80-6,83 (m, 4H, Ar-H), 4,53 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, CH), 3,75-3,93 (m, 3H), 3,79 (s, 6H, OCH_3), 3,46-3,68 (m, 5H), 3,34-3,41 (m, 1H, CH), 3,10-3,31 (m, 1H, CH), 3,05 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH_2), 2,62 (t, $J = 6,3$ Hz, 2H, CH_2), 2,39-2,46 (m, 1H, CH), 2,29 (t, 7,3 Hz, 2H, CH_2), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,90-2,00 (m, 1H, CH), 1,70-1,83 (m, 1H, CH), 1,51-1,71 (m, 8H), 1,35-1,45 (m, 2H, CH_2), 1,18 (d, $J = 6,4$ Hz, 6H, CH_3), 1,16 (d, $J = 6,4$ Hz, 6H, CH_3);

P-NMR (CH_3CN): δ 146,90;

Ms (FAB+): m/z 803 ($\text{M}^+ + 1$), 303 (DMTr^+).

Ví dụ B5

Để sản xuất phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm vùng liên kết có khung prolin, DMTr-amit Etylen oxy etyl amino-L-prolin amidit (sau đây được gọi là “kiểu nhóm đệm PEG”) được tổng hợp theo sơ đồ 5 dưới đây.



Sơ đồ 5

(1) DMTr-amit hydroxy etoxy etyl amino-L-prolin (hợp chất có công thức 23)

DMTr-amit-L-prolin (hợp chất có công thức 6) (1,00g, 2,05mmol), este 2-(2-

hydroxyetoxy)ethyl của axit 4-toluensulfonic (3,10g, 12,30mmol), và dung dịch kali cacbonat (0,85g, 6,15mmol) trong dimetylformamit khan (10ml) được trộn lẫn với nhau, và hỗn hợp tạo thành được khuấy trong 4 ngày ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Dung môi trong hỗn hợp được loại bỏ bằng cách làm bay hơi ở nhiệt độ trong phòng dưới áp suất giảm. Sau đó, diclometan (20ml) được cho thêm vào, và hỗn hợp tạo thành được lọc. Phần nước lọc được cô, và phần cặn dư thu được được sắc ký cột trên silicagel. Để làm dung môi rửa giải trong phương pháp sắc ký cột trên silicagel, trước tiên, ethyl axetat chứa pyridin 0,05% được sử dụng, và sau đó, hỗn hợp của CH_2Cl_2 và CH_3OH ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 9:1$) chứa pyridin 0,05% được sử dụng. Kết quả là thu được hợp chất có công thức 23 ở dạng xi-rô không màu (1,15g, hiệu suất 97%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,41-7,45 (m, 2H, Ar-H), 7,27-7,31 (m, 6H, Ar-H), 7,17-7,21 (m, 1H, Ar-H), 6,79-6,82 (m, 4H, Ar-H), 3,79 (s, 6H, OCH_3), 3,60-3,70 (m, 2H), 3,39-3,57 (m, 4H), 3,13-3,27 (m, 3H), 3,07-3,08 (m, 2H), 2,71-2,84 (m, 1H), 2,38-2,46 (m, 1H), 2,14-2,19 (m, 1H), 1,84-1,87 (m, 1H), 1,57-1,76 (m, 8H).

(2) DMTr-amit etylen oxy ethyl amino-L-prolin amidit (hợp chất có công thức 24)

DMTr-amit hydroxy etoxy ethyl amino-L-prolin (hợp chất có công thức 23) (0,63g, 1,00mmol) được trộn lẫn với pyridin khan, và hỗn hợp tạo thành được làm khô đồng sôi ở nhiệt độ trong phòng. Cho thêm diisopropylamoni tetrazolit (206mg, 1,20mmol) vào phần cặn dư thu được. Hỗn hợp tạo thành được loại không khí dưới áp suất giảm và được sục khí argon. Axetonitril khan (1ml) được cho thêm vào hỗn hợp, và dung dịch 2-xyanoetoxy-N,N,N',N'-tetraisopropyl phosphorodiamidit (282mg, 1,12mmol) trong axetonitril khan (1ml) được cho thêm tiếp vào. Hỗn hợp này được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường argon. Sau đó, hỗn hợp được pha loãng bằng diclometan, và được rửa bằng nước natri bicacbonat bão hòa và nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfat. Sau đó, lớp hữu cơ này được lọc. Dung môi trong phần nước lọc thu được được loại bỏ bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột bằng cách sử dụng amino silicagel làm chất độn (dung môi rửa giải là hexan:axeton = 7:3, chứa

pyridin 0,05%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 24 ở dạng xi-rô không màu (0,74g, độ tinh khiết 100%, hiệu suất 87%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3CN): δ 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H), 7,28-7,31 (m, 6H, Ar-H), 7,18-7,22 (m, 1H, Ar-H), 6,84-6,86 (m, 4H, Ar-H), 3,73-3,84 (m, 2H, CH_2), 3,79 (s, 6H, OCH_3), 3,47-3,64 (m, 7H), 3,15-3,23 (m, 1H), 3,11 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH_2), 3,01 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H, CH_2), 2,95-2,99 (m, 1H), 2,58-2,63 (m, 2H), 2,31-2,35 (m, 1H, CH), 2,03-2,19 (m, 1H, CH), 1,48-1,78 (m, 10H), 1,12-1,57 (m, 12H, CH_3);

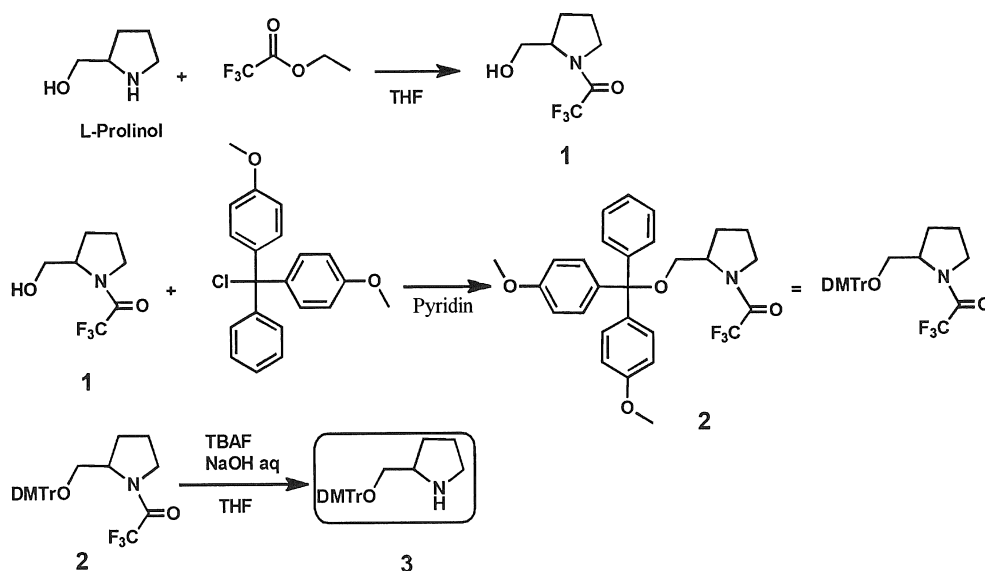
P-NMR (CD_3CN): δ 148,00;

Ms (FAB^+): m/z 776 (M^+), 303 (DMTr^+) 201 ($\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{OP}^+$).

Ví dụ B6

1. Tổng hợp prolinol được bảo vệ

Prolinol được bảo vệ bằng nhóm dimetoxyltrityl group (hợp chất có công thức 3) được tổng hợp theo sơ đồ 6 dưới đây.



Sơ đồ 6

(1) Trifloaxetyl-L-prolinol (hợp chất có công thức 1)

L-prolinol (2,0g, 20mmol) được hòa tan trong 20ml THF. Mặt khác, ethyl trifloaxetat (3,0g, 21mmol) được hòa tan trong 20ml THF. Sau đó, dung dịch THF thứ

hai được cho thêm nhỏ giọt vào dung dịch THF thứ nhất chứa L-prolinol, và hỗn hợp này được khuấy trong 12 giờ. Dung dịch phản ứng được cô trong chân không. Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 1 (3,7g, hiệu suất 97%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 4,28-4,23 (1,0H, m, OH), 3,90-3,41 (5H, H-2, H-5, H-6, m), 2,27-1,77 (4H, H-3, H-4, m).

(2) Trifloaxetyl-DMTr-L-prolinol (hợp chất có công thức 2)

Trifloaxetyl-L-prolinol (hợp chất có công thức 1) (3,7g, 19mmol) được hòa tan trong pyridin, và hỗn hợp tạo thành được làm khô đồng sôi ba lần ở nhiệt độ trong phòng. Phần cặn dư thu được được hòa tan trong 15ml pyridin, và 4,4'-dimetoxyltrityl clorua (DMTr-Cl) (8,1g, 24mmol) được cho thêm vào hỗn hợp trong khi khuấy hỗn hợp này trong bể nước đá trong môi trường argon. Phản ứng được để xảy ra trong 4 giờ nữa ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, để làm ngừng phản ứng, cho thêm tiếp lượng dư DMTr-Cl, 10ml metanol vào dung dịch phản ứng, và hỗn hợp này được khuấy trong 10 phút. Sau đó, diclometan được cho thêm vào dung dịch phản ứng, và hỗn hợp tạo thành được rửa bằng dung dịch natri hydrocacbonat bão hòa trong nước và nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ thu được sau khi rửa được làm khô bằng natri sulfat. Lớp hữu cơ này được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột trên silicagel (dung môi rửa giải là $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 95:5$, chứa pyridin 0,1%). Kết quả là thu được hợp chất có công thức 2 tinh khiết (8,5g, hiệu suất 89%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,39-7,18 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,70-3,41 (5H, H-2, H-5, H-6, m), 2,19-1,85 (4H, H-3, H-4, m).

(3) DMTr-L-prolinol (hợp chất có công thức 3)

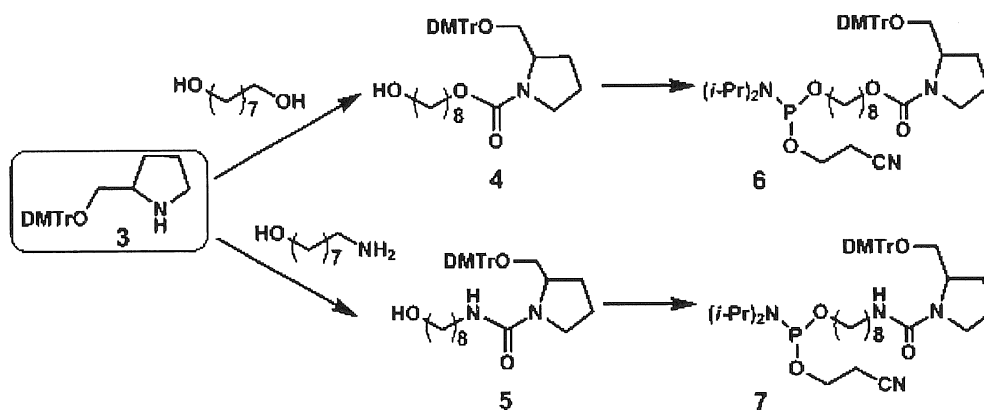
Trifloaxetyl-DMTr-L-prolinol (hợp chất có công thức 2) (5g, 10mmol) được hòa tan trong 100ml THF. 100ml dung dịch natri hydroxit 5% trong nước được cho thêm vào dung dịch THF, và sau đó hỗn hợp này được khuấy. 5ml dung dịch tetra-n-butylamonium florua (TBAF) 1M được cho thêm vào dung dịch này, và hỗn hợp được

khuấy trong 12 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch phản ứng được rửa bằng dung dịch natri hydrocacbonat bão hòa trong nước và nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ thu được sau khi rửa được làm khô bằng natri sulfat. Lớp hữu cơ này được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 3 (3,6g, hiệu suất 90%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,31 (1H, m, H-6), 3,07 (2H, m, H-2, H-6), 2,90 (2H, m, H-5), 1,84 (3H, m, H-3, H-4), 1,40 (1H, m, H-3).

2. Tổng hợp dẫn xuất amidit

Bằng cách sử dụng prolinol được bảo vệ (hợp chất có công thức 3) tổng hợp được trong mục “1” trên đây, dẫn xuất amidit có prolinol ở các dạng liên kết khác nhau được tổng hợp theo sơ đồ 7 dưới đây.



§ Sơ đồ 7

(1) DMTr-uretan-L-prolinol (hợp chất có công thức 4)

1,8-octandiol (9,0g, 62mmol) được hòa tan trong 90ml THF, và dung dịch này được cho vào môi trường argon. Mặt khác, cacbonyldiimidazol (2,0g, 12mmol) được hòa tan trong 10ml THF. Dung dịch THF thứ hai được cho thêm vào dung dịch THF thứ nhất, và hỗn hợp này được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch phản ứng được rửa bằng nước cho đến khi không còn quan sát được vết 1,8-octandiol bằng phương pháp TLC. Tiếp theo, lớp hữu cơ thu được sau khi rửa được rửa bằng

nước muối bão hòa và làm khô bằng natri sulfat khan. Lớp hữu cơ này được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột trên silicagel (dung môi rửa giải là $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 95:5$). Nhờ đó, thu được hợp chất nêu ở đề mục này. Trong hợp chất này, một đầu của 1,8-octandiol được hoạt hóa bằng cacbonyldiimidazol (2,3g, hiệu suất 77%).

0,9g hợp chất nêu trên được hòa tan trong 10ml axetonitril, và dung dịch này được cho vào môi trường argon. Mặt khác, DMTr-L-prolinol (hợp chất có công thức 3) (1,9g, 4,8mmol) được hòa tan trong 20ml axetonitril. Dung dịch axetonitril thứ nhất được cho thêm vào dung dịch axetonitril thứ hai, và hỗn hợp này được khuấy trong 24 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, dung dịch phản ứng được rửa bằng dung dịch natri hydrocacbonat bão hòa trong nước và nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfat khan. Lớp hữu cơ này được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột trên silicagel (dung môi rửa giải là diclometan:axeton = 9:1, chứa pyridin 0,1%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 4 (prolinol-uretan-amidit) ở dạng tinh khiết (1,5g, hiệu suất 65%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH_2), 3,78 (s, 6H, OCH_3), 3,72-2,96 (7H, m, alkyl, H-2, H-5, H-6), 2,10-1,30 (16H, m, alkyl, H-3, H-4).

FAB-MS: 576 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(2) DMTr-ureido-L-prolinol (hợp chất có công thức 5)

Trong môi trường argon, triphosgen (2,0g, 6,7mmol) được hòa tan trong 10ml THF, và dung dịch này được khuấy ở nhiệt độ 0°C . Mặt khác, DMTr-L-prolinol (hợp chất có công thức 3) (1,3g, 3,2mmol) và N,N-diisopropyletylamin (16g, 124mmol) được hòa tan trong 10ml THF, và dung dịch này được cho vào dung dịch triphosgen chứa THF. Dung dịch phản ứng được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ 0°C và sau đó khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, 8-amino-1-octanol (2,3g, 16mmol) và N, N-diisopropyletylamin (5,0g, 38mmol) được hòa tan trong 30ml THF. Dung dịch phản

ứng đã khuấy được cho thêm nhỏ giọt vào dung dịch THF này, và hỗn hợp được khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ 0°C và sau đó là khuấy trong 48 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch phản ứng được cô trong chân không, và phần cặn dư thu được được hòa tan trong diclometan. Dung dịch này được rửa bằng dung dịch natri hydrocacbonat bão hòa trong nước và nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ được thu gom và làm khô bằng natri sulfat khan. Lớp hữu cơ này được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Phần cặn dư thu được được tinh chế bằng cách sắc ký cột trên silica gel pha ngược. Ở thời điểm này, dung môi rửa giải được sử dụng là hỗn hợp dung môi của axeton và nước chứa pyridin 0,1%, và tỷ lệ trộn lẫn giữa axeton và nước được thay đổi từng bước. Cụ thể, tỷ lệ mol giữa axeton và nước (axeton: nước) được thay đổi dần theo thứ tự 2:8, 3:7, 4:6, và 5:5. Phân đoạn chứa hợp chất có công thức 5 là hợp chất đích được chiết bằng diclometan, và lớp hữu cơ thu được được làm khô bằng natri sulfat khan. Lớp hữu cơ này được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 5 (prolinol ureido amidit) (0,9g, hiệu suất 49%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH_3), 3,68-3,25 (9H, m, CH_2NH , CH_2OH , H-2, H-5, H-6), 1,74-1,18 (16H, m, alkyl, H-3, H-4).

FAB-MS: 575 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(3) Dẫn xuất amidit có prolinol (hợp chất có công thức 6 và 7)

Để làm hợp chất prolinol được cải biến, hợp chất có công thức 4 (0,80g, 1,4mmol) được hòa tan trong axetonitril, và hỗn hợp tạo thành được làm khô đồng sôi ba lần ở nhiệt độ trong phòng. Phần cặn dư thu được được hòa tan trong 1ml axetonitril, và dung dịch này được cho vào môi trường argon. Diisopropylamoni tetrazolit (0,24g, 1,4mmol) được cho thêm vào dung dịch axetonitril này, nhờ đó tạo ra dung dịch phản ứng. Mặt khác, 2-xyanoethyl N,N,N',N'-tetraisopropyl phosphorodiamidit (0,50g, 1,7mmol) được hòa tan trong 1ml axetonitril. Dung dịch này được cho thêm vào dung dịch phản ứng, và hỗn hợp tạo thành được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Diclometan được cho thêm vào dung dịch phản ứng, và hỗn hợp tạo thành được rửa

bằng dung dịch natri hydrocacbonat bão hòa trong nước và nước muối bão hòa. Lớp hữu cơ thu được sau khi rửa được làm khô bằng natri sulfat khan. Lớp hữu cơ này được lọc, và phần nước lọc thu được được cô trong chân không. Phần cặn dư thu được được sắc ký cột amino silicagel (dung môi rửa giải là hexan:axeton = 10:1, chứa pyridin 0,1%). Nhờ đó, thu được hợp chất có công thức 6 (DMTr-uretan-L-prolinol amidit) (0,90g, hiệu suất 83%). Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 4,24-3,94 (2H, m, COOCH_2), 3,78 (s, 6H, OCH_3), 3,72-2,96 (11H, m, CH_2O , POCH_2 , CHCH_3 , H-2, H-5, H-6), 2,58 (2H, m, CH_2CN), 2,10-1,46 (16H, m, alkyl, H-3, H-4), 1,34-1,10 (12H, m, CHCH_3). $^{31}\text{P-NMR}$ (CD_3CN) δ 146,82.

FAB-MS: 776 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Hợp chất có công thức 7 đã tinh chế (DMTr-ureido -L-prolinol amidit) (0,80g, hiệu suất 74%) được tổng hợp theo cách tương tự như trên đây ngoại trừ việc sử dụng hợp chất có công thức 5 thay cho hợp chất có công thức 4 làm prolinol được cải biến. Kết quả phân tích NMR của hợp chất này được thể hiện dưới đây.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7,40-7,14 (9H, m, Ar-H), 6,82 (4H, m, Ar-H), 3,78 (s, 6H, OCH_3), 3,65-3,25 (13H, m, CH_2O , POCH_2 , CHCH_3 , H-2, CH_2NH , CH_2OH , H-2, H-5, H-6), 2,73 (2H, m, CH_2CN), 2,10-1,48 (16H, m, alkyl, H-3, H-4), 1,35-1,10 (12H, m, CHCH_3).

$^{31}\text{P-NMR}$ (CD_3CN) δ 146,83.

FAB-MS: 775 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết cùng với các phương án minh họa và phần ví dụ nêu trên, nhưng các phương án và ví dụ này sẽ không giới hạn phạm vi của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể tạo ra các thay đổi và biến đổi mà không vượt ra khỏi phạm vi của sáng chế.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Có thể ức chế sự biểu hiện của gen bằng cách sử dụng phân tử ARN sợi đơn theo sáng chế. Hơn nữa, do phân tử ARN sợi đơn không ở dạng vòng nên phân tử này có thể được tổng hợp một cách dễ dàng. Ngoài ra, do phân tử này là phân tử sợi đơn, không cần bước liên kết như trong quá trình sản xuất sợi kép, vì thế phân tử này có thể được sản xuất một cách hiệu quả. Như đã mô tả trên đây, do phân tử ssNc theo sáng chế có thể ức chế sự biểu hiện của gen đích, nó hữu ích dùng làm, ví dụ, dược phẩm, chất chẩn đoán, hóa chất nông nghiệp, và công cụ để tiến hành nghiên cứu trong lĩnh vực hóa nông, khoa học y học, khoa học đời sống và các lĩnh vực tương tự.

Các khía cạnh của sáng chế

1. Phân tử axit nucleic sợi đơn bao gồm:

trình tự ức chế sự biểu hiện để ức chế sự biểu hiện của gen đích, trong đó phân tử axit nucleic sợi đơn chứa, theo trình tự từ đầu 5' đến đầu 3': vùng đầu 5' (Xc); vùng bên trong (Z); và vùng đầu 3' (Yc), vùng bên trong (Z) gồm vùng bên trong đầu 5' (X) và vùng bên trong đầu 3' (Y) được liên kết với nhau, vùng đầu 5' (Xc) bổ trợ cho vùng bên trong đầu 5' (X), vùng đầu 3' (Yc) bổ trợ cho vùng bên trong đầu 3' (Y), và ít nhất một vùng trong số vùng bên trong (Z), vùng đầu 5' (Xc), và vùng đầu 3' (Yc) chứa trình tự ức chế sự biểu hiện.

2. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh 1, trong đó phân tử này còn bao gồm:

vùng liên kết (Lx) giữa vùng đầu 5' (Xc) và vùng bên trong đầu 5' (X), trong đó vùng đầu 5' (Xc) và vùng bên trong đầu 5' (X) được liên kết với nhau qua vùng liên kết (Lx).

3. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh 1 hoặc 2, trong đó phân tử này còn bao gồm:

vùng liên kết (Ly) giữa vùng đầu 3' (Yc) và vùng bên trong đầu 3' (Y), trong đó vùng đầu 3' (Yc) và vùng bên trong đầu 3' (Y) được liên kết với nhau qua

vùng liên kết (Ly).

4. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh 1, trong đó phân tử này còn bao gồm:

vùng liên kết (Lx) giữa vùng đầu 5' (Xc) và vùng bên trong đầu 5' (X); và

vùng liên kết (Ly) giữa vùng đầu 3' (Yc) và vùng bên trong đầu 3' (Y),

trong đó vùng đầu 5' (Xc) và vùng bên trong đầu 5' (X) được liên kết với nhau qua vùng liên kết (Lx), và

vùng đầu 3' (Yc) và vùng bên trong đầu 3' (Y) được liên kết với nhau qua vùng liên kết (Ly).

5. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 4, trong đó số lượng bazơ (Z) ở vùng bên trong (Z), số lượng bazơ (X) ở vùng bên trong đầu 5' (X), số lượng bazơ (Y) ở vùng bên trong đầu 3' (Y), số lượng bazơ (Xc) ở vùng đầu 5' (Xc), và số lượng bazơ (Yc) ở vùng đầu 3' (Yc) thỏa mãn điều kiện của biểu thức (1) và (2):

$$Z = X + Y \quad \dots (1)$$

$$Z \geq Xc + Yc \quad \dots (2).$$

6. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 5, trong đó số lượng bazơ (X) ở vùng bên trong đầu 5' (X), số lượng bazơ (Xc) ở vùng đầu 5' (Xc), số lượng bazơ (Y) ở vùng bên trong đầu 3' (Y), và số lượng bazơ (Yc) ở vùng đầu 3' (Yc) thỏa mãn điều kiện bất kỳ trong số các điều kiện từ (a) đến (d):

(a) điều kiện của biểu thức (3) và (4) được thỏa mãn;

$$X > Xc \quad \dots (3)$$

$$Y = Yc \quad \dots (4)$$

(b) điều kiện của biểu thức (5) và (6) được thỏa mãn;

$$X = Xc \quad \dots (5)$$

$$Y > Yc \quad \dots (6)$$

(c) điều kiện của biểu thức (7) và (8) được thỏa mãn;

$$X > Xc \quad \dots (7)$$

$$Y > Y_c \quad \dots (8)$$

(d) điều kiện của biểu thức (9) và (10) được thỏa mãn;

$$X = X_c \quad \dots (9)$$

$$Y = Y_c \quad \dots (10).$$

7. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh 6, trong đó theo các điều kiện từ (a) đến (d), sự khác biệt giữa số lượng bazơ (X) ở vùng bên trong đầu 5' (X) và số lượng bazơ (X_c) ở vùng đầu 5' (X_c), và sự khác biệt giữa số lượng bazơ (Y) ở vùng bên trong đầu 3' (Y) và số lượng bazơ (Y_c) ở vùng đầu 3' (Y_c) thỏa mãn các điều kiện sau:

(a) điều kiện của biểu thức (11) và (12) được thỏa mãn;

$$X - X_c = 1, 2 \text{ hoặc } 3 \quad \dots (11)$$

$$Y - Y_c = 0 \quad \dots (12)$$

(b) điều kiện của biểu thức (13) và (14) được thỏa mãn;

$$X - X_c = 0 \quad \dots (13)$$

$$Y - Y_c = 1, 2 \text{ hoặc } 3 \quad \dots (14)$$

(c) điều kiện của biểu thức (15) và (16) được thỏa mãn;

$$X - X_c = 1, 2 \text{ hoặc } 3 \quad \dots (15)$$

$$Y - Y_c = 1, 2 \text{ hoặc } 3 \quad \dots (16)$$

(d) điều kiện của biểu thức (17) và (18) được thỏa mãn;

$$X - X_c = 0 \quad \dots (17)$$

$$Y - Y_c = 0 \quad \dots (18).$$

8. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 7, trong đó số lượng bazơ (Z) ở vùng bên trong (Z) lớn hơn hoặc bằng 19.
9. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh 8, trong đó số lượng bazơ (Z) ở vùng bên trong (Z) nằm trong khoảng từ 19 đến 30.
10. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 9, trong đó số lượng bazơ (X_c) ở vùng đầu 5' (X_c) nằm trong khoảng từ 1 đến 11.
11. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh 10, trong đó số lượng bazơ (X_c) ở vùng

đầu 5' (Xc) nằm trong khoảng từ 1 đến 7.

12. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh 10, trong đó số lượng bazơ (Xc) ở vùng đầu 5' (Xc) nằm trong khoảng từ 1 đến 3.
13. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 12, trong đó số lượng bazơ (Yc) ở vùng đầu 3' (Yc) nằm trong khoảng từ 1 đến 11.
14. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh 13, trong đó số lượng bazơ (Yc) ở vùng đầu 3' (Yc) nằm trong khoảng từ 1 đến 7.
15. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh 13, trong đó số lượng bazơ (Yc) ở vùng đầu 3' (Yc) nằm trong khoảng từ 1 đến 3.
16. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 15, trong đó phân tử axit nucleic sợi đơn chứa ít nhất một gốc được cải biến.
17. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 16, trong đó phân tử này còn chứa chất đánh dấu.
18. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 17, trong đó phân tử này còn chứa chất đồng vị ổn định.
19. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 18, trong đó phân tử này là phân tử ARN.
20. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 2 đến 19, trong đó vùng liên kết (Lx) và/hoặc vùng liên kết (Ly) gồm ít nhất một gốc nucleotit và một gốc không phải nucleotit.
21. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh 20, trong đó gốc nucleotit là gốc nucleotit không được cải biến và/hoặc gốc nucleotit được cải biến.
22. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh 20 hoặc 21, trong đó vùng liên kết (Lx) và/hoặc vùng liên kết (Ly) gồm gốc bất kỳ trong số các gốc từ (1) đến (7):
 - (1) gốc nucleotit không được cải biến
 - (2) gốc nucleotit được cải biến
 - (3) gốc nucleotit không được cải biến và gốc nucleotit được cải biến

- (4) gốc không phải nucleotit
 - (5) gốc không phải nucleotit và gốc nucleotit không được cải biến
 - (6) gốc không phải nucleotit và gốc nucleotit được cải biến
 - (7) gốc không phải nucleotit, gốc nucleotit không được cải biến, và gốc nucleotit được cải biến.
23. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 22, trong đó tổng số bazơ trong phân tử axit nucleic sợi đơn này lớn hơn hoặc bằng 50.
 24. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 23, trong đó sự biểu hiện của gen bị ức chế bằng kỹ thuật can thiệp ARN.
 25. Phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 24, trong đó trình tự bazơ của phân tử axit nucleic sợi đơn là trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2, 7, 8, 13, 14, 29-35, 37, 43, 44, 47, 48, và 51-80.
 26. Chế phẩm dùng để ức chế sự biểu hiện của gen đích, trong đó chế phẩm này bao gồm:
phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 25.
 27. Dược phẩm bao gồm:
phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 25.
 28. Dược phẩm theo khía cạnh 27, trong đó dược phẩm này dùng để điều trị bệnh viêm.
 29. Phương pháp ức chế sự biểu hiện của gen đích, trong đó phương pháp này bao gồm bước:
sử dụng phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 25.
 30. Phương pháp theo khía cạnh 29, trong đó phương pháp này bao gồm bước:
sử dụng phân tử axit nucleic sợi đơn cho tế bào, mô, hoặc cơ quan.
 31. Phương pháp theo khía cạnh 30, trong đó phân tử axit nucleic sợi đơn được sử dụng *in vivo* hoặc *in vitro*.
 32. Phương pháp theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 29 đến 31, trong đó sự

biểu hiện của gen bị ức chế bằng kỹ thuật can thiệp ARN.

33. Phương pháp tạo ra sự can thiệp ARN để ức chế sự biểu hiện của gen đích, phương pháp này bao gồm bước:

sử dụng phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 25.

34. Phương pháp điều trị bệnh, trong đó phương pháp này bao gồm bước:

cho bệnh nhân sử dụng phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 25,

trong đó phân tử axit nucleic sợi đơn chứa trình tự ức chế sự biểu hiện là trình tự ức chế sự biểu hiện của gen gây bệnh.

35. Sử dụng phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 25 để ức chế sự biểu hiện của gen đích.

36. Sử dụng phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 25 để tạo ra sự can thiệp ARN.

37. Phân tử axit nucleic để sử dụng trong điều trị bệnh, trong đó:

phân tử axit nucleic là phân tử axit nucleic sợi đơn theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh từ 1 đến 25, và

phân tử axit nucleic sợi đơn chứa trình tự ức chế sự biểu hiện là trình tự ức chế sự biểu hiện của gen gây bệnh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử ARN sợi đơn bao gồm:

chỉ một trình tự ức chế sự biểu hiện để ức chế sự biểu hiện của gen đích, trong đó đầu 5' và đầu 3' không được liên kết với nhau,

phân tử ARN sợi đơn chứa, theo trình tự từ đầu 5' đến đầu 3': vùng đầu 5' (Xc); vùng bên trong (Z) chứa trình tự ức chế sự biểu hiện; và vùng đầu 3' (Yc),

vùng bên trong (Z) gồm vùng bên trong đầu 5' (X) và vùng bên trong đầu 3' (Y) được liên kết với nhau,

vùng đầu 5' (Xc) bổ trợ cho vùng bên trong đầu 5' (X) và sợi kép được tạo ra bởi sự gấp cuộn lại của vùng (Xc) về phía vùng (X) và sự tự liên kết bổ sung của các vùng (Xc) và (X),

vùng đầu 3' (Yc) bổ trợ cho vùng bên trong đầu 3' (Y), và sợi kép được tạo ra bởi sự gấp cuộn lại của vùng (Yc) về phía vùng (Y) và sự tự liên kết bổ sung của các vùng (Yc) và (Y),

vùng liên kết (Lx) có mặt ở giữa vùng đầu 5' (Xc) và vùng bên trong đầu 5' (X),

vùng đầu 5' (Xc) và vùng bên trong đầu 5' (X) được liên kết với nhau qua vùng liên kết (Lx),

vùng liên kết (Lx) chứa gốc không phải nucleotit,

vùng liên kết (Ly) có mặt ở giữa vùng đầu 3' (Yc) và vùng bên trong đầu 3' (Y),

vùng đầu 3' (Yc) và vùng bên trong đầu 3' (Y) được liên kết với nhau qua vùng liên kết (Ly), và

số lượng bazơ (Z) ở vùng bên trong (Z), số lượng bazơ (X) ở vùng bên trong đầu 5' (X), số lượng bazơ (Y) ở vùng bên trong đầu 3' (Y), số lượng bazơ (Xc) ở vùng đầu 5' (Xc), và số lượng bazơ (Yc) ở vùng đầu 3' (Yc) thoả mãn các điều kiện từ (a) đến (d):

(a) các điều kiện của biểu thức (1) và (2) được thoả mãn:

$$Z = X + Y \quad \dots (1)$$

$$Z \geq Xc + Yc \quad \dots (2);$$

(b) Z nằm trong khoảng từ 19 đến 30;

(c) X_c nằm trong khoảng từ 1 đến 7 hoặc Y_c nằm trong khoảng từ 1 đến 9; và

(d) $Z - (X_c + Y_c) = 0$ hoặc 1 đến 10.

2. Phân tử ARN sợi đơn theo điểm 1, trong đó số lượng bazơ (X) ở vùng bên trong đầu 5' (X), số lượng bazơ (X_c) ở vùng đầu 5' (X_c), số lượng bazơ (Y) ở vùng bên trong đầu 3' (Y), và số lượng bazơ (Y_c) ở vùng đầu 3' (Y_c) thỏa mãn điều kiện bất kỳ trong số các điều kiện từ (a) đến (d):

(a) điều kiện của biểu thức (3) và (4) được thỏa mãn;

$$X > X_c \quad \dots (3)$$

$$Y = Y_c \quad \dots (4)$$

(b) điều kiện của biểu thức (5) và (6) được thỏa mãn;

$$X = X_c \quad \dots (5)$$

$$Y > Y_c \quad \dots (6)$$

(c) điều kiện của biểu thức (7) và (8) được thỏa mãn;

$$X > X_c \quad \dots (7)$$

$$Y > Y_c \quad \dots (8)$$

(d) điều kiện của biểu thức (9) và (10) được thỏa mãn;

$$X = X_c \quad \dots (9)$$

$$Y = Y_c \quad \dots (10).$$

3. Phân tử ARN sợi đơn theo điểm 2, trong đó theo các điều kiện (a) đến (d), sự khác biệt giữa số lượng bazơ (X) ở vùng bên trong đầu 5' (X) và số lượng bazơ (X_c) ở vùng đầu 5' (X_c), và sự khác biệt giữa số lượng bazơ (Y) ở vùng bên trong đầu 3' (Y) và số lượng bazơ (Y_c) ở vùng đầu 3' (Y_c) thỏa mãn các điều kiện sau:

(a) điều kiện của biểu thức (11) và (12) được thỏa mãn;

$$X - X_c = 1, 2 \text{ hoặc } 3 \quad \dots (11)$$

$$Y - Y_c = 0 \quad \dots (12)$$

(b) điều kiện của biểu thức (13) và (14) được thỏa mãn;

$$X - X_c = 0 \quad \dots (13)$$

$$Y - Y_c = 1, 2 \text{ hoặc } 3 \quad \dots (14)$$

(c) điều kiện của biểu thức (15) và (16) được thỏa mãn;

$$X - X_c = 1, 2 \text{ hoặc } 3 \quad \dots (15)$$

$$Y - Y_c = 1, 2 \text{ hoặc } 3 \quad \dots (16)$$

(d) điều kiện của biểu thức (17) và (18) được thỏa mãn;

$$X - X_c = 0 \quad \dots (17)$$

$$Y - Y_c = 0 \quad \dots (18).$$

4. Phân tử ARN sợi đơn theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó

(a) số lượng bazơ (X_c) ở vùng đầu 5' (X_c) nằm trong khoảng từ 1 đến 3; và/hoặc

(b) số lượng bazơ (Y_c) ở vùng đầu 3' (Y_c) nằm trong khoảng từ 1 đến 7.

5. Phân tử ARN sợi đơn theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó số lượng bazơ (Y_c) ở vùng đầu 3' (Y_c) nằm trong khoảng từ 1 đến 3.

6. Phân tử ARN sợi đơn theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phân tử ARN sợi đơn:

(a) chứa ít nhất một gốc được cải biến;

(b) phân tử này còn chứa chất đánh dấu; và/hoặc

(c) phân tử này còn chứa chất đồng vị ổn định.

7. Phân tử ARN sợi đơn theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó vùng liên kết (L_x) gồm một gốc không phải nucleotit hoặc gồm một gốc nucleotit và một gốc không phải nucleotit và/hoặc vùng liên kết (L_y) gồm ít nhất một gốc nucleotit và một

gốc không phải nucleotit, tốt hơn là trong đó gốc nucleotit là gốc nucleotit không được cải biến và/hoặc gốc nucleotit được cải biến.

8. Phân tử ARN sợi đơn theo điểm 7, trong đó vùng liên kết (Lx) gồm gốc bất kỳ trong số các gốc từ (4) đến (7) và/hoặc vùng liên kết (Ly) gồm gốc bất kỳ trong số các gốc từ (1) đến (7):

- (1) gốc nucleotit không được cải biến
- (2) gốc nucleotit được cải biến
- (3) gốc nucleotit không được cải biến và gốc nucleotit được cải biến
- (4) gốc không phải nucleotit
- (5) gốc không phải nucleotit và gốc nucleotit không được cải biến
- (6) gốc không phải nucleotit và gốc nucleotit được cải biến
- (7) gốc không phải nucleotit, gốc nucleotit không được cải biến, và gốc nucleotit được cải biến.

9. Phân tử ARN sợi đơn theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó

- (a) tổng số bazơ trong phân tử ARN sợi đơn lớn hơn hoặc bằng 50;
- (b) sự biểu hiện của gen bị ức chế bằng kỹ thuật can thiệp ARN; và/hoặc
- (c) trình tự bazơ của phân tử ARN sợi đơn là trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 13 và 32-35.

10. Chế phẩm dùng để ức chế sự biểu hiện của gen đích, trong đó chế phẩm này bao gồm:

phân tử ARN sợi đơn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.

11. Dược phẩm bao gồm:

phân tử ARN sợi đơn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.

12. Phương pháp ức chế sự biểu hiện của gen đích *in vitro*, trong đó phương pháp này bao gồm bước:
- sử dụng phân tử ARN sợi đơn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, và sử dụng phân tử ARN sợi đơn cho tế bào, mô, hoặc cơ quan, tốt hơn là trong đó sự biểu hiện của gen bị ức chế bằng kỹ thuật can thiệp ARN.
13. Phương pháp tạo ra sự can thiệp ARN để ức chế sự biểu hiện của gen đích *in vitro*, phương pháp này bao gồm bước:
- sử dụng phân tử ARN sợi đơn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BONAC CORPORATION

<120> PHÂN TỬ ARN SỢI ĐƠN ĐỂ ỨC CHẾ SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN
VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PHÂN TỬ NÀY

<130> TF11005WO

<150> JP 2010-156122

<151> 2010-07-08

<150> JP 2010-174915

<151> 2010-08-03

<150> JP 2010-230806

<151> 2010-10-13

<150> JP 2010-230808

<151> 2010-10-13

<150> JP 2010-269823

<151> 2010-12-02

<150> JP 2010-269824

<151> 2010-12-02

<160> 80

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 19

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 1

guugucauc uucucagg

19

<210> 2

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 2

caugagaagu augacaacag cccacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucuucgg 60

aa

62

<210> 3
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> sợi có nghĩa

<400> 3
 ccaugagaag uaugacaaca g 21

<210> 4
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> sợi đối nghĩa

<400> 4
 guugucauac uucucauggu u 21

<210> 5
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 5
 auuguaacga gacaaacac 19

<210> 6
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 6
 uugcgcuuuu uggugacgc 19

<210> 7
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> phân tử axit nucleic

<400> 7
agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuuc ggaaccauga gaaguaugac 60

aa 62

<210> 8
<211> 58
<212> ARN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> phân tử axit nucleic

<400> 8
accaugagaa guaugacaac agccuucggg cuguugucau acuucucaug guucaugg 58

<210> 9
<211> 23
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 9
ggagaaggct ggggctcatt tgc 23

<210> 10
<211> 23
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 10
tgccagggg tgctaagcag ttg 23

<210> 11
<211> 23
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 11
gccacggctg ctccagctc ctc 23

<210> 12

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 12
 aggtctttgc g gatgtccac gtcac 25

<210> 13
 <211> 51
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> phân tử axit nucleic

<400> 13
 caugagaagu augacaacag ccggcuguug ucauacuucu caugguucga a 51

<210> 14
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> phân tử axit nucleic

<400> 14
 augacaacag cccacacccg gcuguuguca uacuucucau gguucuucgg aaccaugaga 60
 ag 62

<210> 15
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> phân tử axit nucleic

<400> 15
 ugucagugcu cauuuacaag cccacacccg gcuuguaaaau gagcacugac acuucuucgg 60
 aa 62

<210> 16
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> siARN

 <400> 16
 aaagucuaug uacagcugcu u 21

 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mồi

 <400> 17
 ccattgctgt cccgtgcaga gctg 24

 <210> 18
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mồi

 <400> 18
 atggtagccc ttgggctcgt ggatc 25

 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mồi

 <400> 19
 gtcgtaccac aggcattgtg atgg 24

 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mồi

 <400> 20
 gcaatgcctg ggtacatggg gg 22

 <210> 21

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 21
 cccttattga cctcaactac atggg 25

<210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 22
 gaggggcat ccacagtctt ctg 23

<210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 23
 actccacgtg gaaatcaacg g 21

<210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 24
 tagtagacga tgggcagtg 20

<210> 25
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi

<400> 25

atggctagrc tctgtgcttc ct

22

<210> 26

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 26

agggctctcc agayttctgc tctg

24

<210> 27

<211> 21

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 27

catcaactat aagcagctcc a

21

<210> 28

<211> 21

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 28

ttcaagtgga gagcagttca g

21

<210> 29

<211> 61

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 29

agcuguacau ugacuuuagc cccacaccgg cuaaagucua uguacagcug cuucuucgga 60

a

61

<210> 30

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 30

agcagcugua cauugacuuu agccccacac cggcuaaagu caauguacag cugcuucuuc 60

gg

62

<210> 31

<211> 61

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 31

gcagcuguac auugacuuua gccccacacc ggcuaaaguc aauguacagc ugcucuucg 60

g

61

<210> 32

<211> 51

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 32

cagcuguaca uugacuuuag ccggcuaaag ucaauguaca gcugcuucga a 51

<210> 33

<211> 50

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 33

agcuguacau ugacuuuagc cggcuaaagu caauguacag cugcuucgaa 50

<210> 34

<211> 51

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 34
agcagcugua cauugacuuu agccggcuaa agucaaugua cagcugcuuc g 51

<210> 35
<211> 50
<212> ARN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> phân tử axit nucleic

<400> 35
gcagcuguac auugacuuua gccggcuaaa gucaauguac agcugcuucg 50

<210> 36
<211> 51
<212> ARN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> phân tử axit nucleic

<400> 36
ugucagugcu cauuuacaag ccggcuugua aaugagcacu gacacuucga a 51

<210> 37
<211> 63
<212> ARN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> phân tử axit nucleic

<400> 37
accaugagaa guaugacaac agccuuaag agaggcuguu gucauacuuc ucaugguuca 60

ugg 63

<210> 38
<211> 51
<212> ARN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> phân tử axit nucleic

<400> 38
ccaaucaaga uaagugaaag ccggcuuua cuuaucguug auggcuucga a 51

<210> 39

<211> 21
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> sợi có nghĩa

<400> 39
 gcagcuguac auugacuuua g 21

<210> 40
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> sợi đối nghĩa

<400> 40
 aaagucaaug uacagcugcu u 21

<210> 41
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> sợi có nghĩa

<400> 41
 gugucagugc ucauuuacaa g 21

<210> 42
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> sợi đối nghĩa

<400> 42
 uguaaaugag cacugacacu u 21

<210> 43
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> phân tử axit nucleic

<400> 43

uguuugucuc guuacaauau cccacaccg gauauuguaa cgagacaaac acuccuucgg 60

ga 62

<210> 44
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> phân tử axit nucleic

<400> 44
 aguguuuguc ucguuacaau aucccccacac cggauauugu aacgagacaa acacuccuuc 60

gg 62

<210> 45
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 45
 aaagctgcca atgccctcg acc 23

<210> 46
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 46
 taggtgggtg gccctcgtct tg 22

<210> 47
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> phân tử axit nucleic

<400> 47
 cgucacaaa aagcgcaau cccacaccg gaauugcgcu uuuuggugac gcuucucgg 60

aa 62

<210> 48
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> phân tử axit nucleic

<400> 48
 agcgucacca aaaagcgcaa uuccccacac cggaauugcg cuuuuuggug acgcuucuuc 60

gg 62

<210> 49
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 49
 ctggacatca agctggccct ggac 24

<210> 50
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 50
 caccagcttg cgcatggcca cttc 24

<210> 51
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> phân tử axit nucleic

<400> 51
 aaccaugaga aguaugacaa cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucu 60

cg 62

<210> 52
 <211> 62
 <212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 52

accaugagaa guaagacaac agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuuc 60

gg

62

<210> 53

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 53

ccaugagaag uaugacaaca gccccacacc ggcuguuguc auacuucuca ugguucuucg 60

ga

62

<210> 54

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 54

augagaagua ugacaacagc cccacaccgg cuguugucau acuucucaug guucuucgga 60

ac

62

<210> 55

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 55

ugagaagau gacaacagcc ccacaccggc uguugucaua cuucucaugg uucuucggaa 60

cc

62

<210> 56

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 56

agaaguauga caacagcccc acaccggcug uugucauacu ucuaugguu cuucggaacc 60

au

62

<210> 57

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 57

aaguaugaca acagccccac accggcuguu gucauacuuc ucaugguucu ucggaaccau 60

ga

62

<210> 58

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 58

guaugacaac agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuuc ggaaccauga 60

ga

62

<210> 59

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 59

acaacagccc cacaccggcu guugucauac uucuauggu ucuucggaac caugagaagu 60

au

62

<210> 60

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 60

aacagcccca caccggcugu ugucauacuu cucaugguuc uucggaacca ugagaaguau 60

ga

62

<210> 61

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 61

cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucuu cggaaccaug agaaguauga 60

ca

62

<210> 62

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 62

gccccacacc ggcuguuguc auacuucua ugguucucg gaaccaugag aaguaugaca 60

ac

62

<210> 63

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 63

ccccacacc gcuguuguca uacuucucau gguucucgg aaccaugaga aguaugacaa 60

ca

62

<210> 64

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 64

cccacaccgg cuguugucau acuucucaug guucucgga accaugagaa guaugacaac 60

ag

62

<210> 65

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 65

ccacaccggc uguugucaua cuucucaugg uucucggaa ccaugagaag uaugacaaca 60

gc

62

<210> 66

<211> 64

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 66

aaccaugaga agaugacaa cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucgu 60

ucgc

64

<210> 67

<211> 60

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 67

accaugagaa guaugacaac agccacacc gcuguuguca uacuucucau gguucucgg 60

<210> 68

<211> 58

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 68

ccaugagaag uaugacaaca gcccacaccg cuguugucau acuucucaug guuuucga 58

<210> 69

<211> 58

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 69

accaugagaa guaugacaac agccacaccc uguugucaua cuucucaugg uucuucgg 58

<210> 70

<211> 56

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 70

ccaugagaag uaugacaaca gccacacccu guugucauac uucucauggu uuucga 56

<210> 71

<211> 54

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 71

caugagaagu augacaacag ccacaccug uugucauacu ucucaugguu ucga 54

<210> 72

<211> 54

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 72

ccaugagaag uaugacaaca ccacaccugu ugucauacuu cucaugguuu ucga 54

<210> 73

<211> 52
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> phân tử axit nucleic

<400> 73
 caugagaagu augacaacac cacaccuguu gucauacuuc ucaugguuuc ga 52

<210> 74
 <211> 63
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> phân tử axit nucleic

<400> 74
 aaccaugaga agaugacaa cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucuu 60
 cgg 63

<210> 75
 <211> 61
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> phân tử axit nucleic

<400> 75
 ccaugagaag uaugacaaca gccccacacc ggcuguuguc auacuucuca ugguucucg 60
 g 61

<210> 76
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> phân tử axit nucleic

<400> 76
 caugagaagu augacaacag cccacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucucgg 60

<210> 77
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 77

accaugagaa guaagacaac agccuucggg cuguugucau acuucucaug guucccacac 60

cg

62

<210> 78

<211> 65

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 78

ggaaccauga gaaguaugac aacagccaag ucuuggcugu ugucuaucu cucaugguuc 60

cucug

65

<210> 79

<211> 63

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 79

ggaaccauga gaaguaugac aacagccaag cuuggcuguu gucauacuuc ucaugguucc 60

ucg

63

<210> 80

<211> 62

<212> ARN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> phân tử axit nucleic

<400> 80

cagcuguaca uugacuuuag cccacaccg gcuaaaguca auguacagcu gcuucuucgg 60

aa

62

1/23

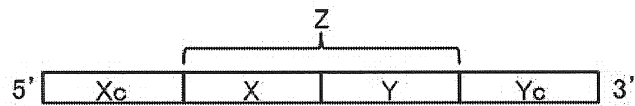


FIG. 1A

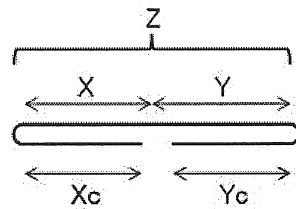


FIG. 1B

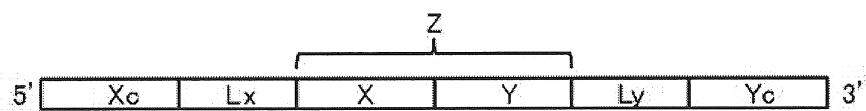


FIG. 2A

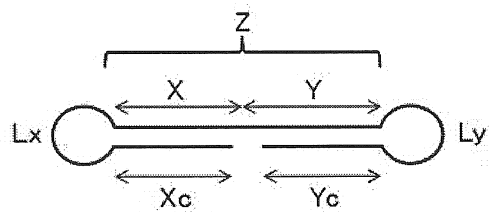


FIG. 2B

2/23

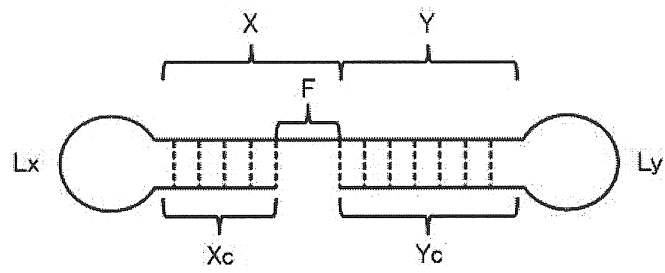


FIG. 3A

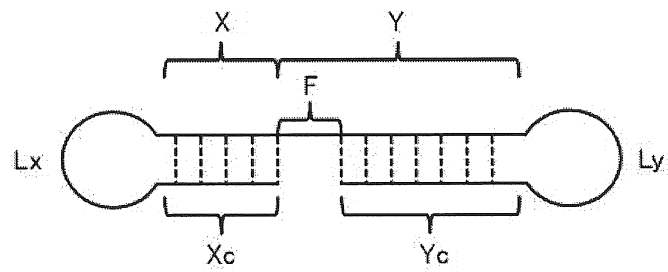


FIG. 3B

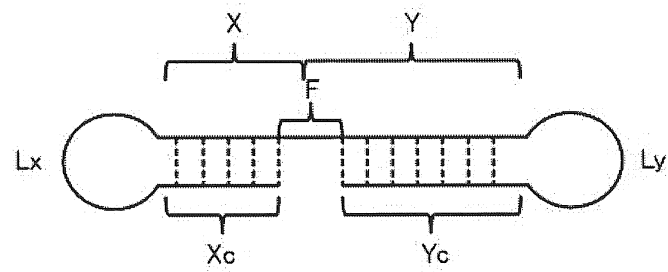


FIG. 3C

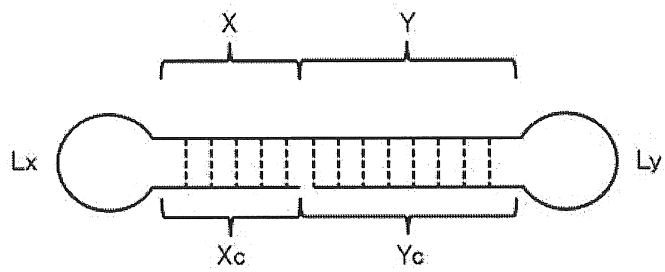


FIG. 3D

3/23

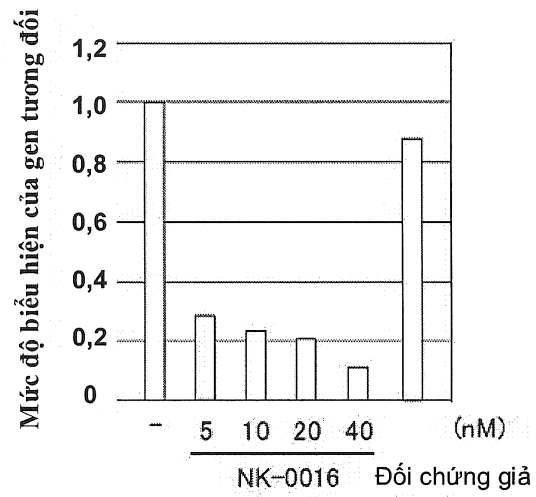


FIG. 4

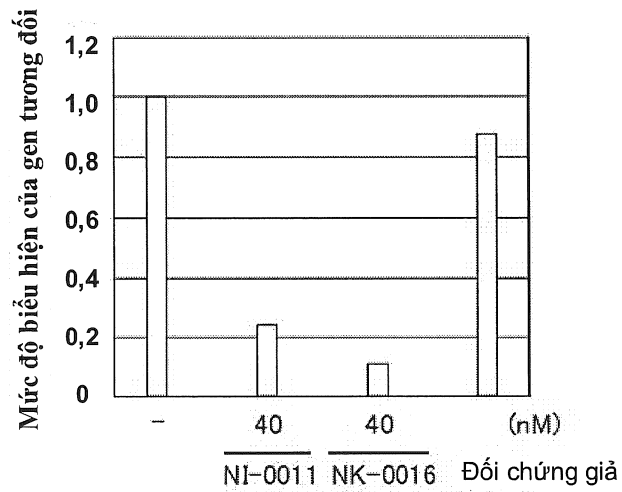


FIG. 5

4/23

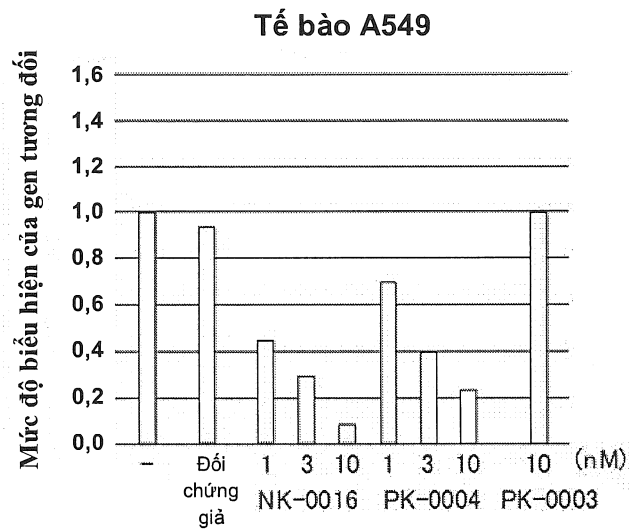


FIG. 6

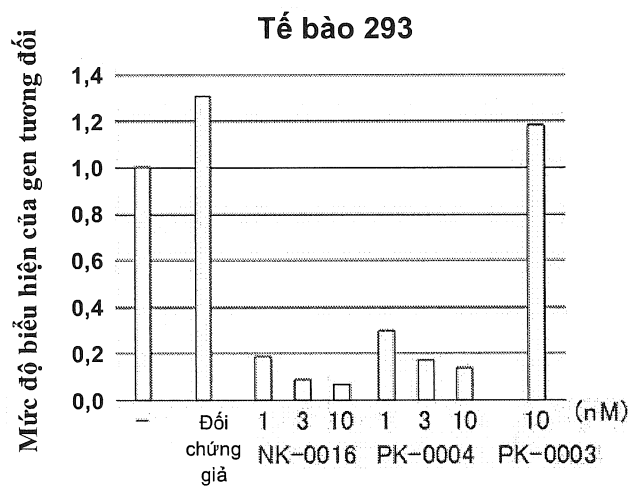


FIG. 7

5/23

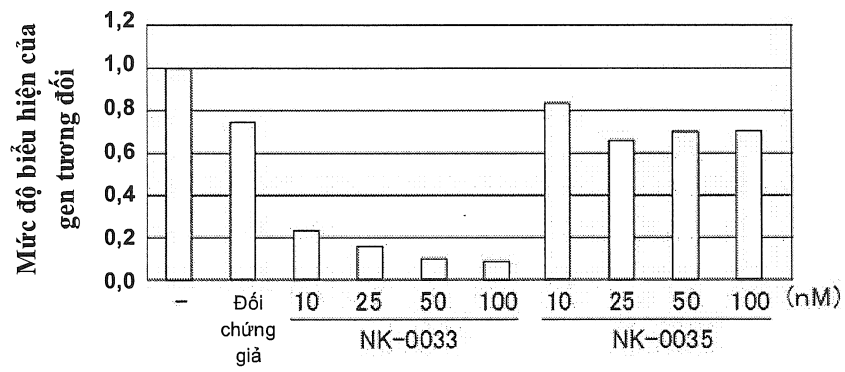


FIG. 8

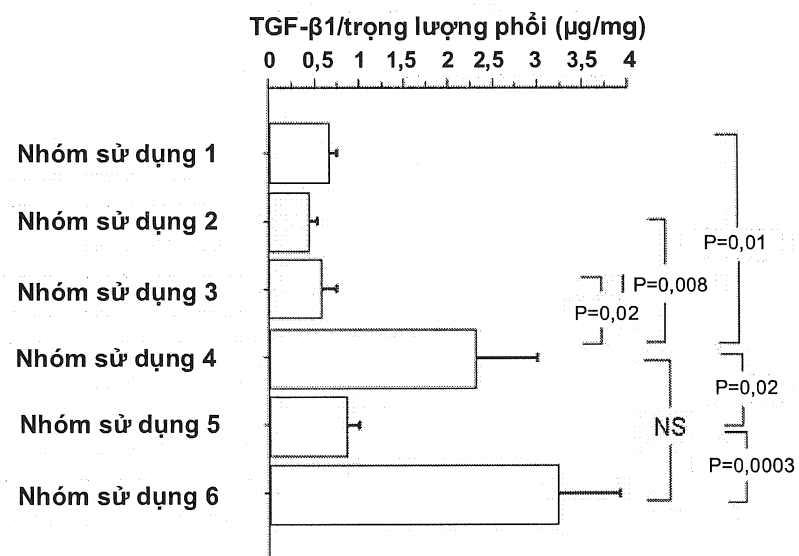


FIG. 9

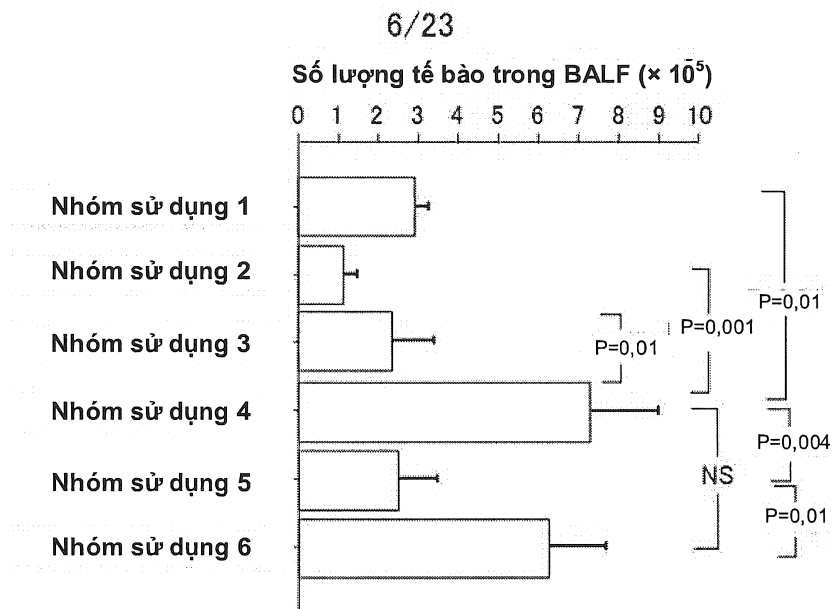


FIG. 10

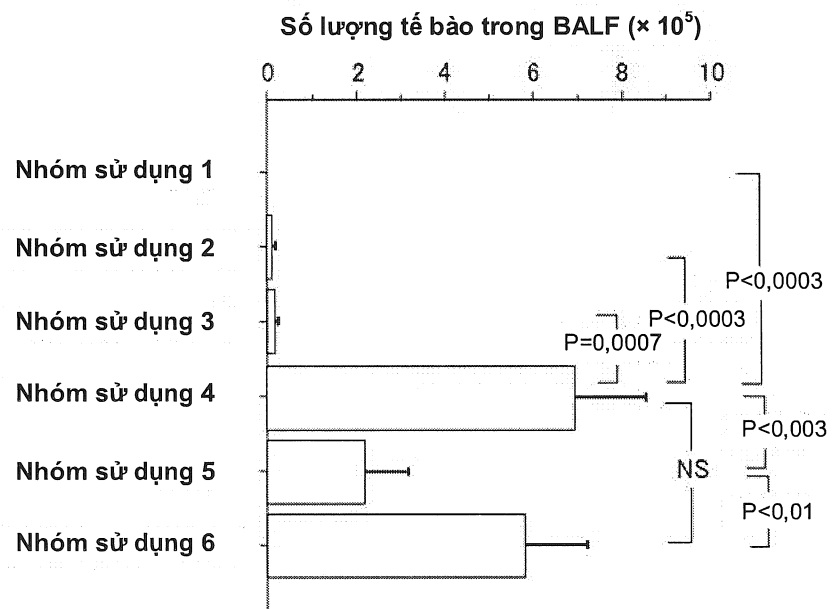


FIG. 11

7/23

ARN sợi đơn (-)

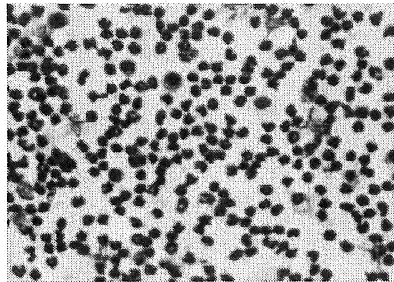


FIG. 12A

NK-0035 (+)

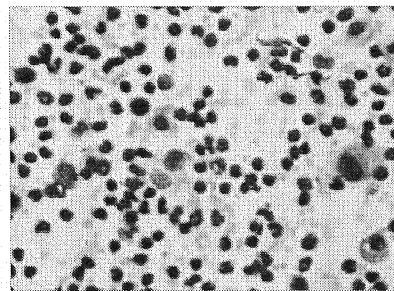


FIG. 12B

NK-0033 (+)

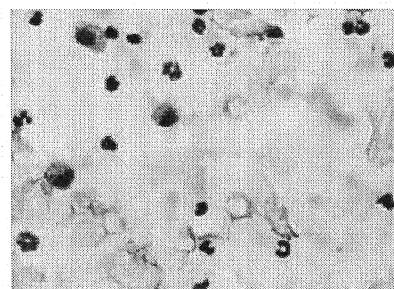


FIG. 12C

8/23

ARN sợi đơn (-)

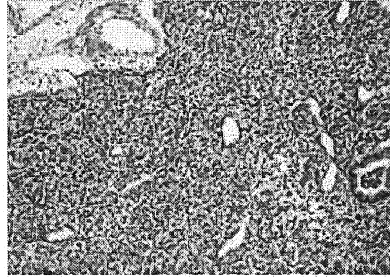


FIG. 13A

NK-0035 (+)

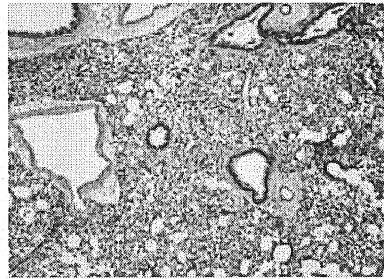


FIG. 13B

NK-0033 (+)

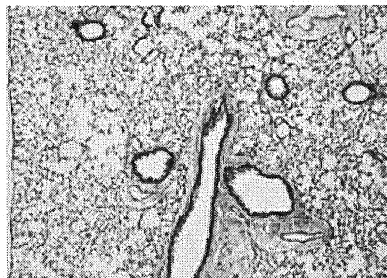


FIG. 13C

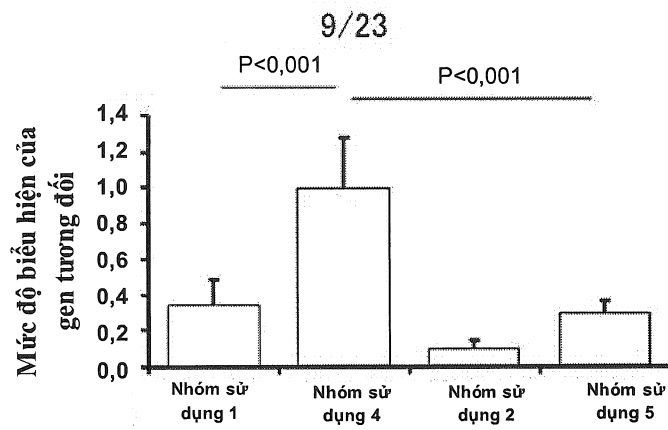


FIG. 14A

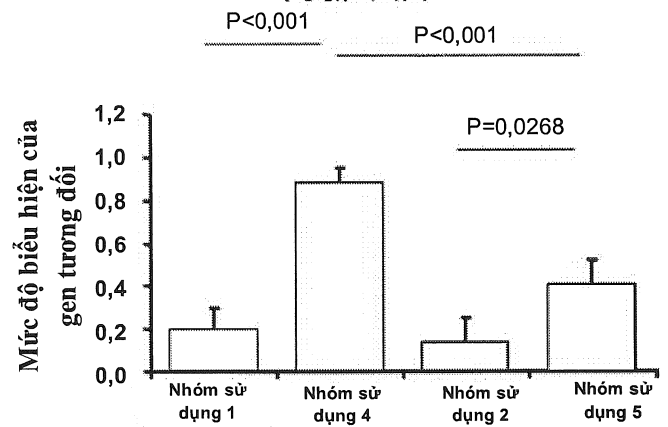


FIG. 14B

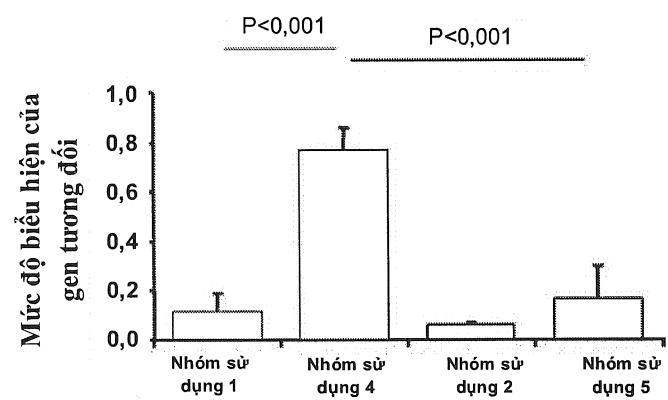
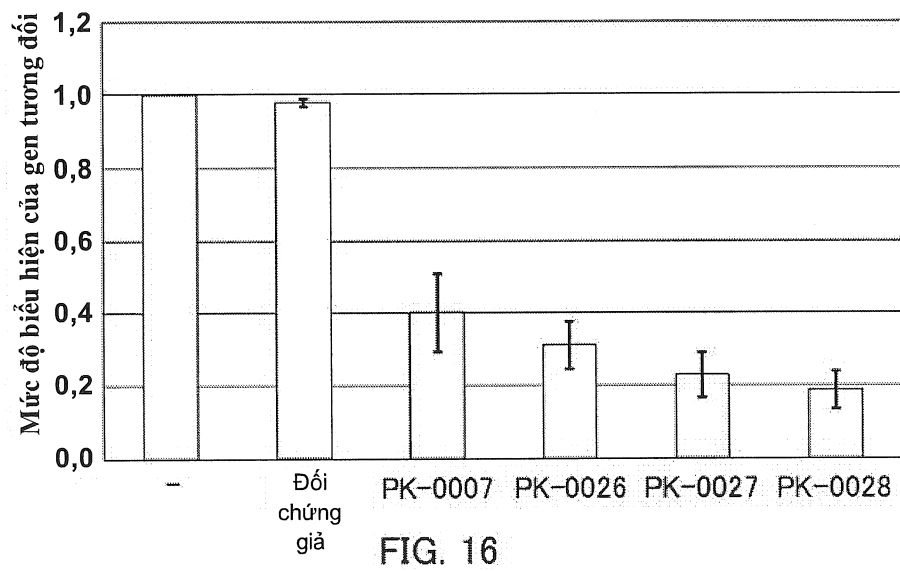
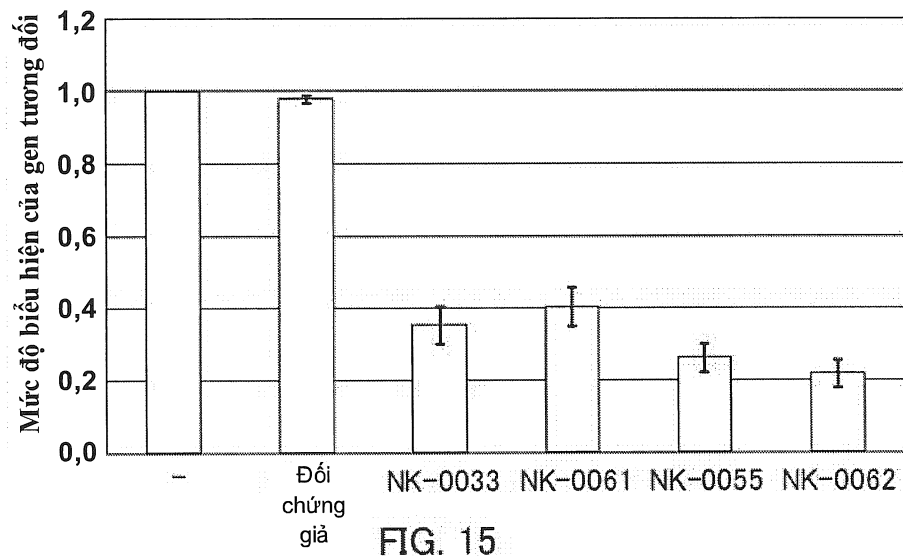


FIG. 14C

10/23



11/23

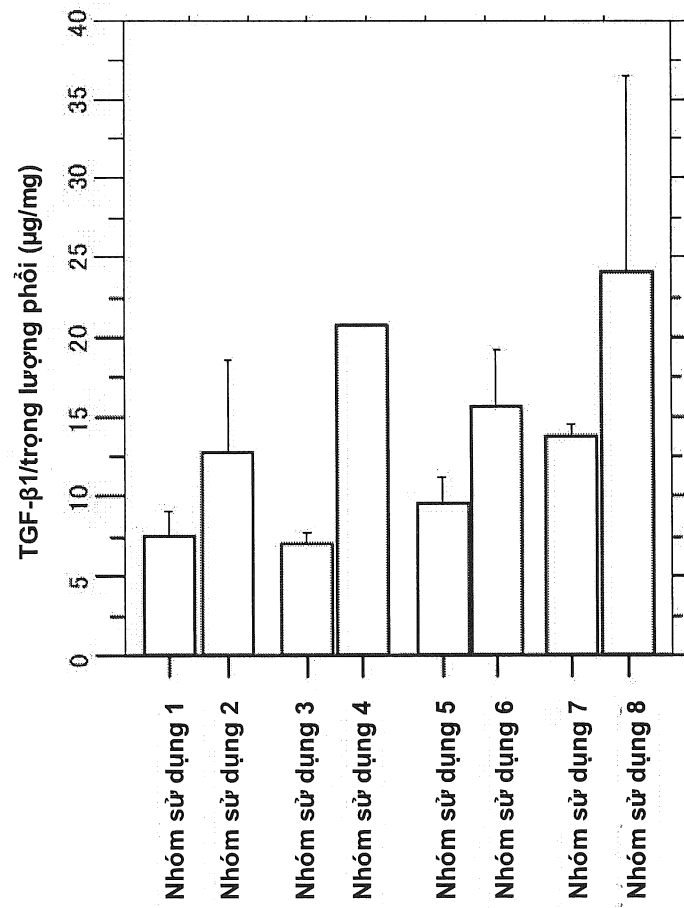


FIG. 17

12/23

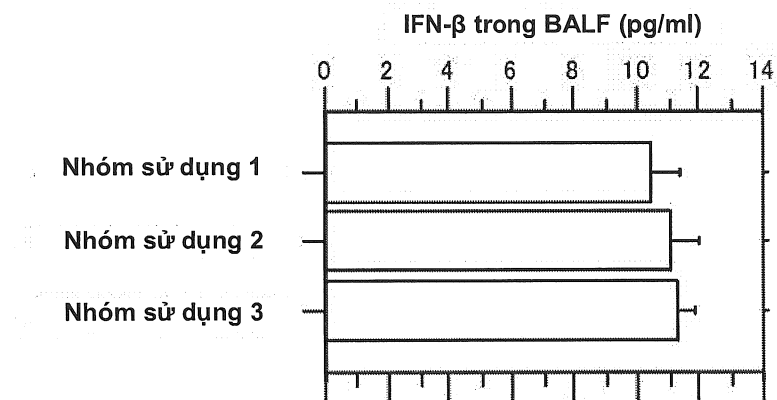


FIG. 18A

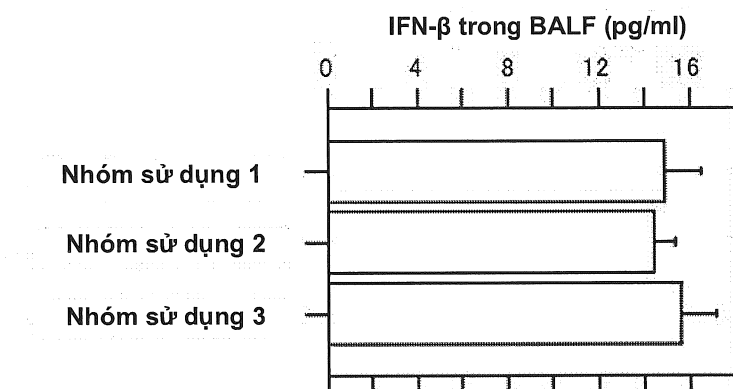


FIG. 18B

13/23

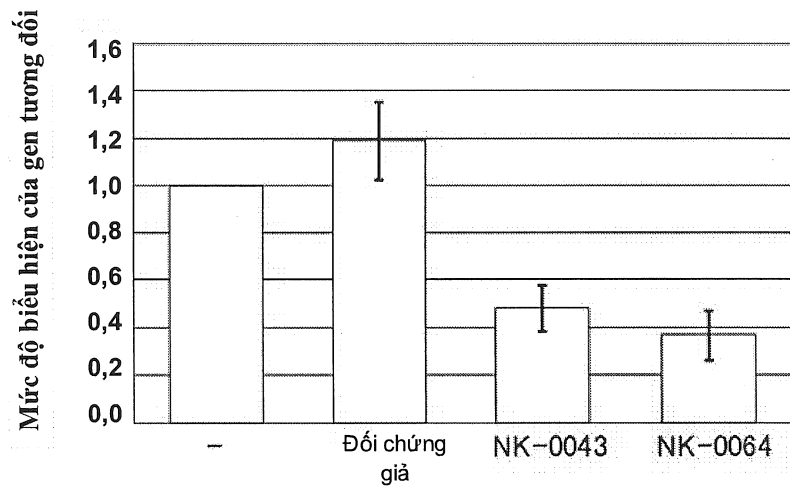


FIG. 19

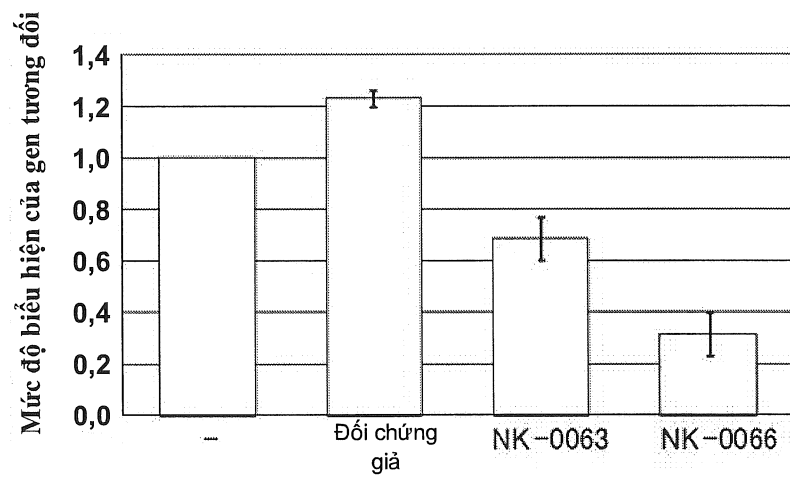


FIG. 20

14/23

NK-0036	Xc/Yc	25/1	5'- <u>aacc</u> auu <u>ga</u> aa <u>gu</u> uu <u>ga</u> aa <u>ga</u> g <u>cc</u> cc <u>ac</u> ac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cg -3' 51
NK-0025		24/1	5'- <u>acc</u> auu <u>ga</u> aa <u>gu</u> uu <u>ga</u> aa <u>ga</u> g <u>cc</u> cc <u>ac</u> ac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cg -3' 52
NK-0037		23/2	5'- <u>gca</u> u <u>u</u> g <u>ga</u> aa <u>gu</u> uu <u>ga</u> aa <u>ga</u> g <u>cc</u> cc <u>ac</u> ac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cgga -3' 53
NK-0016		22/3	5'- <u>gcu</u> u <u>u</u> g <u>ga</u> aa <u>gu</u> uu <u>ga</u> aa <u>ga</u> g <u>cc</u> cc <u>ac</u> ac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cgga -3' 2
NK-0038		21/4	5'- <u>au</u> u <u>u</u> g <u>ga</u> aa <u>gu</u> uu <u>ga</u> aa <u>ga</u> g <u>cc</u> cc <u>ac</u> ac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cggaac -3' 54
NK-0026		20/5	5'- <u>uu</u> u <u>u</u> g <u>ga</u> aa <u>gu</u> uu <u>ga</u> aa <u>ga</u> g <u>cc</u> cc <u>ac</u> ac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cggaac -3' 55
NK-0027		18/7	5'- <u>aga</u> u <u>u</u> g <u>ga</u> aa <u>gu</u> uu <u>ga</u> aa <u>ga</u> g <u>cc</u> cc <u>ac</u> ac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cggaac -3' 56
NK-0028		16/9	5'- <u>au</u> u <u>u</u> g <u>ga</u> aa <u>gu</u> uu <u>ga</u> aa <u>ga</u> g <u>cc</u> cc <u>ac</u> ac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cggaac -3' 57
NK-0029		14/11	5'- <u>gu</u> u <u>u</u> g <u>ga</u> aa <u>gu</u> uu <u>ga</u> aa <u>ga</u> g <u>cc</u> cc <u>ac</u> ac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cggaac -3' 58
NK-0014		12/13	5'- <u>au</u> u <u>u</u> g <u>ga</u> aa <u>gu</u> uu <u>ga</u> aa <u>ga</u> g <u>cc</u> cc <u>ac</u> ac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cggaac -3' 14
NK-0030		9/16	5'- <u>aca</u> u <u>u</u> g <u>ga</u> aa <u>gu</u> uu <u>ga</u> aa <u>ga</u> g <u>cc</u> cc <u>ac</u> ac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cggaac -3' 59
NK-0031		7/18	5'- <u>aa</u> ca <u>u</u> g <u>ga</u> aa <u>gu</u> uu <u>ga</u> aa <u>ga</u> g <u>cc</u> cc <u>ac</u> ac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cggaac -3' 60
NK-0020		5/20	5'- <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ga</u> aa <u>gu</u> uu <u>ga</u> aa <u>ga</u> g <u>cc</u> cc <u>ac</u> ac <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cggaac -3' 61
NK-0019		4/21	5'- <u>ag</u> cc <u>ca</u> ca <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cggaac -3' 7
NK-0018		3/22	5'- <u>gc</u> cc <u>ca</u> ca <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cggaac -3' 62
NK-0039		2/23	5'- <u>gc</u> cc <u>ca</u> ca <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cggaac -3' 63
NK-0032		1/24	5'- <u>gc</u> cc <u>ca</u> ca <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cggaac -3' 64
NK-0040		1/25	5'- <u>gc</u> cc <u>ca</u> ca <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>ca</u> u <u>u</u> g <u>gu</u> u <u>u</u> cggaac -3' 65

FIG. 21

15/23

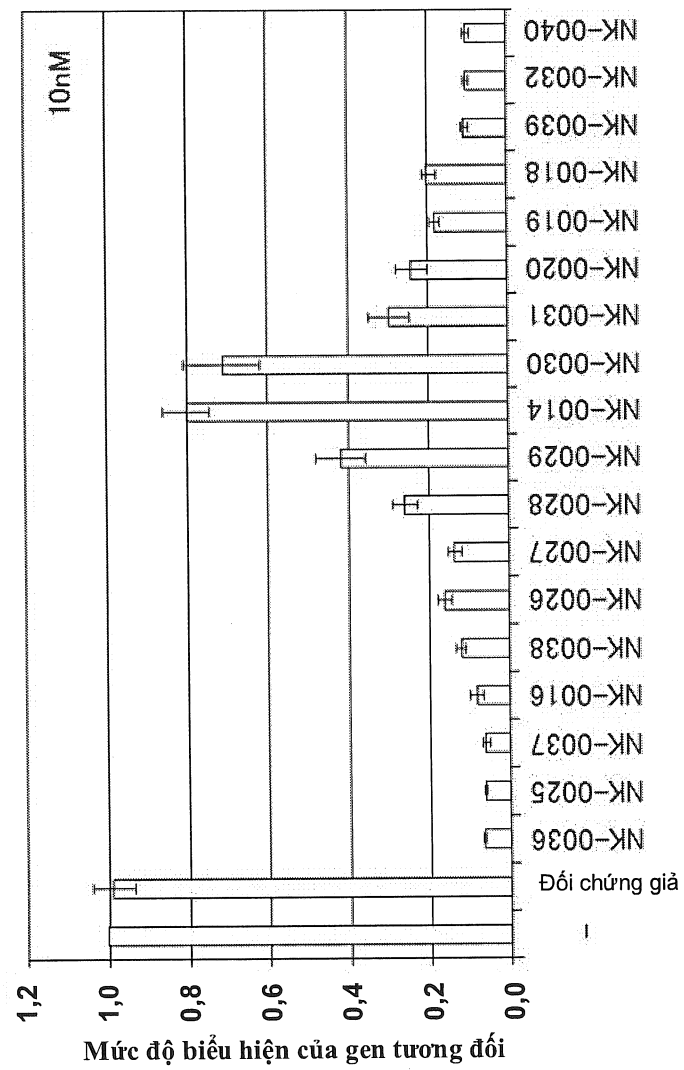


FIG. 22

Xc+Yc/X+Y					
NK-0047	26/27	5' -	<u>aaaccaugagaaquaugacaaacagcccca</u> <u>caccggcuguu</u> <u>gucacuaucucucaugguu</u> <u>cgcg</u> [*] <u>-3'</u>	66	
NK-0025	25/26	5' -	<u>accuugagaaquaugacaaacagcccca</u> <u>ggcuguu</u> <u>gucacuaucucucaugguu</u> <u>cgcg</u> [*] <u>-3'</u>	52	
NK-0048	24/25	5' -	<u>accuugagaaquaugacaaacagcccca</u> <u>cggcuguu</u> <u>gucacuaucucucaugguu</u> <u>cgcg</u> [*] <u>-3'</u>	67	
NK-0049	23/24	5' -	<u>ccauugagaaquaugacaaacagcccca</u> <u>cgcuguu</u> <u>gucacuaucucucaugguu</u> <u>cgcg</u> [*] <u>-3'</u>	68	
NK-0050	23/24	5' -	<u>accuugagaaquaugacaaacagcccca</u> <u>cggcuguu</u> <u>gucacuaucucucaugguu</u> <u>cgcg</u> [*] <u>-3'</u>	69	16/23
NK-0051	22/23	5' -	<u>ccauugagaaquaugacaaacagcccca</u> <u>cgcuguu</u> <u>gucacuaucucucaugguu</u> <u>cgcg</u> [*] <u>-3'</u>	70	
NK-0052	21/22	5' -	<u>caugagagaaquaugacaaacagcccca</u> <u>cggcuguu</u> <u>gucacuaucucucaugguu</u> <u>cgcg</u> [*] <u>-3'</u>	71	
NK-0053	21/22	5' -	<u>ccauugagaaquaugacaaacagcccca</u> <u>cgcuguu</u> <u>gucacuaucucucaugguu</u> <u>cgcg</u> [*] <u>-3'</u>	72	
NK-0054	20/21	5' -	<u>caugagagaaquaugacaaacagcccca</u> <u>cggcuguu</u> <u>gucacuaucucucaugguu</u> <u>cgcg</u> [*] <u>-3'</u>	73	

FIG. 23

17/23

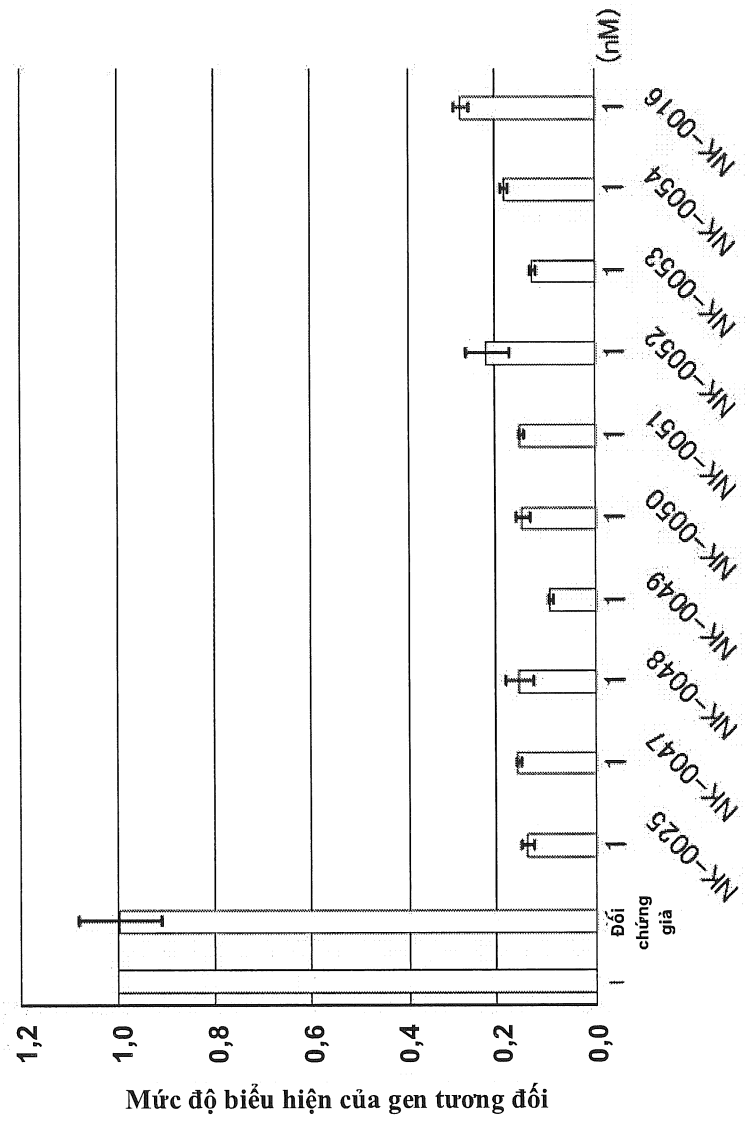


FIG. 24

	XcX	
NK-0001	25/25	5' - <u>aa</u> cc <u>aa</u> ga <u>aa</u> ga <u>aa</u> ga <u>aa</u> ca <u>g</u> cc <u>ca</u> ca <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> ca <u>ua</u> cu <u>u</u> cu <u>u</u> ca <u>ug</u> gu <u>u</u> cu <u>u</u> cg - 3'
NK-0002	23/25	5' - <u>cc</u> au <u>ga</u> ga <u>ga</u> au <u>ga</u> ca <u>ca</u> g <u>cc</u> ca <u>cc</u> aca <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> ca <u>ua</u> cu <u>u</u> cu <u>u</u> ca <u>ug</u> gu <u>u</u> cu <u>u</u> cg ^{**} - 3'
NK-0003	22/25	5' - <u>ca</u> ug <u>ga</u> ga <u>ga</u> au <u>ga</u> ca <u>ca</u> g <u>cc</u> ca <u>cc</u> gg <u>cu</u> gu <u>gu</u> ca <u>ua</u> cu <u>u</u> cu <u>u</u> ca <u>ug</u> gu <u>u</u> cu <u>u</u> cg ^{***} - 3'



5'-accaugagaaguaugacaacagccUUCAGAGAGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCAUGg-3'

Xc
Z
Yc

FIG. 27

20/23

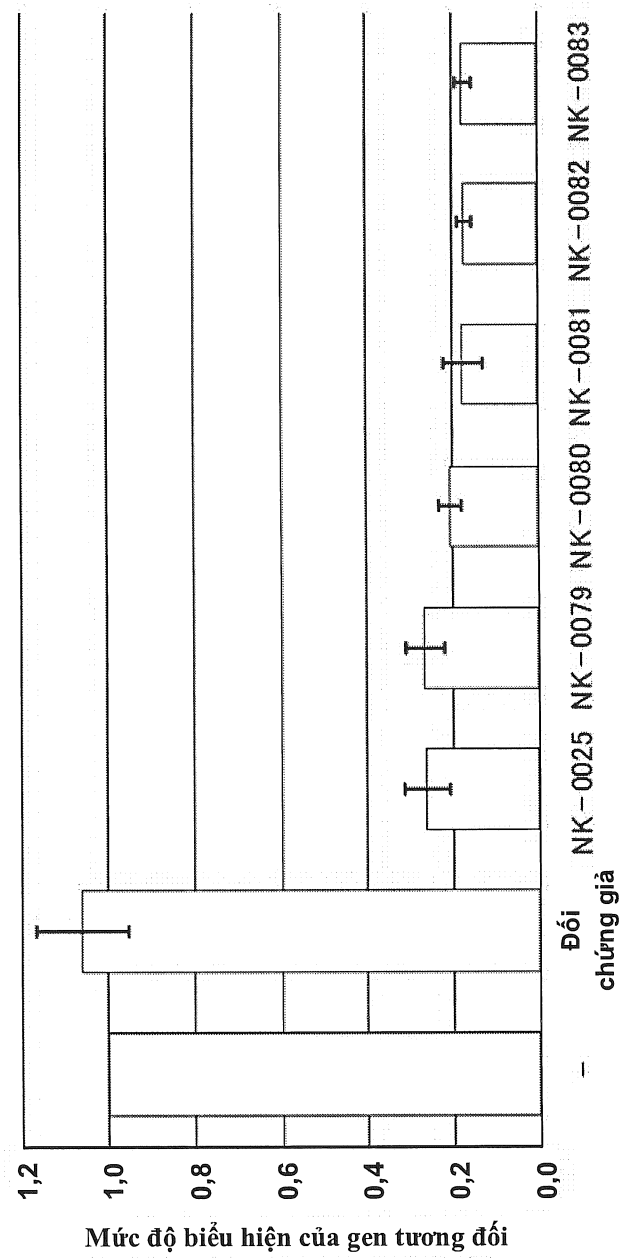


FIG. 28

21/23

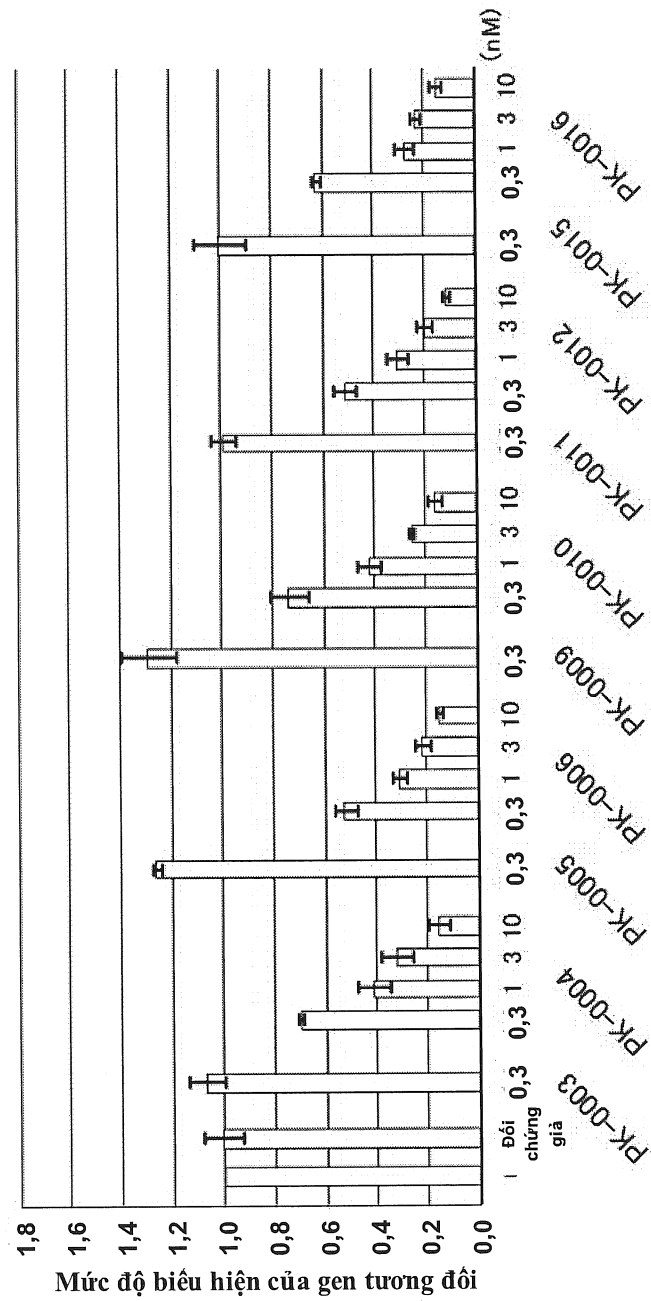


FIG. 29

22/23

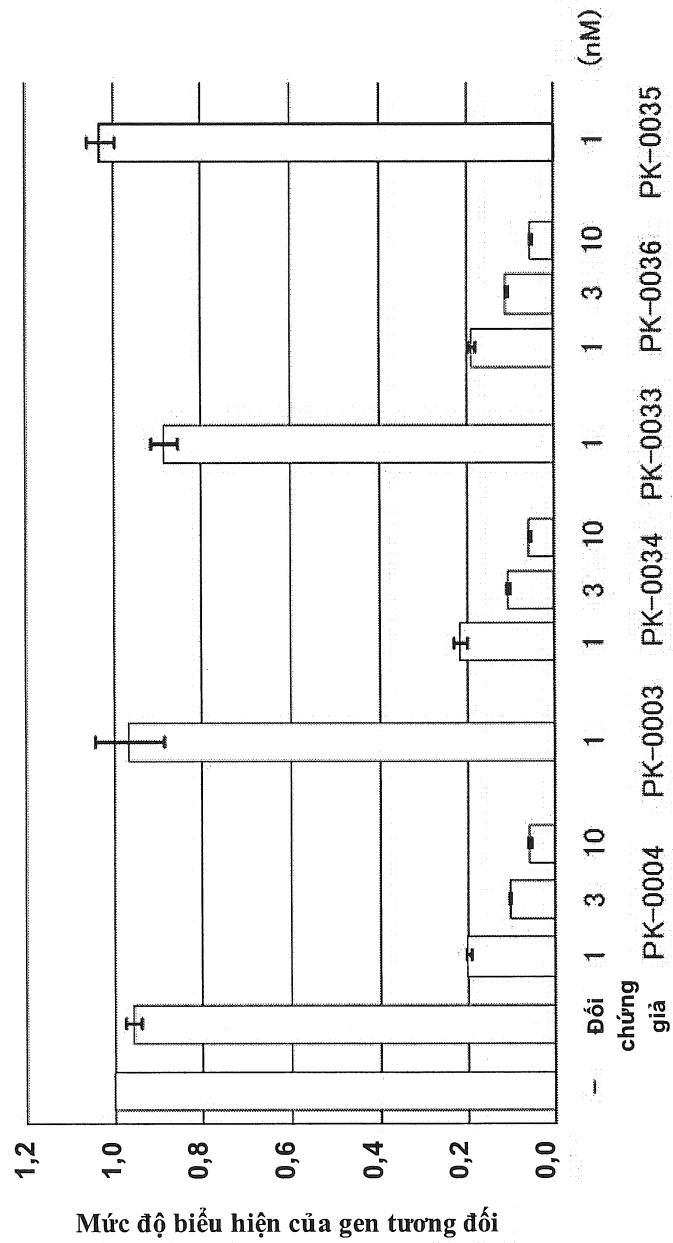


FIG. 30

23/23

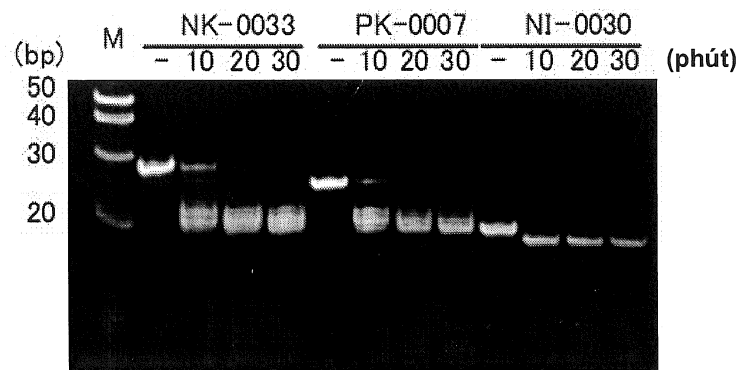


FIG. 31

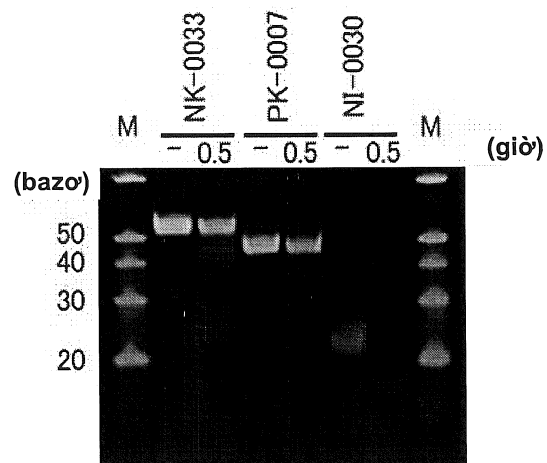


FIG. 32