



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

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

(11)



1-0025883

(51)⁷ C12N 15/113; A61K 48/00; A61P 43/00; (13) B
A61K 31/7105; A61P 11/00

(21) 1-2013-01135

(22) 14/10/2011

(86) PCT/JP2011/073628 14/10/2011

(87) WO 2012/050181 19/04/2012

(30) 2010-231946 14/10/2010 JP

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/07/2013 304A

(73) 1. MIE UNIVERSITY (JP)

1577, Kurimamachiya-cho, Tsu-shi, Mie 514-8507, Japan

2. OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (JP)

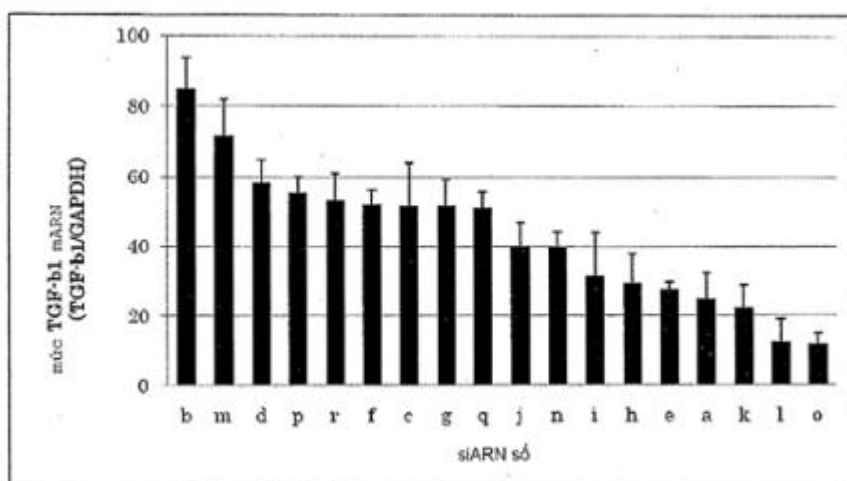
2-9, Kanda Tsukasa-machi, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8535, Japan

(72) GABAZZA, Esteban C (PY); KOBAYASHI, Tetsu (JP); TOYOBUKU, Hidekazu (JP); FUKUDA, Ayako (JP); HASEGAWA, Tetsuya (JP).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) ARN CAN THIỆP NHỎ (SIARN), DƯỢC PHẨM CHỨA SIARN, VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CHẤT ỨC CHẾ SỰ BIỂU HIỆN GEN TGF- β 1

(57) Sáng chế đề cập đến siARN có hiệu quả điều trị chứng xơ hóa và dược phẩm chứa siARN. siARN có chiều dài đầy đủ là 30 nucleotit hoặc ít hơn và hướng đích trình tự có từ 17 đến 23 bazơ liền nhau được chọn từ nhóm bao gồm các bazơ ở các vị trí từ 1285 đến 1318, các bazơ ở các vị trí từ 1398 đến 1418, các bazơ ở các vị trí từ 1434 đến 1463, các bazơ ở các vị trí từ 1548 đến 1579, các bazơ ở các vị trí từ 1608 đến 1628, các bazơ ở các vị trí từ 1700 đến 1726, các bazơ ở các vị trí từ 1778 đến 1798, các bazơ ở các vị trí từ 1806 đến 1826, và các bazơ ở các vị trí từ 1887 đến 1907 của SEQ ID NO: 1. Sáng chế cũng đề cập đến chất ức chế sự biểu hiện gen TGF- β 1 và chất phòng ngừa hoặc điều trị bệnh bao gồm siARN này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất trị liệu chứng xơ hóa. Cụ thể, sáng chế đề cập đến ARN can thiệp nhỏ (small interfering RNA-siARN) hướng đến gen ghi mã yếu tố tăng trưởng chuyển đổi (transforming growth factor-TGF)- β 1 và được phẩm chứa siARN.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chứng xơ hóa phổi đề cập đến triệu chứng trong đó các mô phổi trở nên bị xơ hóa do sự tích tụ quá mức collagen và chất nền ngoại bào khác. Trong sự phân loại chứng xơ hóa phổi, xơ hóa phổi tự phát là bệnh khó chữa mãn tính, có tiên lượng kém về thời gian sống sót trung bình là ba năm và tỷ lệ sống sót trong năm năm nằm trong khoảng từ 20 đến 40%. Để điều trị bệnh xơ hóa phổi, sử dụng thuốc steroid và thuốc ức chế miễn dịch; tuy nhiên, đến nay vẫn chưa có liệu pháp nào có hiệu quả để nâng cao sự tiên lượng bệnh, và do đó có nhu cầu phát triển thuốc trị liệu mới.

Ngày nay, đã phát hiện ra rằng có nhiều bệnh mà sự khởi phát của chúng được cho là do gen, và nhiều gen cũng được báo cáo liên quan đến chứng xơ hóa phổi (các tài liệu sáng chế từ 1 đến 4, Tài liệu phi sáng chế từ 1 đến 6). Là yếu tố chính gây xơ hóa phổi, đã có báo cáo về TGF- β 1 (Tài liệu sáng chế 1 và 2, Tài liệu phi sáng chế từ 2 đến 6), Smad3 (Tài liệu phi sáng chế 1), MCP-1 (Tài liệu sáng chế 3), và yếu tố tương tự.

Trong khi đó, axit nucleic, cụ thể, siARN gây ra sự suy biến mRNA của gen có trình tự giống hoặc giống gần hết với trình tự cụ thể có trong tế bào, do đó ức chế sự biểu hiện của gen đích (can thiệp ARN). Do đó, vai trò ức chế sự biểu hiện của gen đích bằng can thiệp ARN có hiệu quả để cải thiện hoặc điều trị các triệu chứng bệnh do sự biểu hiện bất thường của một gen cụ thể hoặc một nhóm gen. Cũng như gen gây ra chứng xơ hóa phổi, có báo cáo rằng đã có nỗ lực ức chế sự biểu hiện của các gen này bằng siARN (Tài liệu sáng chế từ 1 đến 4, Tài liệu phi sáng chế từ 1 đến 6).

Tuy nhiên, các kỹ thuật được báo cáo cho đến nay chỉ thể hiện hiệu quả ức chế trình tự siARN trên gen gây bệnh trong động vật thử nghiệm (chuột nhắt hoặc chuột cống), trong khi chúng không có hiệu quả ức chế đáng kể một cách cụ thể trên gen của người. Hơn nữa, đề cập đến hiệu quả ức chế của siARN, trong khi thể hiện hiệu quả ức chế của siARN ở nồng độ 200nM (Tài liệu phi sáng chế 1) và ở nồng độ nằm trong khoảng từ 20 đến 500nM (Tài liệu phi sáng chế 5), lại không thể hiện khả năng ức chế có hiệu quả sự biểu hiện của gen gây xơ hóa phổi ở nồng độ thấp.

Cho đến nay mười siARN khác nhau hướng đích gen TGF- β 1 đã được báo cáo (Tài liệu sáng chế 1 và từ 5 đến 7). Tuy nhiên, đề cập đến gen TGF- β 1 có chiều dài đầy đủ là 2346 bazơ (số truy cập ngân hàng gen NM_000660.3) và có vô số sự kết hợp phù hợp về sự lựa chọn trình tự khoảng 20-mer ngoài gen có chiều dài đầy đủ, không dễ để thiết kế phân tử dsARN hoặc siARN có khả năng ức chế sự biểu hiện gen một cách hiệu quả hơn từ các sự kết hợp đó.

Tài liệu kỹ thuật có liên quan

Tài liệu sáng chế

[Tài liệu sáng chế 1] WO2007/109097

[Tài liệu sáng chế 2] WO2003/035083

[Tài liệu sáng chế 3] JP-A-2007-119396

[Tài liệu sáng chế 4] JP-A-2009-516517

[Tài liệu sáng chế 5] WO2009/061417

[Tài liệu sáng chế 6] WO2008/109548

[Tài liệu sáng chế 7] WO2007/79224

Tài liệu phi sáng chế

[Tài liệu phi sáng chế 1] Wang Z, Gao Z, Shi Y, Sun Y, Lin Z, Jiang H, Hou T, Wang Q, Yuan X, Zhu X, Wu H, Jin Y, J Plast Reconstr Aesthet Surg, 1193-1199, 60, 2007

[Tài liệu phi sáng chế 2] Hwang M, Kim HJ, Noh HJ, Chang YC, Chae YM, Kim KH, Jeon JP, Lee TS, Oh HK, Lee YS, Park KK, Exp Mol Pathol, 48-54, 81, 2006

[Tài liệu phi sáng chế 3] Takabatake Y, Isaka Y, Mizui M, Kawachi H, Shimizu F, Ito T, Hori M, Imai E, Gen Ther, 965-973, 12, 2005

[Tài liệu phi sáng chế 4] Xu W, Wang LW, Shi JZ, Gong ZJ, Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 300-308, 8, 2009

[Tài liệu phi sáng chế 5] Liu XJ, Ruan CM, Gong XF, Li XZ, Wang HL, Wang MW, Yin JQ, Biotechnol Lett, 1609-1615, 27, 2005

[Tài liệu phi sáng chế 6] Jutaro Fukumoto, Saiko Suetsugu, Chika Harada, Tomonobu Kawaguchi, Naoki Hamada, Takashige Maeyama, Kazuyoshi Kuwano, and Yoichi Nakanishi, The Journal of The Japanese Respiratory Society, 185, 46, 2008.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến siARN có hiệu quả điều trị chứng xơ hóa và được phẩm chứa siARN.

Tác giả sáng chế đã tiến hành nghiên cứu chuyên sâu để giải quyết vấn đề đã đề cập ở trên. Kết quả, họ đã phát hiện ra rằng siARN cụ thể hướng đích gen TGF- β 1 của người có thể ức chế một cách hiệu quả sự biểu hiện TGF- β 1 trong các tế bào người, và hơn nữa, cải thiện triệu chứng xơ hóa phổi trong phổi của mô hình chuột bị xơ hóa phổi mà không gây ra sự tương tác interferon.

Nghĩa là, sáng chế đề cập đến các mục từ 1) đến 19) sau đây:

1) siARN có chiều dài đầy đủ là 30 nucleotit hoặc ít hơn và hướng đích trình tự có từ 17 đến 23 bazơ liên nhau được chọn từ nhóm bao gồm các bazơ ở các vị trí từ 1285 đến 1318, các bazơ ở các vị trí từ 1398 đến 1418, các bazơ ở các vị trí từ 1434 đến 1463, các bazơ ở các vị trí từ 1548 đến 1579, các bazơ ở các vị trí từ 1608 đến 1628, các bazơ ở các vị trí từ 1700 đến 1726, các bazơ ở các vị trí từ 1778 đến 1798, các bazơ ở các vị trí từ 1806 đến 1826, và các bazơ ở các vị trí từ 1887 đến 1907 của SEQ ID NO: 1.

2) siARN theo mục 1) đã đề cập ở trên, được chọn từ các mục từ (a) đến (s) sau:

(a) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 2, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 3;

(b) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 4, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 5;

(c) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 6 và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 7;

(d) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 8, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 9;

(e) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 10, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 11;

(f) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 12, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 13;

(g) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 14, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 15;

(h) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 16, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 17;

(i) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 18, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 19;

(j) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 20, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 21;

(k) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 22, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 23;

(l) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 24, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 25;

(m) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 26, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 27;

(n) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 28, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 29;

(o) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 30, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 31;

(p) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 32, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 33;

(q) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 34, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 35;

(r) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 36, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 37; và

(s) siARN bao gồm trình tự có nghĩa của SEQ ID NO: 54, và trình tự đối nghĩa của SEQ ID NO: 55.

3) siARN theo mục 1) hoặc 2) đã đề cập ở trên, trong đó từ 1 đến 10 nucleotit liền nhau ngoại trừ nucleotit nhô ra từ đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa của siARN được biến đổi thành ADN.

4) siARN theo mục từ 1) đến 3) đã đề cập ở trên, trong đó từ 1 đến 10 nucleotit liền nhau từ đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa của siARN được biến đổi thành ADN.

5) siARN theo mục từ 1) đến 4) đã đề cập ở trên, trong đó từ 1 đến 10 nucleotit liền nhau ngoại trừ nucleotit nhô ra từ đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa của siARN được biến đổi thành ADN và từ 1 đến 10 nucleotit liền nhau từ đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa của siARN được biến đổi thành ADN.

6) siARN theo mục từ 1) đến 5) đã đề cập ở trên, trong đó đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa được monophosphoryl hóa hoặc monothiophosphoryl hóa.

7) Dược phẩm chứa siARN theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1) đến 6) ở trên.

8) Chất ức chế sự biểu hiện gen TGF- β 1 chứa siARN theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1) đến 6) ở trên làm thành phần hoạt tính.

9) Chất ức chế sự biểu hiện gen TGF-1 chứa siARN theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1) đến 6) ở trên làm thành phần hoạt tính.

10) Chất để phòng ngừa hoặc trị liệu chứng xơ hóa phổi hoặc ung thư phổi chứa siARN theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1) đến 6) ở trên làm thành phần hoạt tính.

11) Sử dụng siARN theo các mục từ 1) đến 6) ở trên để sản xuất chất ức chế sự biểu hiện gen TGF- β 1.

12) Sử dụng siARN theo các mục từ 1) đến 6) ở trên để sản xuất chất ngăn ngừa hoặc trị liệu chứng xơ hóa.

13) Sử dụng siARN theo các mục từ 1) đến 6) ở trên để sản xuất chất ngăn ngừa hoặc trị liệu chứng xơ hóa phổi hoặc ung thư phổi.

14) siARN theo các mục từ 1) đến 6) ở trên để sử dụng trong việc ức chế sự biểu hiện gen TGF- β 1.

15) siARN theo các mục từ 1) đến 6) ở trên để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị chứng xơ hóa.

16) siARN theo các mục từ 1) đến 6) ở trên để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị chứng xơ hóa phổi hoặc ung thư phổi.

17) Phương pháp ức chế sự biểu hiện gen TGF- β 1, bao gồm đưa siARN theo các mục từ 1) đến 6) ở trên vào cơ thể người hoặc động vật.

18) Phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị chứng xơ hóa, bao gồm đưa siARN theo các mục từ 1) đến 6) ở trên vào cơ thể người hoặc động vật.

19) Phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị chứng xơ hóa phổi hoặc ung thư phổi, bao gồm đưa siARN theo các mục từ 1) đến 6) ở trên vào cơ thể người hoặc động vật.

Hiệu quả của sáng chế

Do siARN theo sáng chế có thể ngăn chặn hoặc ức chế có hiệu quả sự biểu hiện của TGF- β 1 ở nồng độ thấp, nó có thể được sử dụng làm dược phẩm để ngăn chặn hoặc điều trị chứng xơ hóa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 là đồ thị thể hiện tỷ lệ ức chế sự biểu hiện của mRNA TGF- β 1 bằng siARN;

FIG.2 là đồ thị thể hiện tỷ lệ ức chế sự biểu hiện của mRNA TGF- β 1 bằng siARN khảm;

FIG.3 là đồ thị thể hiện tỷ lệ ức chế sự biểu hiện của mRNA TGF- β 1 bằng siARN khảm liên kết phosphat- hoặc thiophosphat;

FIG.4 là đồ thị thể hiện tỷ lệ ức chế sự biểu hiện của TGF- β 1 trong mô hình xơ hóa phổi; và

FIG.5 là hình ảnh dưới kính hiển vi quang học về các phần mô phổi (nhuộm H.E. và nhuộm ba màu của Masson (Masson's trichrome staining)) (độ phóng đại: 5).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trình tự mà siARN theo sáng chế hướng đích có từ 17 đến 23 bazơ liên nhau được chọn từ nhóm bao gồm các bazơ ở các vị trí từ 1285 đến 1318, các bazơ ở các vị

trí từ 1398 đến 1418, các bazơ ở các vị trí từ 1434 đến 1463, các bazơ ở các vị trí từ 1548 đến 1579, các bazơ ở các vị trí từ 1608 đến 1628, các bazơ ở các vị trí từ 1700 đến 1726, các bazơ ở các vị trí từ 1778 đến 1798, các bazơ ở các vị trí từ 1806 đến 1826, và các bazơ ở các vị trí từ 1887 đến 1907 của SEQ ID NO: 1. Ở đây, từ 17 đến 23 bazơ liền nhau được chọn từ mỗi nhóm tốt hơn là từ 19 đến 23 bazơ, và tốt hơn nữa là 21 bazơ.

Trình tự bazơ của SEQ ID NO: 1 là trình tự bazơ của mARN TGF- β 1, và thông tin trình tự này được đăng ký với ngân hàng gen dưới số truy cập ngân hàng gen NM_000660.3.

siARN theo sáng chế được tạo ra bằng cách lai sợi đối nghĩa, mà có sự bổ sung trình tự vào trình tự đích của mARN TGF- β 1 đã đề cập ở trên, và sợi có nghĩa, mà có sự bổ sung trình tự vào sợi đối nghĩa này. siARN theo sáng chế có tác động phân tách trên mARN TGF- β 1 (nghĩa là, tác động can thiệp ARN) và có khả năng ức chế sự dịch mã của mARN này, cụ thể, có khả năng ức chế sự biểu hiện của gen TGF- β 1.

Sáng chế đề cập đến chiều dài nucleotit của siARN theo sáng chế, chiều dài của sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa có thể giống hoặc khác nhau, và siARN có chiều dài đầy đủ có 30 nucleotit hoặc ít hơn, tốt hơn có 25 nucleotit hoặc ít hơn, tốt hơn nữa có 23 nucleotit hoặc ít hơn, hoặc có 21 nucleotit.

Hơn nữa, cả hai đầu của sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa đều có thể là đầu bằng hoặc đầu tận cùng 3' của mỗi sợi có thể có chỗ nhô ra (nghĩa là, đầu dính). Ở đây, "đầu bằng" đề cập đến cấu hình trong đó, trong vùng tận cùng của ARN sợi kép, vùng tận cùng của sợi có nghĩa và vùng tận cùng tương ứng của sợi đối nghĩa được bắt cặp mà không làm duỗi sợi đơn ra. Hơn nữa, "nhô ra," còn được gọi là đầu thừa, đề cập đến cấu hình mà ARN sợi kép không tạo thành sợi kép trong vùng tận cùng của sợi có nghĩa hoặc vùng tận cùng tương ứng của sợi đối nghĩa do thiếu bazơ bắt cặp, làm duỗi sợi đơn ra (đầu dính).

Về số bazơ trong phần đầu dính, có từ 1 đến 10 nucleotit, tốt hơn là từ 1 đến 4 nucleotit, và tốt hơn nữa là từ 1 đến 2 nucleotit. Lưu ý rằng không có mối liên hệ về chiều dài của đầu dính giữa hai sợi, và mỗi sợi trong hai sợi này có một chiều dài khác nhau. Nucleotit trong phần đầu dính có thể là ARN hoặc ADN, và mặc dù tốt hơn là sự

bổ sung bazơ vào mARN TGF- β 1 đích, vẫn có thể là bazơ không bổ sung miễn là siARN theo sáng chế vẫn giữ lại được khả năng can thiệp của ARN đã đề cập ở trên.

siARN theo sáng chế có thể là ARN sợi kép có hai sợi tách nhau. Bên cạnh đó, siARN theo sáng chế cũng có thể là ARN sợi đơn để tạo thành ARN sợi kép thông qua việc tạo thành cấu trúc thân-vòng. Nghĩa là, siARN theo sáng chế cũng bao gồm cả ARN mà tạo thành vòng có từ 2 đến 4 nucleotit ở đầu tận cùng 5' của sợi có nghĩa và đầu tận cùng 3' của sợi đối nghĩa và ARN mà tạo thành vòng có từ 2 đến 4 nucleotit ở đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa và đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa. Hơn nữa, siARN theo sáng chế cũng bao gồm cả ARN mà tạo thành vòng có từ 2 đến 4 nucleotit ở đầu tận cùng 5' của sợi có nghĩa và đầu tận cùng 3' của sợi đối nghĩa cũng như đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa và đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa.

Tốt hơn siARN theo sáng chế và trình tự đích là giống nhau; tuy nhiên, chúng có thể gần như là giống nhau, nghĩa là có các trình tự tương đồng, miễn là siARN có thể gây ra sự can thiệp ARN đã đề cập ở trên. Cụ thể, miễn là trình tự sợi đối nghĩa của siARN theo sáng chế lai với trình tự đích, có thể có mặt một hoặc một số (ví dụ, hai, ba, và bốn) sự ghép đôi không tương xứng. Nghĩa là, siARN theo sáng chế bao gồm siARN có trình tự được biến đổi bằng sự thay thế, bổ sung, hoặc loại bỏ một hoặc một số bazơ của trình tự đích và có khả năng gây ra sự can thiệp ARN, hoặc siARN có trình tự giống với trình tự đích 85% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 95% hoặc nhiều hơn, và tốt hơn là 98% hoặc nhiều hơn và có khả năng gây ra sự can thiệp ARN.

Lưu ý rằng điều kiện lai sử dụng ở đây đề cập đến, khi sử dụng siARN theo sáng chế làm được phẩm bằng cách đưa vào cơ thể sống, các điều kiện trong cơ thể sống, và khi sử dụng siARN theo sáng chế làm tác nhân phản ứng *in vitro*, điều kiện nghiêm ngặt cao hoặc vừa phải. Ví dụ về các điều kiện này bao gồm điều kiện lai là 400mM NaCl, 40mM PIPES, pH = 6,4, 1mM EDTA, và thời gian lai nằm trong khoảng từ 12 đến 160 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 70°C. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã biết rõ các điều kiện này và được Sambrook và các đồng tác giả mô tả. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y, USA, 1989).

Hơn nữa, có thể tính toán mức độ tương đồng về trình tự bằng phương pháp Lipman-Pearson (Science, 227, 1435, (1985)), v.v., và ví dụ, có thể tính toán bằng cách sử dụng chương trình tương đồng Search của phần mềm xử lý thông tin di truyền Gentyx-Win (Ver.5.1.1; Software Development Co., Ltd.) với việc cài đặt kích cỡ đơn vị để so sánh (ktup) ở 2.

Hơn nữa, siARN theo sáng chế bao gồm siARN trong đó các nucleotit của sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa được biến đổi hoàn toàn thành ADN (siARN lai) và siARN trong đó nucleotit của sợi có nghĩa và/hoặc sợi đối nghĩa được biến đổi một phần thành ADN (siARN khảm), miễn là siARN có thể gây ra sự can thiệp ARN đã đề cập ở trên.

Ở đây, sự biến đổi ARN nucleotit thành ADN có nghĩa là sự biến đổi AMP thành dAMP, GMP thành GMP, CMP thành dCMP, và UMP thành dTMP.

Với siARN lai, tốt hơn là siARN có nucleotit của sợi có nghĩa được biến đổi thành ADN. Ví dụ về siARN khảm bao gồm siARN có nucleotit ở phía xuôi chiều (nghĩa là, phía đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa và phía đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa) được biến đổi một phần thành ADN. Ví dụ cụ thể về siARN khảm bao gồm siARN khảm có cả hai nucleotit ở phía đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa và phía đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa đều được biến đổi thành ADN và siARN khảm có nucleotit ở phía đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa hoặc ở phía đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa được biến đổi thành ADN. Hơn nữa, độ dài của nucleotit được biến đổi tốt hơn là độ dài bất kỳ tương đương với 1/2 phân tử ARN hoặc ngắn hơn, ví dụ, từ 1 đến 13 nucleotit, tốt hơn là từ 1 đến 10 nucleotit từ đầu tận cùng. Từ quan điểm về hiệu quả can thiệp ARN, và độ ổn định, an toàn, v.v. của phân tử ARN, ví dụ về siARN khảm có lợi bao gồm siARN có hai sợi mà mỗi sợi có độ dài nucleotit nằm trong khoảng từ 19 đến 23, và từ 1 đến 10, tốt hơn là từ 1 đến 8, và tốt hơn nữa là từ 1 đến 6 nucleotit ngoại trừ (các) nucleotit nhô ra từ đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa và từ 1 đến 10, tốt hơn là từ 1 đến 8, và tốt hơn là từ 1 đến 6 nucleotit từ đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa được biến đổi liên tiếp thành ADN ở số bất kỳ (xem [bảng 2] được thể hiện dưới đây). Hơn nữa, trong trường hợp này, tốt hơn số ADN được biến đổi thành sợi có nghĩa (ngoại trừ (các) nucleotit nhô ra) và sợi đối nghĩa là giống nhau.

Hơn nữa, siARN theo sáng chế có thể là siARN có nucleotit (nghĩa là, ribonucleotit và deoxyribonucleotit) là bản sao nucleotit có đường, bazơ và/hoặc phosphat được biến đổi hóa học, miễn là siARN có thể gây ra sự can thiệp ARN đã đề cập ở trên. Ví dụ về bản sao nucleotit có bazơ biến đổi bao gồm xytidin hoặc uridin được biến đổi ở vị trí 5 (ví dụ, 5-propynyluridin, 5-propynylxytidin, 5-metylxytidin, 5-metyluridin, 5-(2-amino)propyluridin, 5-haloxytidin, 5-halouridin, và 5-metyloxyuridin); adenosin hoặc guanosin được biến đổi ở vị trí 8 (ví dụ, 8-bromoguanosin); deazanucleotit (ví dụ, 7-deaza-adenosin); và nucleotit được alkyl hóa ở O- và N- (ví dụ, N6-metyladenosin).

Hơn nữa, ví dụ về bản sao nucleotit có đường được biến đổi bao gồm bản sao được biến đổi đường ở vị trí 2', trong đó 2'-OH của ribonucleotit được thay thế bằng H, OR, R, nguyên tử halogen, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, CN (trong đó, R là nhóm alkyl, alkenyl, hoặc alkynyl có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon), và bản sao tương tự, bản sao được phosphoryl hóa ở đầu tận cùng 5' hoặc bản sao được monothiophosphoryl hóa ở đầu tận cùng 5', trong đó nhóm OH ở đầu tận cùng 5' được monophosphoryl hóa hoặc monothiophosphoryl hóa.

Ví dụ về bản sao nucleotit có phosphat được biến đổi bao gồm bản sao có nhóm phosphoeste liên kết với các ribonucleotit liền kề được thay thế bằng nhóm phosphothioat.

Hơn nữa, bên cạnh các bản sao nucleotit đã đề cập ở trên, siARN theo sáng chế có thể có phần tử thể cụ thể hoặc phân tử chức năng liên kết với ít nhất một trong các nucleotit từ nucleotit đầu tiên đến nucleotit thứ sáu từ đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa (đầu tận cùng 5', đầu tận cùng 3', hoặc bazơ hoặc đường ở bên trong khác với ở đầu tận cùng) một cách trực tiếp hoặc thông qua một liên kết, và phần tử thể hoặc phân tử chức năng tốt hơn được liên kết với ít nhất một trong các nucleotit từ nucleotit thứ nhất đến nucleotit thứ sáu, tốt hơn từ nucleotit thứ nhất đến nucleotit thứ tư từ đầu tận cùng 5' của sợi có nghĩa.

Ở đây, ví dụ về phần tử thể bao gồm nhóm amino; nhóm mercapto; nhóm nitro; nhóm alkyl có từ 1 đến 40 (tốt hơn là từ 2 đến 20, tốt hơn nữa là từ 4 đến 12) nguyên tử cacbon; nhóm aminoalkyl có từ 1 đến 40 (tốt hơn là từ 2 đến 20, tốt hơn nữa là từ 4

đến 12) nguyên tử cacbon; nhóm thioalkyl có từ 1 đến 40 (tốt hơn là từ 2 đến 20, tốt hơn nữa là từ 4 đến 12) nguyên tử cacbon; nhóm alkoxy có từ 1 đến 40 (tốt hơn là từ 2 đến 20, tốt hơn nữa là từ 4 đến 12) nguyên tử cacbon; nhóm aminoalkoxy có từ 1 đến 40 (tốt hơn là từ 2 đến 20, tốt hơn nữa là từ 4 đến 12) nguyên tử cacbon; nhóm thioalkoxy có từ 1 đến 40 (tốt hơn là từ 2 đến 20, tốt hơn nữa là từ 4 đến 12) nguyên tử cacbon; nhóm mono- hoặc di-alkyl amino có từ 1 đến 40 (tốt hơn là từ 2 đến 20, tốt hơn nữa là từ 4 đến 12) nguyên tử cacbon; nhóm alkylthio có từ 1 đến 40 (tốt hơn là từ 2 đến 20, tốt hơn nữa là từ 4 đến 12) nguyên tử cacbon; nhóm polyetylen oxit có từ 2 đến 40 (tốt hơn là từ 2 đến 20, tốt hơn nữa là từ 4 đến 12) nguyên tử cacbon; và nhóm polypropylen oxit có từ 3 đến 39 (tốt hơn là từ 3 đến 21, tốt hơn nữa là từ 3 đến 12) nguyên tử cacbon. Có thể nâng cao hiệu quả can thiệp ARN một cách đáng kể bằng cách liên kết với các phân tử thể này.

Ví dụ về phân tử chức năng bao gồm đường, protein, peptit, axit amin, ADN, ARN (bao gồm tARN), aptame, nucleotit biến đổi, vật liệu hữu cơ và vô cơ có trọng lượng phân tử thấp, cholesteol, dendrime, lipit, và vật liệu polyme. Qua việc bổ sung các phân tử chức năng này vào, siARN theo sáng chế có thể có được hiệu quả can thiệp ARN tuyệt vời và có hiệu quả có lợi nhờ phân tử chức năng.

Ví dụ về đường đã đề cập ở trên bao gồm monosacarit như glucoza, galactoza, glucosamin, và galactosamin, và oligosacarit hoặc polysacarit tạo thành từ sự kết hợp tùy ý của các monosacarit này.

Với protein đã đề cập ở trên, có thể sử dụng protein có mặt trong cơ thể sống, protein có hoạt tính dược lý, protein có hoạt tính nhận dạng phân tử, và protein tương tự, và ví dụ về các protein này bao gồm protein importin- β , avidin, và kháng thể.

Ví dụ cụ thể về ADN đã đề cập ở trên bao gồm ADN có chiều dài từ 5 đến 50 bazơ, tốt hơn có chiều dài từ 5 đến 25 bazơ.

Ví dụ về peptit đã đề cập ở trên bao gồm octa-arginin peptit R8, trình tự peptit tín hiệu định vị nhân (như HIV-1 Tat và kháng nguyên SV40T), peptit tín hiệu xuất khỏi nhân (như HIV-1 Rev và MAPKK), và peptit dung hợp màng. Ví dụ về nucleotit biến đổi đã đề cập ở trên bao gồm nucleotit có khung phosphat biến đổi như phosphorothioat hoặc boranophosphat ADN/ARN; nucleotit biến đổi ở vị trí 2' như

ARN biến đổi ở vị trí 2'-OMe và ARN biến đổi ở vị trí 2'-F; nucleotit biến đổi có phân tử đường được liên kết ngang như LNA (nghĩa là, axit nucleic được khóa) và ENA (nghĩa là, axit nucleic tạo cầu 2'-O,4'-C-etylen); và nucleotit biến đổi có khung bazơ khác như PNA (nghĩa là, axit peptit nucleic) và morpholino-nucleotit (xem WO2008/140126 và WO2009/123185).

Ví dụ về vật liệu hữu cơ và vô cơ có trọng lượng phân tử thấp đã đề cập ở trên bao gồm vật liệu huỳnh quang như Cy3 và Cy5; biotin; chấm lượng tử; và các hạt vàng mịn. Ví dụ về các dendrime đã đề cập ở trên bao gồm dendrime poly(amidoamin). Ví dụ về lipid đã đề cập ở trên bao gồm, ngoài axit linoleic, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoetanolamin (DOPE), v.v., lipid sợi kép có hai nhóm kỵ nước đã mô tả trong WO2009/123185. Ví dụ về vật liệu polyme đã đề cập ở trên bao gồm polyetylen glycol và polyetylenimin.

Ở đây, nhóm có phân tử chức năng có thể là chính là gốc phân tử chức năng, hoặc gốc phân tử chức năng mà một trong các nhóm chức năng của liên kết hai chức năng liên kết vào. Nghĩa là, trong trường hợp trước, phân tử chức năng được liên kết một cách trực tiếp lên phần giữa của ARN sợi có nghĩa đã đề cập ở trên, và trong trường hợp sau, phân tử chức năng được liên kết trực tiếp với phần nhất định của ARN sợi có nghĩa đã đề cập ở trên thông qua liên kết hai chức năng. Ở đây, không có giới hạn cụ thể về liên kết hai chức năng miễn nó là liên kết có hai nhóm chức năng, và ví dụ, có thể sử dụng N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionat, axit N-4-maleimidobutyric, S-(2-pyridyldithio) cysteamine, iodoacetoxysuccinimide, N-(4-maleimidobutyryloxy)succinimide, axit N-[5-(3'-maleimidopropylamido)-1-carboxypentyl]iminodiacetic, axit N-(5-aminopentyl)-iminodiacetic, và liên kết tương tự.

Dù cho không giới hạn cụ thể về vị trí liên kết trong ARN sợi có nghĩa đã đề cập ở trên đối với phân tử thể, phân tử chức năng, hoặc một liên kết mà liên kết phân tử thể hoặc phân tử chức năng, tốt hơn chúng được liên kết theo cách chúng thay thế nguyên tử hydro mà cấu thành nên nhóm hydroxyl trong gốc phosphat của nucleotit cụ thể trong ARN sợi có nghĩa.

siARN theo sáng chế được minh họa một cách cụ thể bằng ARN sợi kép có chứa trình tự có nghĩa và trình tự đối nghĩa từ mục (a) đến mục (s) dưới đây.

[Bảng 1]

siARN số	Các vị trí dựa trên vị trí đích	Chiều có nghĩa (5'→3')	SEQ ID NO	Chiều đối nghĩa (5'→3')	SEQ ID NO
(a)	1285~1305	CCGAGAAGCGGUACCUGAACC	2	UUCAGGUACCGCUUCUCGGAG	3
(b)	1298~1318	CCUGAACCCGUGUUGCUCUCC	4	AGAGCAACACGGGUUCAGGUA	5
(c)	1398~1418	CCUGGCGAUACCUCAGCAACC	6	UUGCUGAGGUAUCGCCAGGAA	7
(d)	1434~1454	GCGACUCGCCAGAGUGGUUAU	8	AACCACUCUGGCGAGUCGCUG	9
(e)	1435~1455	CGACUCGCCAGAGUGGUUAUC	10	UAACCACUCUGGCGAGUCGCU	11
(f)	1436~1456	GACUCGCCAGAGUGGUUAUCU	12	AUAACCACUCUGGCGAGUCGC	13
(g)	1438~1458	CUCGCCAGAGUGGUUAUCUUU	14	AGAUAAACCACUCUGGCGAGUC	15
(h)	1440~1460	CGCCAGAGUGGUUAUCUUUUG	16	AAAGAUAAACCACUCUGGCGAG	17
(i)	1441~1461	GCCAGAGUGGUUAUCUUUUGA	18	AAAAGAUAAACCACUCUGGCGA	19
(j)	1443~1463	CAGAGUGGUUAUCUUUUGAUG	20	UCAAAAAGAUAAACCACUCUGGC	21
(k)	1548~1568	GGGAUAACACACUGCAAGUGG	22	ACUUGCAGUGUGUUAUCCUG	23
(l)	1557~1577	CACUGCAAGUGGACAUAACG	24	UUGAUGUCCACUUGCAGUGUG	25
(s)	1557~1579	CACACUGCAAGUGGACAUAACG	54	CGUUGAUGUCCACUUGCAGUGUG	55
(m)	1608~1628	CCACCAUUCAUGGCAUGAACC	26	UUCAUGCCAUGAAUGGUGGCC	27
(n)	1700~1720	GCCUGGACACCAACUAUUGC	28	AAUAGUUGGUGUCCAGGGCUC	29
(o)	1706~1726	GACACCAACUAUUGCUCAGC	30	UGAAGCAAUAGUUGGUGUCCA	31
(p)	1778~1798	GACCUCGGCUGGAAGUGGAUC	32	UCCACUCCAGCCGAGGUCCU	33
(q)	1806~1826	CCAAGGGCUACCAUGCCAACU	34	UUGGCAUGGUAGCCCUUGGGC	35
(r)	1887~1907	CCCUGUACAACCAGCAUAACC	36	UUAUGCUGGUUGUACAGGGCC	37

Hơn nữa, ví dụ tốt hơn về siARN khảm bao gồm siARN có từ 1 đến 8 nucleotit từ đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa và từ 1 đến 6 nucleotit từ đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa được biến đổi liên tiếp thành ADN ở số bất kỳ. Ví dụ về siARN khảm tốt hơn thu được bằng cách sử dụng siARN (l) đã đề cập ở trên như sau.

[Bảng 2]

siARN số	Chiều có nghĩa (5'→3')	SEQ ID NO	Chiều đối nghĩa (5'→3')	SEQ ID NO
(l-C8a)	CACUGCAAGUGGACatcaacg	38	ttgatUCCACUUGCAGUGUG	39
(l-C7)	CACUGCAAGUGGACatcaacg	40	ttgatGUCCACUUGCAGUGUG	41
(l-C6)	CACUGCAAGUGGACAtcaacg	42	ttgaUGUCCACUUGCAGUGUG	43
(l-C5)	CACUGCAAGUGGACAUcaacg	44	ttgAUGUCCACUUGCAGUGUG	45
(l-C4a)	CACUGCAAGUGGACAUCaacg	46	ttGAUGUCCACUUGCAGUGUG	47
(l-C3)	CACUGCAAGUGGACAUCAacg	48	tUGAUGUCCACUUGCAGUGUG	49
(l-C2)	CACUGCAAGUGGACAUAACg	50	UUGAUGUCCACUUGCAGUGUG	25
(l-C1)	CACUGCAAGUGGACAUAACg	51	UUGAUGUCCACUUGCAGUGUG	25
(l-C4b)	CACUGCAAGUGGACAUCaacg	46	UUGAUGUCCACUUGCAGUGtg	56

Trong bảng trên, các chữ viết hoa, chữ nhỏ, và đường gạch dưới lần lượt thể hiện ARN, ADN, và các vị trí nhô ra.

Dù cho không có giới hạn cụ thể về phương pháp sản xuất siARN theo sáng chế, có thể sản xuất ra siARN theo sáng chế bằng phương pháp sản xuất đã biết, ví dụ, phương pháp tổng hợp hóa học *in vitro* và phương pháp tổng hợp phiên mã sử dụng trình tự khởi đầu (promoter) và ARN polymeraza.

Có thể thực hiện việc tổng hợp hóa học bằng chất tổng hợp axit nucleic, sử dụng nhựa amidite chứa các phân tử axit nucleic, là phân tử thể của siARN, làm vật liệu thô.

Có thể thực hiện tổng hợp phiên mã bằng cách phiên mã *in vitro*, mà có thể tổng hợp ARN sợi kép bằng cách cắt bỏ ARN kẹp tóc (hairpin).

Do đó siARN thu được theo sáng chế có thể ức chế có hiệu quả sự biểu hiện TGF- β 1 trong cơ thể người trong các tế bào của biểu bì phế nang của người ở mức mRNA, và hơn nữa, thể hiện sự nâng cao hiệu quả trong các triệu chứng xơ hóa phổi trong phổi của mô hình chuột bị xơ hóa phổi mà không gây ra phản ứng interferon, như sẽ được minh họa dưới đây trong các ví dụ.

Do đó, siARN theo sáng chế và vector biểu hiện mà có khả năng biểu hiện siARN ở đối tượng đã sử dụng vector này là hữu hiệu để làm thuốc dùng cho người hoặc động vật (được phẩm). Cụ thể, được phẩm ức chế sự biểu hiện gen TGF- β 1, được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh do sự biểu hiện quá mức TGF- β 1 như chứng xơ hóa, cụ thể, chất ngăn ngừa hoặc trị liệu chứng xơ hóa.

Ở đây, có nhiều bệnh gây tạo xơ trong phổi như viêm phổi kẽ, xơ nang, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính (chronic obstructive pulmonary disease-COPD), hội chứng suy hô hấp cấp (acute respiratory distress syndrome-ARDS), bệnh viêm phổi, nhiễm trùng phổi, viêm phổi do bức xạ, viêm phổi kẽ do thuốc, và bệnh collagen gây viêm phổi kẽ, tuy nhiên, trong số các bệnh viêm phổi kẽ tự phát (idiopathic interstitial pneumonias-IPs) không rõ nguyên nhân, ưu tiên cụ thể bệnh xơ hóa phổi tự phát (idiopathic pulmonary fibrosis-IPF). Là bệnh lâm sàng, IIPs bao gồm chứng xơ hóa phổi tự phát (idiopathic pulmonary fibrosis-IPF), viêm phổi kẽ không cụ thể (non-specific interstitial pneumonia-NSIP), viêm phổi tổ chức hóa vô căn-COP/BOOP), viêm phổi kẽ cấp tính (acute interstitial pneumonia AIP), viêm phổi kẽ bong (desquamative interstitial pneumonia-DIP), viêm tiểu phế quản hô hấp gây viêm phổi

kẽ (respiratory bronchiolitis-associated interstitial pneumonia-RB-ILD), viêm phổi kẽ thâm nhiễm lympho bào (lymphocytic interstitial pneumonia-LIP), và bệnh tương tự.

Hơn nữa, có báo cáo rằng TGF- β 1 thúc đẩy ung thư, cụ thể là xạ xâm chiếm và di căn ung thư biểu mô tuyến phổi (Mol Cell Biochem (2011) 355:309-314, Cancer Genomics Proteomics 2010, 7, 217), TGF- β 1 được biểu hiện quá mức ở các vị trí thương tổn mô thông thường sau khi điều trị ung thư và có thể ngăn ngừa được thương tổn mô thông thường bằng cách hướng đến con đường TGF- β 1 (The oncologist 2010; 15: 350-359), v.v.. Do đó, siARN theo sáng chế và vector biểu hiện mà có khả năng biểu hiện siARN trong đối tượng đã sử dụng vector này là hữu hiệu làm thuốc để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư, cụ thể là ung thư phổi.

Khi sử dụng siARN theo sáng chế làm được phẩm, mặc dù có thể sử dụng như vậy luôn, cũng có thể tạo phức với dextrin vòng phân nhánh ở mức cao hoặc xycloamyloza. Ở đây, dextrin vòng phân nhánh ở mức cao đề cập đến glucan có mức polyme hóa nằm trong khoảng từ 50 đến 5000 có gốc cấu trúc vòng có nhánh bên trong và gốc cấu trúc vòng có nhánh bên ngoài, được tạo ra bằng cách để enzym phân nhánh tác động đến amylopectin. Ở đây, gốc cấu trúc vòng có nhánh bên trong đề cập đến gốc cấu trúc vòng tạo thành từ liên kết α -1,4-glucosit và liên kết α -1,6-glucosit, và gốc cấu trúc có nhánh bên ngoài đề cập đến gốc cấu trúc không vòng liên kết với gốc cấu trúc vòng có nhánh bên trong. Ví dụ về các phương án được ưu tiên về dextrin vòng phân nhánh ở mức cao bao gồm dextrin có mức độ polyme hóa gốc cấu trúc vòng có nhánh bên trong của glucan đã đề cập ở trên nằm trong khoảng từ 10 đến 100, dextrin có mức độ polyme hóa gốc cấu trúc mạch có nhánh bên ngoài của glucan đã đề cập ở trên là 40 hoặc lớn hơn, và dextrin có mức độ polyme hóa trung bình của mỗi chuỗi đơn vị của gốc cấu trúc mạch có nhánh bên ngoài đã đề cập ở trên nằm trong khoảng từ 10 đến 20. Hơn nữa, có thể mua dextrin vòng phân nhánh ở mức cao trên thị trường, và cũng có thể sử dụng các sản phẩm thương mại này theo sáng chế.

Xycloamyloza là α -1,4-glucan vòng, trong đó các đơn vị glucoza được liên kết bằng liên kết α -1,4, và có ba chiều, không gian rộng sâu trong cấu trúc hình xoắn ốc. Mặc dù không giới hạn cụ thể về mức độ polyme hóa glucoza trong xycloamyloza sử dụng theo sáng chế, vẫn có mức độ polyme hóa ví dụ nằm trong khoảng từ 10 đến 500,

tốt hơn nằm trong khoảng từ 10 đến 100, và tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 22 đến 50. Có thể tạo ra xycloamyloza từ glucoza bằng cách sử dụng enzym như amylomaltaza. Hơn nữa, có thể mua xycloamyloza trên thị trường, và cũng có thể sử dụng các sản phẩm thương mại này theo sáng chế (xem WO2009/61003).

Có thể tạo ra siARN theo sáng chế là dược phẩm bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang hoặc chất làm loãng dược dụng bằng phương pháp thông thường. Có thể đưa dược phẩm vào cơ thể thông qua bất kỳ con đường nào như đưa vào phổi, đưa vào mũi, đưa vào qua đường miệng, đưa vào trực tràng, và tiêm, và có thể đưa vào toàn thân hoặc cục bộ. Dạng bào chế của dược phẩm có thể là dạng bất kỳ phù hợp để sử dụng theo con đường đưa vào cơ thể, như dạng lỏng, huyền phù, nhũ tương, viên nén, viên thuốc, viên thuốc nhỏ, viên nang, bột, chế phẩm giải phóng chậm, thuốc đạn, sol khí, và bụi nước.

Ví dụ, khi đưa vào mũi, thành phần hoạt tính được hòa tan trong dung môi phù hợp (như nước muối và rượu sinh lý) và dung dịch tạo thành được tiêm hoặc nhỏ từng giọt vào mũi, ở đó thành phần hoạt tính được phân phối. Theo cách khác, khi đưa vào phổi hoặc mũi, thành phần hoạt tính được phun trong sol khí bằng hộp tạo áp suất hoặc máy xông bằng cách sử dụng chất đẩy thích hợp như diclodiflometan, tricloflometan, diclotetrafloetan, cacbon dioxit, hoặc các khí phù hợp khác, trong đó thành phần hoạt tính có thể được phân phối một cách dễ dàng. Khi sử dụng dạng sol khí có áp suất, có thể cố định đơn vị liều lượng bằng cách đề xuất van để phân phối lượng đã định. Hơn nữa, có thể sử dụng thành phần hoạt tính ở dạng bột hít.

Trong trường hợp tiêm, ví dụ, thành phần hoạt tính có thể được bào chế ở dạng dung dịch để dùng ngoài đường tiêu hóa được đưa vào cơ thể bằng cách tiêm tĩnh mạch nhanh hoặc truyền liên tục (nghĩa là, đưa vào trong tĩnh mạch hoặc trong cơ), và tốt hơn được bào chế ở dạng đệm sinh lý như dung dịch Hanks, dung dịch Ringer, và nước muối sinh lý. Dung dịch này có thể chứa dược chất để đưa vào cơ thể như chất tạo huyền phù, chất ổn định, và/hoặc chất phân tán. Ngoài ra, có thể điều chế thành phần hoạt tính ở dạng bột để được hoàn nguyên lại bằng chất làm loãng phù hợp như nước vô trùng mà không chứa chất sinh nhiệt trước khi sử dụng. Có thể đề xuất chế phẩm tiêm ở

dạng, ví dụ dạng liều đơn vị trong ống tiêm hoặc dạng vật chứa nhiều liều có chất bảo quản.

Để sử dụng qua đường miệng, chất trị liệu theo sáng chế có thể ở dạng, ví dụ, viên nén, dạng hạt nhỏ, bột, nhũ tương, viên nang, sirô, huyền phù nước hoặc dầu, hoặc cồn ngọt. Trong trường hợp viên nén hoặc thuốc viên, có thể bọc chế phẩm để trì hoãn sự phân tán và hấp thụ trong đường dạ dày ruột để thu được hiệu quả kéo dài.

Mặc dù không nhằm giới hạn về chất mang hoặc chất làm loãng được dụng, vẫn có các ví dụ về các chất này bao gồm chất lỏng (như nước, dầu, nước muối sinh lý, dung dịch nước dextroza, và etanol) và chất rắn (như gôm acacia, gelatin, tinh bột, glucoza, lactoza, sucroza, đá talc, natri stearat, glyxerol monostearat, keratin, silic dioxit keo, sữa gầy khô, và glyxerol). Hơn nữa, chất trị liệu theo sáng chế có thể chứa chất phù hợp mà được bổ sung vào dược phẩm thông thường như chất bổ trợ, chất khử trùng, chất ổn định, chất gây lắng, chất bôi trơn, chất màu, chất thấm ướt, chất nhũ hóa, và chất đệm pH.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa siARN theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 50% khối lượng, tốt hơn từ 0,01 đến 10% khối lượng, và tốt hơn nữa từ 0,1 đến 1% khối lượng.

Mặc dù liều lượng dược phẩm theo sáng chế không được giới hạn một cách cụ thể miễn là đưa được lượng có hiệu quả vào cơ thể, vẫn có ví dụ về liều lượng, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 100mg, và tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 0,002 đến 1mg trên một kg trọng lượng cơ thể.

Với chế phẩm theo sáng chế, thay vì siARN theo sáng chế, cũng có thể sử dụng vector biểu hiện có khả năng biểu hiện siARN trong cơ thể.

Trong trường hợp này, vector biểu hiện có thể được tạo cấu trúc bằng cách, ví dụ, chèn ADN có khả năng mã hóa siARN theo sáng chế vào vector phù hợp sử dụng cho liệu pháp di truyền như vector adenovirut, vector virus kết hợp adeno (adeno-associated virus vector-AAV), hoặc vector lentivirut.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn cùng với tham khảo các ví dụ sau. Tuy nhiên, phạm vi kỹ thuật của sáng chế không được giới hạn ở những ví dụ này.

Ví dụ 1: Sản xuất siARN

Thiết kế các phân tử siARN hướng đích gen TGF- β 1 được thể hiện trong bảng 3 dưới đây và tổng hợp hóa học mỗi siARN oligonucleotit. Tinh sạch oligonucleotit bằng HPLC trước khi sử dụng.

[Bảng 3]

siARN số	Các vị trí dựa trên vị trí đích	Chiều có nghĩa (5'→3')	SEQ ID NO	Chiều đối nghĩa (5'→3')	SEQ ID NO
(a)	1285~1305	CCGAGAAGCGGUACCUGAACC	2	UUCAGGUACCGCUUCUCGGAG	3
(b)	1298~1318	CCUGAACCCGUGUUGCUCUCC	4	AGAGCAACACGGGUUCAGGUA	5
(c)	1398~1418	CCUGGCGAUACCUCAGCAACC	6	UUGCUGAGGUUAUCGCCAGGAA	7
(d)	1434~1454	GCGACUCGCCAGAGUGGUUAU	8	AACCACUCUGGCGAGUCGCUG	9
(e)	1435~1455	CGACUCGCCAGAGUGGUUAUC	10	UAACCACUCUGGCGAGUCGCU	11
(f)	1436~1456	GACUCGCCAGAGUGGUUAUCU	12	AUAACCACUCUGGCGAGUCGC	13
(g)	1438~1458	CUCGCCAGAGUGGUUAUCUUU	14	AGAUAACCACUCUGGCGAGUC	15
(h)	1440~1460	CGCCAGAGUGGUUAUCUUUUG	16	AAAGAUAAACCACUCUGGCGAG	17
(i)	1441~1461	GCCAGAGUGGUUAUCUUUUGA	18	AAAAGAUAAACCACUCUGGCGA	19
(j)	1443~1463	CAGAGUGGUUAUCUUUUGAUG	20	UCAAAGAUAAACCACUCUGGC	21
(k)	1548~1568	GGGAUAACACACUGCAAGUGG	22	ACUUGCAGUGUGUUAUCCUG	23
(l)	1557~1577	CACUGCAAGUGGACAUAACG	24	UUGAUGUCCACUUGCAGUGUG	25
(s)	1557~1579	CACACUGCAAGUGGACAUAACG	54	CGUUGAUGUCCACUUGCAGUGUG	55
(m)	1608~1628	CCACCAUUAUGGCAUGAACC	26	UUCAUGCCAUGAAUGGUGGCC	27
(n)	1700~1720	GCCCUGGACACCAACUAUUGC	28	AAUAGUUGGUGUCCAGGGCUC	29
(o)	1706~1726	GACACCAACUAUUGCUUCAGC	30	UGAAGCAAUAGUUGGUGUCCA	31
(p)	1778~1798	GACCUCGGCUGGAAGUGGAUC	32	UCCACUUCAGCCGAGGUCCU	33
(q)	1806~1826	CCAAGGGCUACCAUGCCAACU	34	UUGGCAUGGUAGCCCUUGGGC	35
(r)	1887~1907	CCUGUACAACCAGCAUAACC	36	UUAUGCUGGUUGUACAGGGCC	37

Ví dụ 2: Đánh giá hiệu quả ức chế sự biểu hiện TGF- β 1 (*in vitro*)

(1) Tế bào

Sử dụng tế bào A549 từ biểu bì phế nang của người (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.).

(2) Điều kiện nuôi cấy:

Sử dụng môi trường Eagle biến đổi Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's Medium-D-MEM) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (có 100 đơn vị/mL penixilin và 100 μ g/mL streptomycin), kết hạt 1×10^5 tế bào trong đĩa có 12 lỗ. Sau khi nuôi cấy

dưới điều kiện 37°C và 5% CO₂ qua đêm, nhập dòng 40% tế bào A549, và thay môi trường bằng môi trường không có huyết thanh.

(3) Xử lý trước và lượng siARN bổ sung

Với siARN, sử dụng oligonucleotit trong bảng 3, và khi các tế bào nhập dòng đến 40%, đưa oligonucleotit vào các tế bào đã đề cập ở trên bằng cách sử dụng Lipofectamin 2000 (Invitrogen).

Cụ thể, bổ sung 2,0 µL Lipofectamin 2000 vào 98 µL OPTI-MEM (Invitrogen) trong một lọ, và ủ hỗn hợp tạo thành ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian năm phút (dung dịch A).

Bổ sung dung dịch chứa 0,625µL của 0,2µM siARN (dung dịch B) vào 99,375µL OPTI-MEM. Trộn lẫn dung dịch A và B với nhau và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 phút. Sau khi ủ, bổ sung hỗn hợp AB vào mỗi lọ trong đĩa có 12 lỗ. Bổ sung siARN vào để nồng độ cuối cùng đạt 0,1nM.

(4) Xử lý tiếp theo

(i) Xử lý xytokin

Sau khi bổ sung dung dịch trộn lẫn siARN và Lipofectamin vào trong thời gian sáu giờ, thay môi trường bằng môi trường D-MEM chứa 0,1% albumin bào thai bò (bovin serum albumin-BSA) và cytokin (1 ng/mL IL-1β và 1 ng/mL TNF-α), sau đó nuôi cấy trong thời gian 12 giờ. Sau khi nuôi cấy, lấy mẫu chất nổi trên bề mặt canh trường.

(ii) Chiết ARN tế bào tổng số

Để chiết ARN tế bào tổng số, sử dụng thiết bị chiết axit nucleic tự động QuickGen-810 (Fujifilm Corporation) và bộ kit tế bào được nuôi cấy QuickGen ARN S (Fujifilm Corporation), là bộ kit dành riêng cho QuickGen-810. Rửa tế bào bằng 1,0mL PBS, bổ sung 0,5mL dung dịch tiêu bào vào để chiết ARN tế bào tổng số. Sau khi bổ sung 0,5mL dung dịch tiêu bào này (LRC, vừa bổ sung mercapto ethanol vào) vào đĩa có 12 lỗ, khuấy đĩa trên máy lắc đung đưa trong thời gian năm phút. Pha trộn kỹ dung dịch này từ năm đến sáu lần bằng ống hút, và sau đó chuyển vào ống Eppendorf. Bổ sung 420 µL ethanol vào ống Eppendorf, và khuấy hỗn hợp tạo thành trên máy lắc trộn trong thời gian 15 giây và sau đó xử lý trong QuickGen-810. Trong

khí xử lý trong QuickGene-810, bổ sung DNaza (RQ1 DNaza không RNaza, Promega Corporation) vào. Lưu giữ các mẫu ARN tổng số chiết ra trong tủ lạnh ở nhiệt độ -80°C cho đến quá trình xử lý tiếp theo.

(iii) Biến đổi ARN tổng số thành cADN

Tính toán nồng độ ARN ($\mu\text{g/mL}$) trong mẫu ARN tổng số đã chiết từ các tế bào đã nuôi cấy từ giá trị hấp thụ đo ở bước sóng 260nm (đối chứng: đệm TE). Dựa trên các giá trị thu được, đặt dung dịch của mỗi mẫu vào trong đĩa có 96 lỗ với lượng thể tích ARN đạt 0,1 μg . Bổ sung nước cất vào mỗi lỗ để tổng thể tích đạt 12 μL , và hơn nữa, bổ sung 2 μL đệm gADN Wipeout trong kit phiên mã ngược QuantiTect (QIAGEN) vào. Sau khi trộn bằng máy lắc trộn, ủ mẫu ở nhiệt độ 42°C trong thời gian hai phút, và sau đó làm lạnh ở nhiệt độ 4°C. Bổ sung 1 μL enzym phiên mã ngược Quantiscript, 4 μL đệm Quantiscript RT, và 1 μL RT Primer Mix trong kit phiên mã ngược QuantiTect (QIAGEN) vào các mẫu này, sau đó là trộn lẫn và ủ ở nhiệt độ 42°C trong thời gian 15 phút. Sau đó, gia nhiệt mẫu ở nhiệt độ 95°C trong thời gian ba phút để làm bất hoạt enzym phiên mã ngược Quantiscript, và sau đó làm lạnh ở nhiệt độ 4°C.

Pha loãng dung dịch đã chuẩn bị (nghĩa là, dung dịch chuẩn bị cADN chưa pha loãng) 5 lần bằng đệm TE và thành dung dịch cADN để chạy PCR cho gen đích (TGF- β 1).

Tương tự, dung dịch chuẩn bị cADN chưa pha loãng được pha loãng 50 lần bằng đệm TE và dùng làm dung dịch cADN để chạy PCR hướng đích GAPDH, được chọn làm gen tham chiếu bên trong. Lưu ý rằng dung dịch chuẩn bị cADN chưa pha loãng chứa mẫu đối chứng (nghĩa là, sử dụng không siARN) được pha loãng 1, 10, 100, và 1000 lần bằng đệm TE và dùng làm mẫu để xây dựng đường cong hiệu chỉnh để chạy PCR hướng đích TGF- β 1. Tương tự, dung dịch chuẩn bị cADN chưa pha loãng chứa mẫu đối chứng được pha loãng 10-, 100-, 1000-, và 10000- lần bằng đệm TE và dùng làm mẫu để xây dựng đường cong hiệu chỉnh để chạy PCR hướng đích GAPDH.

(5) Phương pháp đo mức độ biểu hiện TGF- β 1

Bổ sung 12,5 μL QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN) và 2,5 μL QuantiTect Primer Assay (QIAGEN) đối với gen TGF- β 1 nguồn gốc từ người hoặc gen GAPDH nguồn gốc từ người vào 2,5 μL sản phẩm cADN thu được từ TGF-

$\beta 1$, được sử dụng làm khuôn. Bổ sung nước cất vô trùng vào dung dịch để đạt đến thể tích cuối cùng là 25 μ L, từ đó chuẩn bị được dung dịch cho phản ứng PCR. Sau đó, bằng cách sử dụng Applied Biosystems 7500 (Life Technologies Japan Ltd.), gia nhiệt dung dịch đã chuẩn bị ở nhiệt độ 95°C trong thời gian năm phút và sau đó đưa vào 40 chu kỳ PCR, một chu kỳ ở 1) 95°C trong thời gian 10 giây và 2) 60°C trong thời gian 35 giây, sau đó làm nguội dần dần từ 95°C xuống 60°C. Đo sự nhiệt phân dung dịch tạo thành. Dựa trên giá trị chu kỳ ngưỡng (threshold cycle-Ct) từ quá trình khuếch đại PCR, hiệu chỉnh tỷ lệ khuếch đại của mỗi gen đích dựa trên giá trị Ct của gen GAPDH, và đánh giá hiệu quả ức chế mRNA của gen đích. Kết quả thu được được thể hiện trong FIG.1 và bảng 4.

[Bảng 4]

siARN		Tỷ lệ biểu hiện mRNA TGF- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ /GAPDH)	
Số	nM	Trung bình	SD
a	0,1	24,7	7,6
b	0,1	85	8,9
c	0,1	51,8	12,3
d	0,1	58,5	6,4
e	0,1	27,5	2,2
f	0,1	52,1	4,1
g	0,1	51,8	7,5
h	0,1	29,3	8,6
i	0,1	31,5	12,5
j	0,1	40,1	6,9
k	0,1	22,2	6,6
l	0,1	12,2	6,7
s	1	50,1	4,3
m	0,1	71,6	10,4
n	0,1	39,7	4,7
o	0,1	11,7	3,1
p	0,1	55,5	4,4
q	0,1	51,3	4,4
r	0,1	53,4	7,8

Nhận thấy siARN có số siARN là d, p, r, f, c, g, q, j, n, i, h, e, a, k, l, và o có hiệu quả ức chế sự biểu hiện TGF- $\beta 1$ là 40% hoặc cao hơn thậm chí ở nồng độ 0,1nM. Cụ thể, siARN có số siARN là l và o thể hiện hiệu quả ức chế là 80% hoặc cao hơn thậm chí ở nồng độ 0,1nM. Hơn nữa, các trình tự này thể hiện hiệu quả ức chế đáng kể ở cả nồng độ 0,01nM.

Ví dụ 3: Sản xuất siARN khảm

Dựa trên số siARN (1), thiết kế các phân tử siARN khảm hướng đến gen TGF- β 1 được thể hiện trong bảng 5 dưới đây và tổng hợp hóa học mỗi siARN oligonucleotit khảm. Tinh sạch oligonucleotit bằng HPLC trước khi sử dụng.

[Bảng 5]

siARN số	Có nghĩa (5'→3')	SEQ ID NO	Đối nghĩa (5'→3')	SEQ ID NO
(1-C8a)	CACUGCAAGUGGACatcaacg	38	ttgatgUCCACUUGCAGUGUG	39
(1-C7)	CACUGCAAGUGGACatcaacg	40	ttgatGUCCACUUGCAGUGUG	41
(1-C6)	CACUGCAAGUGGACAtcaacg	42	ttgaUGUCCACUUGCAGUGUG	43
(1-C5)	CACUGCAAGUGGACAUcaacg	44	ttgAUGUCCACUUGCAGUGUG	45
(1-C4a)	CACUGCAAGUGGACAUcaacg	46	ttGAUGUCCACUUGCAGUGUG	47
(1-C3)	CACUGCAAGUGGACAUCAacg	48	tUGAUGUCCACUUGCAGUGUG	49
(1-C2)	CACUGCAAGUGGACAUAacg	50	UUGAUGUCCACUUGCAGUGUG	25
(1-C1)	CACUGCAAGUGGACAUAACg	51	UUGAUGUCCACUUGCAGUGUG	25
(1-C4b)	CACUGCAAGUGGACAUcaacg	46	UUGAUGUCCACUUGCAGUGtg	56

Trong bảng, các chữ viết hoa, chữ nhỏ, và đường gạch dưới lần lượt thể hiện ARN, ADN, và các vị trí nhô ra.

Ví dụ 4: Đánh giá hiệu quả ức chế sự biểu hiện TGF- β 1

Sử dụng các oligonucleotit thể hiện trong bảng 5 (nồng độ: 10nM hoặc 0,1nM), đánh giá được hiệu quả ức chế sự biểu hiện TGF- β 1 bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ 2. Kết quả thu được được thể hiện trong FIG.2 và bảng 6.

[Bảng 6]

siARN		Tỷ lệ biểu hiện mRNA TGF- β 1 (TGF- β 1/GAPDH)	
Số	nM	Trung bình	SD
1	10	34,9	4,2
1-C8a	10	56,6	13,2
1-C7	10	37,5	5,1
1-C6	10	38,8	0,5
1-C5	10	35,1	6,2
1-C4a	10	37,2	8,0
1-C3	10	23,0	6,3
1-C2	10	38,4	7,9
1-C1	10	33,0	2,5
1-C4b	0,1	69,9	4,3

Ví dụ 5: Tổng hợp siARN khảm có liên kết phosphat- hoặc thiophosphat

Dựa trên số siARN (1), thiết kế các phân tử siARN khảm có liên kết phosphat- hoặc thiophosphat hướng đích gen TGF- β 1 được thể hiện trong bảng 7 dưới đây và tổng hợp hóa học mỗi siARN oligonucleotit khảm. Tinh sạch oligonucleotit bằng HPLC trước khi sử dụng.

[Bảng 7]

siARN số	Chiều có nghĩa (5'→3')	SEQ ID NO	Chiều đối nghĩa (5'→3')	SEQ ID NO
(1-CP8a)	CACUGCAAGUGGAcatca <u>acg</u>	38	P-ttgatgUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	39
(1-CP7)	CACUGCAAGUGGACatca <u>acg</u>	40	P-ttgatGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	41
(1-CP6)	CACUGCAAGUGGACAtca <u>acg</u>	42	P-ttgaUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	43
(1-CP5)	CACUGCAAGUGGACA <u>Ucaacg</u>	44	P-ttgAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	45
(1-CP4a)	CACUGCAAGUGGACA <u>Ucaacg</u>	46	P-ttGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	47
(1-CP3a)	CACUGCAAGUGGACA <u>UCAacg</u>	48	P-tUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	49
(1-CP2)	CACUGCAAGUGGACA <u>UCAAacg</u>	50	P-UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
(1-CP1)	CACUGCAAGUGGACA <u>UCAAacg</u>	51	P-UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
(1-CP)	CACUGCAAGUGGACA <u>UCAAACG</u>	24	P-UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
(1-CP8b)	CACUGCAAGUGGAcatca <u>acg</u>	38	P-UUGAUGUCCACUUGCAGUGt <u>g</u>	56
(1-CP4b)	CACUGCAAGUGGACA <u>Ucaacg</u>	46	P-UUGAUGUCCACUUGCAGUGt <u>g</u>	56
(1-CPS4b)	CACUGCAAGUGGACA <u>Ucaacg</u>	46	PS-UUGAUGUCCACUUGCAGUGt <u>g</u>	56
(1-CP3b)	CACUGCAAGUGGACA <u>UcAkcg</u>	57	P-UUGAUGUCCACUUGCAGUGt <u>g</u>	56

Trong bảng, các chữ viết hoa, chữ nhỏ, và đường gạch dưới lần lượt thể hiện ARN, ADN, và vị trí nhô ra. Hơn nữa, P- và PS- lần lượt thể hiện sự phosphoryl hóa đầu tận cùng 5'- và sự thiophosphoryl đầu tận cùng 5'-.

Ví dụ 6: Đánh giá hiệu quả ức chế sự biểu hiện TGF- β 1

Sử dụng các oligonucleotit thể hiện trong bảng 7, đánh giá được hiệu quả ức chế sự biểu hiện TGF- β 1 bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ 2. Kết quả thu được được thể hiện trong FIG.3 và bảng 8.

[Bảng 8]

siARN		Tỷ lệ biểu hiện mARN TGF- β 1 (TGF- β 1/GAPDH)	
Số	nM	Trung bình	SD
1-CP8a	0,1	72,0	3,8
1-CP7	0,1	56,1	2,7
1-CP6	0,1	48,2	0,4
1-CP5	0,1	49,4	3,4
1-CP4a	0,1	45,1	3,6
1-CP3a	0,1	30,6	18,2
1-CP2	0,1	43,1	6,1
1-CP1	0,1	36,1	2,0
1-CP	0,1	44,9	2,0
1-CP8b	0,1	57,1	12,4
1-CP4b	0,1	46,4	17,4
1-CPS4b	0,1	70,8	2,2
1-CP3b	0,1	42,1	2,9

Ví dụ 7: Tổng hợp siARN có ADN ở phần nhô ra của nó

Dựa trên số siARN (1), thiết kế các phân tử siARN có ADN ở phần nhô ra và hướng đích gen TGF- β 1 được thể hiện trong bảng 9 dưới đây và tổng hợp hóa học mỗi siARN oligonucleotit. Tinh sạch oligonucleotit bằng HPLC trước khi sử dụng.

[Bảng 9]

siARN số	Chiều có nghĩa (5'→3')	SEQ ID NO	Chiều đối nghĩa (5'→3')	SEQ ID NO
1-OHa1	CACUGCAAGUGGACAUCAAC <u>Gt</u>	58	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
1-OHa2	CACUGCAAGUGGACAUCAAC <u>Gtt</u>	59	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
1-OHa3	CACUGCAAGUGGACAUCAAC <u>Gttt</u>	60	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
1-OHa4	CACUGCAAGUGGACAUCAAC <u>Gtttt</u>	61	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
1-OHa5	CACUGCAAGUGGACAUCAAC <u>Gttttt</u>	62	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
1-OHa6	CACUGCAAGUGGACAUCAAC <u>Gtttttt</u>	63	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
1-OHa7	CACUGCAAGUGGACAUCAAC <u>Gttttttt</u>	64	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
1-OHb1	CACUGCAAGUGGACAUCAAC <u>Gta</u>	65	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
1-OHb2	CACUGCAAGUGGACAUCAAC <u>Gttaa</u>	66	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
1-OHb3	CACUGCAAGUGGACAUCAAC <u>Gtttaaa</u>	67	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
1-OHb4	CACUGCAAGUGGACAUCAAC <u>Gttttaaaa</u>	68	UUGAUGUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	25
1-OHb5	CACUGCAAGUGGAcatcaac <u>ggttaa</u>	69	ttgatgUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	39
1-OHb6	CACUGCAAGUGGAcatcaac <u>ggtttaaa</u>	70	ttgatgUCCACUUGCAGUG <u>UG</u>	39

Trong bảng, các chữ viết hoa, chữ nhỏ, và đường gạch dưới lần lượt thể hiện ARN, ADN, và các vị trí nhô ra.

Ví dụ 8: Đánh giá hiệu quả ức chế sự biểu hiện TGF- β 1

Sử dụng các oligonucleotit thể hiện trong bảng 9, đánh giá được hiệu quả ức chế sự biểu hiện TGF- β 1 bằng phương pháp tương tự như phương pháp trong ví dụ 2. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 10.

[Bảng 10]

siARN		Tỷ lệ biểu hiện mRNA TGF- β 1 (TGF- β 1/GAPDH)	
Số	nM	Trung bình	SD
l-OHa1	0,1	26,0	1,0
l-OHa2	0,1	34,0	6,2
l-OHa3	0,1	32,8	3,8
l-OHa4	0,1	25,4	1,9
l-OHa5	0,1	27,4	1,5
l-OHa6	0,1	40,1	6,2
l-OHa7	1,0	39,7	22,6
l-OHb1	1	24,9	1,7
l-OHb2	1	25,6	0,9
l-OHb3	1	22,8	3,5
l-OHb4	1	20,4	1,5
l-OHb5	1	48,6	7,6
l-OHb6	1	46,6	6,7

Ví dụ 9: Đánh giá hiệu quả trong mẫu xơ hóa phổi (nghiên cứu *in vivo*)

Dựa trên số siARN (q) (SEQ ID NO: 34 và 35), là trình tự có chung ở chuột và người, thiết kế siARN khảm (q-C8: sợi có nghĩa (5' $\rightarrow$ 3'): CCAAGGGCUACCA_tgcccaact (52), sợi đối nghĩa (5' $\rightarrow$ 3'): ttggcaUGGUAGCCCUUGGGC (SEQ ID NO: 53), và theo cách tương tự với cách trong ví dụ 3, tổng hợp được siARN oligonucleotit khảm và sau đó tinh chế bằng HPLC. Sử dụng siARN oligonucleotit khảm tạo thành làm chất thử nghiệm, đánh giá hiệu quả trong mô hình chuột bị xơ hóa phổi do bleomycin.

Sau khi đưa pentobarbital (sản phẩm của Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) vào bụng chuột (C57BL/6N_{Cr}Slc (SLC), chuột nhắt cái, 13 tuần tuổi), cấy bơm thẩm thấu ALZET™ (mẫu 2001, DURECT Corporation) vào dưới da lưng của chuột trong khi gây tê để tạo ra chuột bị xơ hóa phổi. Chú ý rằng đầu tiên truyền 200 μ L dung dịch khoảng 10mg/mL bleomycin trong nước muối sinh lý vào bơm thẩm thấu ALZET™, và với bleomycin, sử dụng sản phẩm của Nippon Kayaku Co., Ltd.

Ba, bảy và 14 ngày sau khi cấy bơm thẩm thấu ALZET™, hòa tan chất thử nghiệm trong nước cất (sản phẩm của Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) và đưa vào qua đường khí quản bằng cách sử dụng MicroSprayer™ (model IA-1C, Penn-Century, Inc.) ở liều lượng 100 µg/cơ thể. Các thể tích liều lượng là 75 µL/cơ thể vào các ngày thứ 3 và 7, và 50 µL/cơ thể vào ngày thứ 14 sau khi bắt đầu đưa bleomycin vào.

Hơn nữa, làm đối chứng so sánh, nhóm trong đó chỉ có 200µL nước muối sinh lý được truyền vào bơm thẩm thấu ALZET™ và nước cất được sử dụng làm chất thử nghiệm, và nhóm trong đó 200µL dung dịch bleomycin khoảng 10mg/mL trong nước muối sinh lý được truyền vào bơm thẩm thấu ALZET™ và nước cất được dùng làm chất thử nghiệm.

Sau khi cấy bơm thẩm thấu ALZET™ vào sau thời gian 21 ngày, đưa pentobarbital vào chuột qua đường bụng, và trong khi gây tê, loại da và cơ cổ để lộ khí quản ra. Chuột bị chết do việc lấy máu qua tĩnh mạch cảnh, và sau đó, bằng cách sử dụng kim bên trong, truyền 2mL nước muối sinh lý (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) vào khí quản trong ba liều riêng biệt, và thu lại được khoảng 2mL chất lưu xúc rửa phế quản-phế nang (bronchoalveolar lavage fluid-BALF). Sau đó, mổ phanh ngực và rạch ở tâm nhĩ trái, và truyền khoảng 1mL nước muối sinh lý từ tâm thất phải, và cắt bỏ phổi. Để đánh giá mô, nhúng thùy trái của phổi đã cắt ra trong 10% dung dịch cố định đậm trung hòa formalin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Ly tâm BALF thu được (2000 vòng/phút, 4°C, trong thời gian 10 phút), và đo lượng TGF-β1 protein trong phần nổi trên bề mặt bằng ELISA. Kết quả thu được được thể hiện trong FIG.4. Trong FIG.4, SAL, DW, và BLM lần lượt là nước muối, nước cất, và bleomycin.

Đưa mô phổi đã cố định với 10% dung dịch cố định đậm trung hòa formalin vào trong parafin và chuẩn bị phần mô để nhuộm Hematoxylin-Eosin (H.E.) và nhuộm ba màu của Masson. Biểu đồ mô được thể hiện trong FIG.5.

Từ FIG.4, trong nhóm sử dụng chất thử nghiệm (BLM/TGF-β1), nhận thấy lượng TGF-β1 trong BALF giảm một cách đáng kể. Không quan sát thấy hiệu quả này trong nhóm sử dụng nước cất (BLM/DW) làm đối chứng so sánh. Hơn nữa, từ sơ đồ mô trong FIG.5, nhận ra rằng mức độ viêm và tạo xơ giảm trong nhóm sử dụng chất thử nghiệm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. siARN có chiều dài đầy đủ là 30 nucleotit hoặc ít hơn và được chọn từ nhóm gồm siARN chứa trình tự có nghĩa SEQ ID NO: 2 và trình tự đối nghĩa SEQ ID NO: 3; siARN chứa trình tự có nghĩa SEQ ID NO: 6 và trình tự đối nghĩa SEQ ID NO: 7; siARN chứa trình tự có nghĩa SEQ ID NO: 8 và trình tự đối nghĩa SEQ ID NO: 9; siARN chứa trình tự có nghĩa SEQ ID NO: 24 và trình tự đối nghĩa SEQ ID NO: 25; và siARN chứa trình tự có nghĩa SEQ ID NO: 54 và trình tự đối nghĩa SEQ ID NO: 55.
2. siARN theo điểm 1, trong đó 1 đến 10 nucleotit liên tiếp ngoại trừ nucleotit nhô ra từ đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa của siARN được chuyển thành ADN.
3. siARN theo điểm 1, trong đó 1 đến 10 nucleotit liên tiếp từ đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa của siARN được chuyển thành ADN.
4. siARN theo điểm 1, trong đó 1 đến 10 nucleotit liên tiếp ngoại trừ nucleotit nhô ra từ đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa của siARN được chuyển thành ADN và 1 đến 10 nucleotit liên tiếp từ đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa của siARN được chuyển thành ADN.
5. siARN theo điểm 1, trong đó đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa được phosphoryl hóa một lần.
6. Dược phẩm chứa siARN theo điểm 1 và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.
7. Phương pháp tạo ra chất ức chế sự biểu hiện gen TGF- β 1, phương pháp này bao gồm bước biểu hiện siARN theo điểm 1.
8. siARN theo điểm 1, trong đó đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa được thiophosphoryl hóa một lần.

9. siARN theo điểm 1, trong đó siARN này chứa trình tự có nghĩa SEQ ID NO: 2 và trình tự đối nghĩa SEQ ID NO: 3.

10. siARN theo điểm 1, trong đó siARN này chứa trình tự có nghĩa SEQ ID NO: 6 và trình tự đối nghĩa SEQ ID NO: 7.

11. siARN theo điểm 1, trong đó siARN này chứa trình tự có nghĩa SEQ ID NO: 8 và trình tự đối nghĩa SEQ ID NO: 9.

12. siARN theo điểm 1, trong đó siARN này chứa trình tự có nghĩa SEQ ID NO: 24 và trình tự đối nghĩa SEQ ID NO: 25.

13. siARN theo điểm 1, trong đó siARN này chứa trình tự có nghĩa SEQ ID NO: 54 và trình tự đối nghĩa SEQ ID NO: 55.

14. siARN theo điểm 1, trong đó tất cả hoặc một phần đoạn nhô ra ở đầu 3' của sợi có nghĩa được chuyển thành ADN.

15. siARN theo điểm 14, trong đó 1 đến 10 nucleotit liên tiếp ngoại trừ nucleotit nhô ra từ đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa của siARN được chuyển thành ADN và 1 đến 10 nucleotit liên tiếp từ đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa của siARN được chuyển thành ADN.

16. siARN có chiều dài đầy đủ là 30 nucleotit hoặc ít hơn và hướng đích trình tự gồm 17 đến 23 bazơ liên tiếp được chọn từ nhóm gồm các vị trí từ 1285 đến 1305 của SEQ ID NO: 1 và các vị trí từ 1398 đến 1418 của SEQ ID NO: 1.

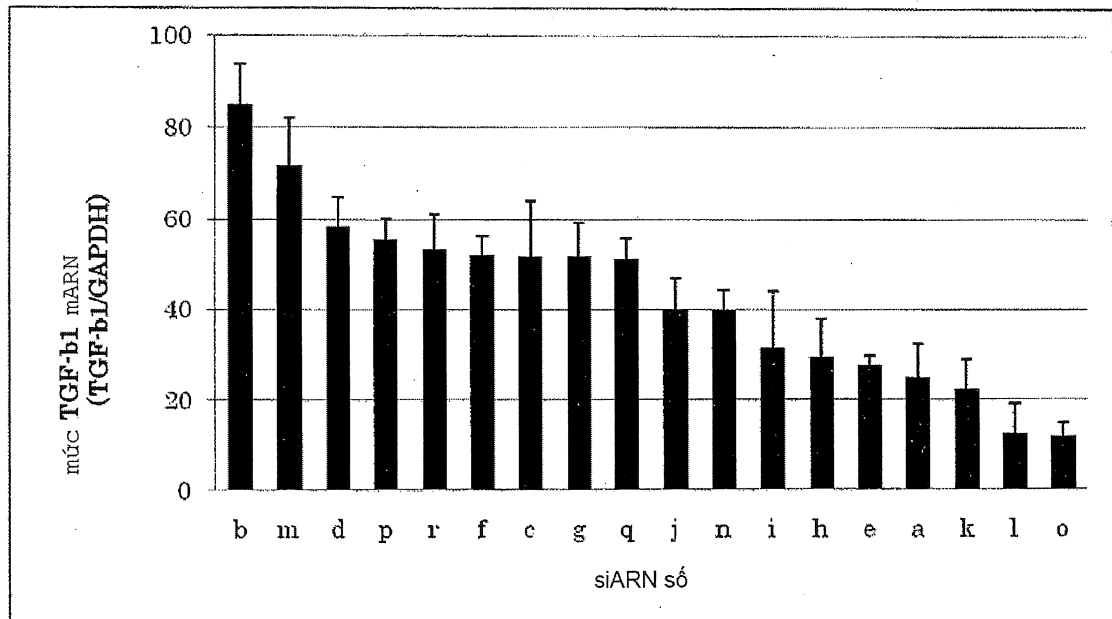


FIG.1

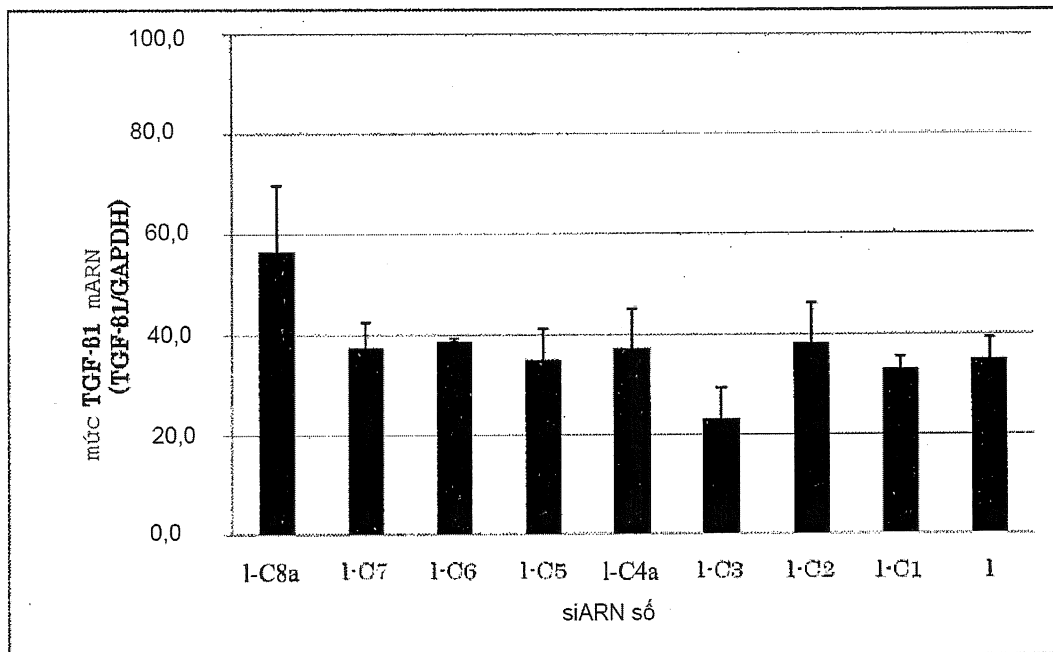


FIG.2

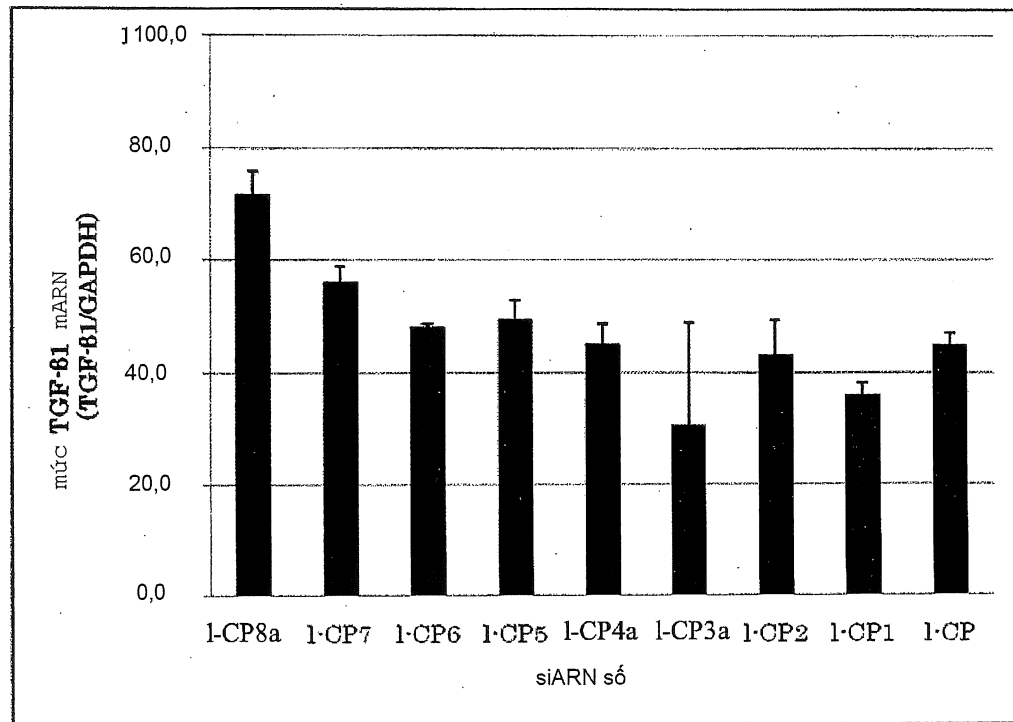


FIG.3

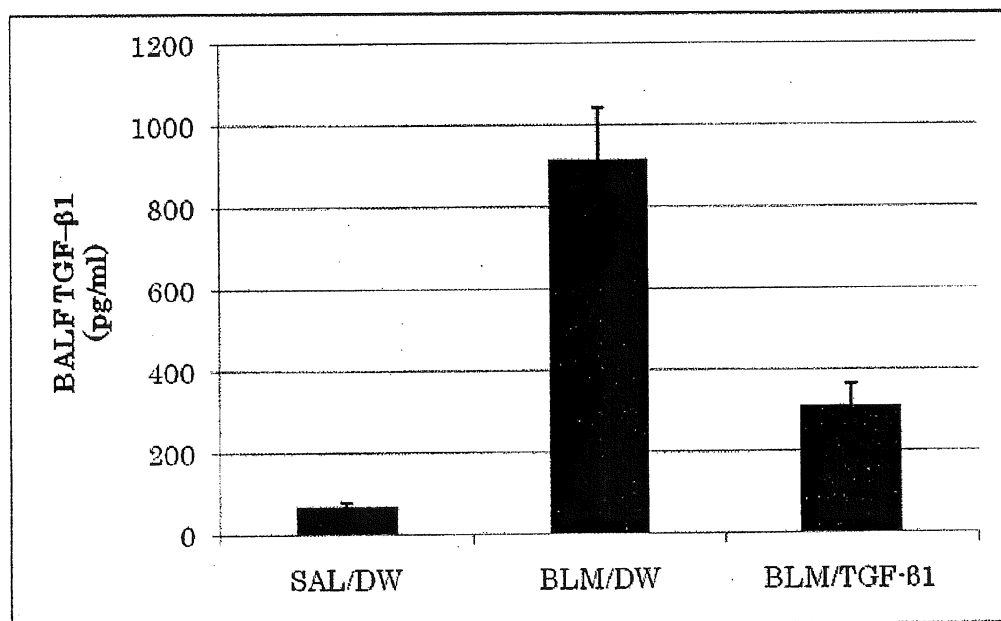


FIG.4

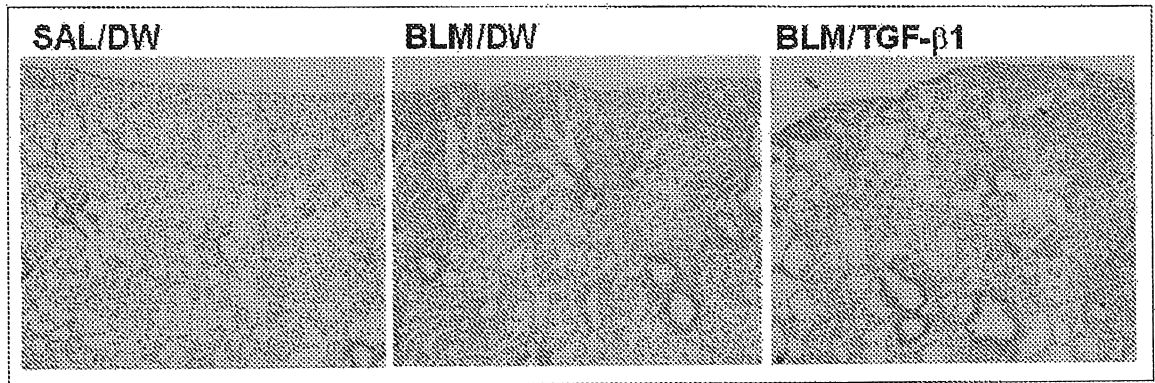


FIG.5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MIE UNIVERSITY
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD

<120> ARN CAN THIẾP NHỎ (siARN), DUỐC PHẨM CHỨA siARN VÀ PHƯƠNG PHÁP
TẠO RA CHẤT ỨC CHẾ SỰ BIỂU HIỆN GEN TGF- β 1

<130> OP0063

<150> JP 2010-231946

<151> 2010-10-14

<160> 70

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2346

<212> ARN

<213> Người hiện đại

<400> 1

ccuucgcgcc cugggccauc ucccuccac cuccuccgc ggagcagcca gacagcgagg
60

gccccggccg ggggcagggg ggacgccccg uccggggcac cccccggcu cugagccgcc
120

cgcggggccc gccucggccc ggagcggagg aaggagucgc cgaggagcag ccugaggccc
180

cagagucuga gacgagccgc cgccgcccc gccacugcgg ggaggagggg gaggaggagc
240

gggaggaggg acgagcuggu cgggagaaga ggaaaaaac uuugagacu uuuccguugc
300

cgcugggagc cggaggcgcg gggaccucu ggcgcgacgc ugccccgcga ggaggcagga
360

cuuggggacc ccagaccgcc uccuuugcc gccggggacg cuugcuccu ccugccccc
420

uacacggcgu ccucaggcg ccccauucc ggaccagccc ucgggagucg ccgaccggc
480

cucccgcaa gacuuuucc cagaccucgg gcgcaccccc ugcacgccgc cuucauccc
540

ggccugucuc cugagccccc gcgcaucca gaccuuucu ccuccaggag acggaucucu
600

cuccgaccug ccacagaucc ccuaaucaag accaccacc uucugguacc agaucgcgcc
660

caucuagguu auuuccgugg gauacugaga ccccccggu ccaagccucc ccuccaccac
720

ugcgcccuc ucccugagga ccucagcuu cccucgaggc ccuccuaccu uuugccggga
 780
 gacccccagc cccugcaggg gcggggccuc cccaccacac cagcccuguu cgcgcucucg
 840
 gcagugccgg ggggcccgc cuccccaug cgcgccuccg ggcugcggcu gcugccgcug
 900
 cugcuaccgc ugcuguggcu acuggugcug acgcugggc gccggccgc gggacuaucc
 960
 accugcaaga cuaucgacau ggagcuggug aagcggagc gcaucgaggc cauccgcggc
 1020
 cagauccugu ccaagcugcg gcucgccagc cccccgagcc agggggaggu gccgcccggc
 1080
 ccgcugcccc aggccgugcu cgcccuguac aacagcacc gcgaccgggu ggccggggag
 1140
 agugcagaac cggagccga gccugaggcc gacuacuac ccaaggaggu cccccgcug
 1200
 cuaauggugg aaaccacaa cgaaaucua gacaaguca agcagaguac acacagcaua
 1260
 uauauguucu ucaacacauc agagcuccga gaagcggua cugaaccgu guugcucucc
 1320
 cgggcagagc ugcgucugcu gaggcucaag uaaaaagugg agcagcacgu ggagcuguac
 1380
 cagaaauaca gcaacaauuc cuggcgauac cucagcaacc ggcugcuggc acccagcgac
 1440
 ucgccagagu gguuauuuu ugaugucacc ggaguugugc ggcagugguu gagccgugga
 1500
 ggggaaauug agggcuuucg ccuagcgcc cacugcuccu gugacagcag ggauaacaca
 1560
 cugcaagugg acaucaacgg guucacuacc ggccgccgag gugaccuggc caccuaucau
 1620
 ggcaugaacc ggccuuuccu gcuucuaug gccaccccg uggagagggc ccagcaucug
 1680
 caaagcuccc ggcaccgcc agcccgagc accaacuau gcuucagcuc cacggagaag
 1740
 aacugcugcg ugcggcagcu guacauugac uuccgcaag accucggcug gaaguggauc
 1800
 cacgagccca agggcuacca ugccaacuuc ugccucgggc ccugccccua cauuuggagc
 1860
 cuggacacgc aguacagcaa gguccuggcc cuguacaacc agcauaacc gggcgccucg
 1920

gcggcgccgu gcugcgugcc gcaggcgug gagccgcugc ccaucgugua cuacgugggc
1980

cgcaagccca agguggagca gcuguccaac augaucgugc gcuccugcaa gugcagcuga
2040

ggucccgccc cgccccgccc cgccccggca ggccccggccc caccgccccc cgcccccgcu
2100

gccuugccca ugggggugcu auuuuaggac acccgugccc caagcccacc uggggcccca
2160

uuuuaagugg agagaggacu gcggaucucu gugucauugg gcgccugccu ggggucucca
2220

ucccugacgu uccccacuc ccacuccuc ucucuccuc ucugccuccu ccugccuguc
2280

ugcacuauuc cuuugcccgg caucaaggca caggggacca guggggaaca cuacuguagu
2340

uagauc
2346

<210> 2
<211> 21
<212> ARN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Sợi cố nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 2
ccgagaagcg guaccugaac c
21

<210> 3
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 3
uucagguacc gcuucucgga g
21

<210> 4
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi cố nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 4

ccugaacccg uguugcucuc c
21

<210> 5
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 5
agagcaacac gguucaggu a
21

<210> 6
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 6
ccuggcgaua ccucagcaac c
21

<210> 7
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 7
uugcugaggu aucgccagga a
21

<210> 8
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 8
gcgacucgcc agagugguua u
21

<210> 9
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 9

aaccacucug gcgagucgcu g

21

<210> 10

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 10

cgacucgccca gagugguuau c

21

<210> 11

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 11

uaaccacucu ggcgagucgc u

21

<210> 12

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 12

gacucgccag agugguuau c

21

<210> 13

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 13

auaaccacuc uggcgagucg c

21

<210> 14

<211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi cố nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 14
 cucgccagag ugguuauuu u
 21

<210> 15
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 15
 agauaaccac ucuggcgagu c
 21

<210> 16
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi cố nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 16
 cgccagagug guuauuuuu g
 21

<210> 17
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 17
 aaagauaacc acucuggcga g
 21

<210> 18
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi cố nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 18

gccagagugg uuaucuuuug a
21

<210> 19
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 19
aaaagauaac cacucuggcg a
21

<210> 20
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 20
cagagugguu aucuuuugau g
21

<210> 21
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 21
ucaaaaagaua accacucugg c
21

<210> 22
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 22
gggauaacac acugcaagug g
21

<210> 23
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 23

acuugcagug uguuaucuccu g

21

<210> 24

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 24

cacugcaagu ggacaucaac g

21

<210> 25

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 25

uugaugucca cuugcagugu g

21

<210> 26

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 26

ccaccauucg uggcaugaac c

21

<210> 27

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 27

uucaugccau gaaugguggc c

21

<210> 28

<211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi cố nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 28
 gccucggaca ccaacuauug c
 21

<210> 29
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 29
 aauguuggu guccagggcu c
 21

<210> 30
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi cố nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 30
 gacaccaacu auugcuucag c
 21

<210> 31
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 31
 ugaagcaaua guuggugucc a
 21

<210> 32
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi cố nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 32

gaccucggcu ggaaguggau c
21

<210> 33
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 33
uccacuucca gccgaggucc u
21

<210> 34
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 34
ccaagggcua ccaugccaac u
21

<210> 35
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 35
uuggcauggu agcccuuggg c
21

<210> 36
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 36
cccuguacaa ccagcauaac c
21

<210> 37
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 37

uuauugcuggu uguacagggc c

21

<210> 38

<211> 21

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (1) .. (13)

<223> ARN

<400> 38

cacugcaagu ggacatcaac g

21

<210> 39

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (7) .. (21)

<223> ARN

<400> 39

ttgatgucca cuugcagugu g

21

<210> 40

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (1) .. (14)

<223> ARN

<400> 40

cacugcaagu ggacatcaac g
21

<210> 41
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (6) .. (21)
<223> ARN

<400> 41
ttgatgucca cuugcagugu g
21

<210> 42
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (1) .. (15)
<223> ARN

<400> 42
cacugcaagu ggacatcaac g
21

<210> 43
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (5) .. (21)
<223> ARN

<400> 43
ttgaugucca cuugcagugu g
21

<210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1)..(16)
 <223> ARN

<400> 44
 cacugcaagu ggacaucaac g
 21

<210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (4)..(21)
 <223> ARN

<400> 45
 ttgaugucca cuugcagugu g
 21

<210> 46
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1)..(17)
 <223> ARN

<400> 46
 cacugcaagu ggacaucaac g
 21

<210> 47
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (3) .. (21)
 <223> ARN

<400> 47
 ttgaugucca cuugcagugu g
 21

<210> 48
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1) .. (18)
 <223> ARN

<400> 48
 cacugcaagu ggacaucaac g
 21

<210> 49
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (2) .. (21)
 <223> ARN

<400> 49
 tugaugucca cuugcagugu g
 21

<210> 50
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1) .. (19)
 <223> ARN

<400> 50
 cacugcaagu ggacaucaac g
 21

<210> 51
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1) .. (20)
 <223> ARN

<400> 51
 cacugcaagu ggacaucaac g
 21

<210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1) .. (13)
 <223> ARN

<400> 52
 ccaagggcua ccatgccaac t
 21

<210> 53
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (7) .. (21)
 <223> ARN

<400> 53
 ttggcauggu agcccuuggg c
 21

<210> 54
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 54
 cacacugcaa guggacauca acg
 23

<210> 55
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<400> 55
 cguugauguc cacuugcagu gug
 23

<210> 56
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Sợi đối nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1)..(19)
 <223> ARN

<400> 56
 uugaugucca cuugcagugt g
 21

<210> 57
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1)..(18)
 <223> ARN

<400> 57
 cacugcaagu ggacaucaac g
 21

<210> 58
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1)..(21)
 <223> ARN

<400> 58
 cacugcaagu ggacaucaac gt
 22

<210> 59
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1)..(21)
 <223> ARN

<400> 59
 cacugcaagu ggacaucaac gtt
 23

<210> 60
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1)..(21)
 <223> ARN

<400> 60
cacugcaagu ggacaucaac gttt
24

<210> 61
<211> 25
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (1)..(21)
<223> ARN

<400> 61
cacugcaagu ggacaucaac gtttt
25

<210> 62
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (1)..(21)
<223> ARN

<400> 62
cacugcaagu ggacaucaac gttttt
26

<210> 63
<211> 27
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
<221> Đặc điểm hỗn hợp
<222> (1)..(21)
<223> ARN

<400> 63
cacugcaagu ggacaucaac gtttttt
27

<210> 64
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1)..(21)
 <223> ARN

<400> 64
 cacugcaagu ggacaucaac gttttttt
 28

<210> 65
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1)..(21)
 <223> ARN

<400> 65
 cacugcaagu ggacaucaac gta
 23

<210> 66
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1)..(21)
 <223> ARN

<400> 66
 cacugcaagu ggacaucaac gttaa
 25

<210> 67
 <211> 27

<212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1) .. (21)
 <223> ARN

<400> 67
 cacugcaagu ggacaucaac gtttaaa
 27

<210> 68
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1) .. (21)
 <223> ARN

<400> 68
 cacugcaagu ggacaucaac gttttaaaa
 29

<210> 69
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>
 <221> Đặc điểm hỗn hợp
 <222> (1) .. (21)
 <223> ARN

<400> 69
 cacugcaagu ggacatcaac gttaa
 25

<210> 70
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Sợi có nghĩa của siARN được tổng hợp nhân tạo

<220>

<221> Đặc điểm hỗn hợp

<222> (1)..(21)

<223> ARN

<400> 70

cacugcaagu ggacatcaac gtttaaa

27