

ÖZET**SİRNA VE GÖZ RAHATSIZLIKLARININ TEDAVİSİ VE/VEYA ÖNLENMESİNE
YÖNELİK YÖNTEMLER VE BİLEŞİMLERDE KULLANIMLARI**

- 5 Buluş, vanilloid-1 reseptörünün (TRPV1) ekspresyonunun ve/veya aktivitesinin yüksek seviyeleri ile ilgili göz rahatsızlıklarının tedavisi ve/veya önlenmesine yönelik yöntemler ve bileşimlerle ilgili.

İSTEMLER

1. Bir göz rahatsızlığının tedavisinde kullanıma yönelik olarak SEQ ID NOlar: 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 veya 16'dan seçilen bir nükleotid dizi içeren bir siRNA olup, özelliği artırılmış TRPV1 ekspresyonu ve/veya aktivitesi **ile karakterize edilmesidir**,
5 burada söz konusu molekül spesifik olarak SEQ ID NO: 1'i hedefler ve burada söz konusu siRNA'nın kullanımı, TRPV1'in ekspresyonunu ve/veya aktivitesini azaltır.
 2. İstem 1'e göre kullanıma yönelik bir siRNA olup, özelliği söz konusu göz rahatsızlığının oküler ağrı olmasıdır.
- 10
3. İstemler 1 veya 2'ye göre kullanıma yönelik bir siRNA olup, özelliği söz konusu göz rahatsızlığının refraktif cerrahi, kontakt lens kullanımı, kuru göz sendromu ve Sjogren sendromunu takiben değişen duyarlılıktan seçilmiş olmasıdır.
154. SEQ ID NOlar: 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 veya 16'dan seçilen bir nükleotid dizisi içeren bir siRNA'nın bir göz rahatsızlığının tedavisine yönelik bir ilaç üretiminde kullanımı olup, özelliği artırılmış TRPV1 ekspresyonu ve/veya aktivitesi **ile karakterize edilmesidir** ve burada söz konusu siRNA'nın kullanımı, TRPV1'in ekspresyonunu ve/veya aktivitesini azaltır.
- 20
5. İstem 4'e göre kullanım olup, özelliği söz konusunu göz rahatsızlığının oküler ağrı olmasıdır.
 6. İstem 4 veya 5'e göre kullanım olup, özelliği söz konusu göz rahatsızlığının refraktif
25 cerrahi, kontakt lens kullanımı, kuru göz sendromu ve Sjogren sendromunu takiben değişen duyarlılıktan seçilmiş olmasıdır.

TARİFNAME
SİRNA VE GÖZ RAHATSIZLIKLARININ TEDAVİSİ VE/VEYA ÖNLENMESİNE
YÖNELİK YÖNTEMLER VE BİLEŞİMLERDE KULLANIMLARI

5 BULUŞ SAHASI

Mevcut buluş, siRNA ürünlerinin tedarığı ve bunların, RNA interferansı kullanılarak geçici reseptör potansiyeline sahip vanilloid (TRPV1) ekspresyonunun ve/veya aktivitesinin yüksek seviyeleri ile ilgili göz rahatsızlıklarının tedavisi ve/veya 10 önlenmesine yönelik yöntemler ve bileşimlerde kullanımı ile ilgilidir. Diğerleri arasında, refraktif cerrahi, kontakt lens kullanımı, kuru göz sendromu ve Sjogren sendromu gibi rahatsızlığa ve korneanın duyarlılığı gibi oküler ağrıya bağlı göz rahatsızlıkları hafifletilecektir.

15 BULUŞUN ALT YAPISI

RNA interferansı (RNAi), homoloji bağımlı gen susturmayı yönlendirmek üzere küçük çift zincirli RNA (dsRNA) molekülleri kullanan çoğu ökaryotik hücrenin doğal olarak oluşan bir düzenleyici mekanizmasıdır. Fire and Mello in the worm *C. elegans* {Fire, 20 1998} tarafından keşfi, 2006 yılında Nobel ödülüne layık görüldü. İlk tarifnamesinden kısa bir süre sonra, RNAi'nin, uzun dsRNA'lardan değil, 21 nükleotit uzunluğunda (Elbashir, 2001) çift zincirli küçük etkileşen RNA'lar (siRNA'lar) aracılığıyla memeli hücrelerinde ortaya çıktığı gösterilmiştir.

25 RNA etkileşiminin, yabancı genlerin sentezlenmesini önlemek üzere kullanılan evrimsel olarak korunan bir hücrel savunma mekanizması olduğu düşünülür ve yaygın olarak, post transkripsiyonel gen susturması olarak adlandırılan çeşitli filum ve floralar tarafından paylaşılır. RNAi mekanizmasının keşfinden beri, gen ekspresyonunu, küçük molekülleri veya proteinleri içeren geleneksel farmasötik yaklaşımlarla başka şekilde 30 "aşılabilir" olan hedefleri ele alarak, insan hastalığını tedavi etmenin yeni bir yolu olarak seçici şekilde değiştirebilen yeni bileşikleri ortaya çıkarmak üzere bir araştırma patlaması olmuştur.

Mevcut bilgiye göre, uzun çift zincirli RNA'lar, Dicer olarak bilinen bir RNaz III benzeri 35 protein tarafından işlendiğinde RNAi mekanizması başlatılır. Dicer proteini, tipik olarak,

bir N-terminal RNA helikaz domenini, bir RNA-bağlanma olarak adlandırılan Piwi/Argonaute/Zwille (PAZ) domenini, iki RNaz III domenini ve bir çift zincirli RNA bağlanma domenini (dsRBD) içerir {Collins, 2005} ve aktivitesi, uzun çift zincirli RNA'ların, 2 baz 3' çıkıntıları ve bir 5' fosfat ve 3' hidroksil grubu ile 21-24 nükleotit çift

5 zincirli siRNA'lara işlenmesine yol açar. Elde edilen siRNA dubleksleri, daha sonra, RISC'nin tanınmasına yönelik olarak, siRNA'nın antisens veya kılavuz zincirinin yönlendirdiği RNA ile indüklenen susturucu kompleks (RISC) olarak bilinen efektör kompleksine dahil edilir ve bir RNA helikaz aktivitesi {Nykanen, 2001} aracılığıyla çift

10 zincirli siRNA molekülünün adenosin-trifosfat (ATP) bağımlı çözülmesi üzerine hedef mRNA dizilerini ayırır {Elbashir, 2001}. MRNA bozunmasına yol açan RISC'nin katalitik aktivitesine, endonükleaz Argonaute 2 (AGO2) aracılık eder {Liu, 2004; Song, 2004}. AGO2, yüksek oranda korunmuş Argonaute protein familyasına aittir. Argonaute proteinleri, PIWI ve PAZ domenleri olmak üzere iki ortak etki alanı ihtiva eden ~100

15 KDa yüksek proteinli proteinlerdir {Cerutti, 2000}. PIWI domeni, Dicer ile etkileşim için çok önemlidir ve mRNA'ların bölünmesinden sorumlu olan nükleaz aktivitesini içerir {Song, 2004}. AGO2, tamamlayıcı dizileri içeren haberci RNA'ları bulmak üzere bir kılavuz olarak siRNA dubleksinin bir zincirini kullanır ve kılavuz telinin 5' ucuna göre bazlar (10 ve 11) arasındaki fosfodiester omurgasını parçalara ayırır {Elbashir, 2001}. RISC'nin aktivasyonu sırasındaki önemli bir adım, AGO2 tarafından duyu veya yolcu

20 zincirinin bölünmesi ve bu zincirin kompleksten çıkarılmasıdır {Rand, 2005}. siRNA kılavuz zinciri ve PIWI domeni arasındaki etkileşimi inceleyen kristalografi çalışmaları, RISC tarafından hedef mRNA tanımayı yönlendiren bir "tohum dizisi" oluşturan sadece 2 ila 8 nükleotiti olduğunu ve bu dizideki tek bir nükleotitin uyumsuzluğunun, molekülün susturma yeteneğini büyük ölçüde etkileyebileceğini ortaya çıkarır {Ma, 2005; Doench

25 2004; Lewis, 2003}. RISC, sonraki basamaklara yönelik geri dönüştürülürken {Hutvagner, 2002}, MRNA bölünmesinden sonra ve fragmanlarda korunmasız RNA'nın mevcut olması nedeniyle, mRNA ayrıca, intraselüler nükleazlar tarafından parçalanır ve bozunur ve bundan sonra proteinlere dönüştürülmez {Orban, 2005}. Bu, spesifik mRNA moleküllerinin ve karşılık gelen proteinlerin seçici indirgenmesine yol açan katalitik bir

30 süreç oluşturur. siRNA efektörlerinin, hücrelere veya dokulara doğrudan verilmesi aracılığıyla, herhangi bir geni (leri) düzenlemek amacıyla bu doğal mekanizmayı gen susturmaya yönelik kullanmak mümkündür, burada bunlar, RISC'yi aktive edecekler ve hedeflenen mRNA'nın güçlü ve spesifik bir susturulmasını üreteceklerdir.

Bir siRNA'nın, uzunluk, yapı, kimyasal kompozisyon ve dizi ile ilgili maksimum etkenlik elde etmek üzere sahip olması gereken ideal özellikleri açıklayan birçok çalışma yayınlanmıştır. siRNA tasarımına yönelik ilk parametreler, o zamandan beri çok sayıda çalışma, algoritma ve/veya geliştirme yayınlanmış olmasına rağmen, Tuschl ve meslektaşları tarafından W002/44321'de ortaya konmuştur. Örneğin, US 2008/085998, söz konusu siRNA'ların kullanımına yönelik geliştirilmiş siRNA'lar, kitler ve yöntemlerin listesini açıklar, burada söz konusu siRNA'lar özellikle memelilerin sistemlerinde artırılmış etkinliğe sahiptir.

Ayrıca, biyolojik sıvılardaki RNAzların her zamanki yapısı göz önünde bulundurulduğunda, bu, siRNA'yı baz alan tedaviye yönelik başlıca engellerden biri olarak algılanan siRNA stabilitesini arttırmaya yönelik pek çok çaba sarf edilmiştir. Stabilitate arttırımı için izlenen başlıca stratejilerden biri, 2'-O-metil nükleotitler, 2'-amino nükleotitler, 2'-O veya 4'-C metilen köprüler içeren nükleotitler gibi modifiye edilmiş nükleotitlerin kullanılması olmuştur. Ayrıca, bitişik nükleotitleri bağlayan ribonükleotit omurgasının modifikasyonu, esas olarak, fosforotioat modifiye nükleotitlerin yerleştirilmesi aracılığıyla tarif edilmiştir. Gelişmiş stabilitenin, çoğu zaman etkinlik ile ters orantılı olduğu görülmektedir (Parish, 2000) ve sadece belirli bir sayı, modifiye edilmiş nükleotitlerin pozisyonları ve/veya kombinasyonları, stabil bir susturma bileşiği ile sonuçlanabilir. Bunun, siRNA tabanlı tedaviler içinde önemli bir engel olması nedeniyle, iyi sonuçlar gösteren belirli modifikasyon modellerini açıklayan farklı çalışmalar yayınlanmıştır, literatürde daha birçok bulunabilmesine karşın, bunların örnekleri arasında, EP1527176, W02008/050329, W02008/104978 veya W02009/044392 bulunur. Örnek olarak, Czauderna et al, 2003 (Nucleic Acids Research 2003, Cilt. 31, No. 11, sayfalar 2705-2716) terminal modifikasyon içeren moleküller olmamak üzere, 2'-O-metil modifikasyonlarını açıklar, bunlar serum deriveli nükleazlara karşı korunur. Yazarlar, bu modifiye molekülleri, *in vivo* sentetik siRNA'ların potansiyel terapötik uygulamasına yönelik olarak daha uygun olabileceği ikinci jenerasyon siRNA'lar olarak tarif ederler. Yine de, bu doküman TRPV1'e karşı herhangi siRNA hedefini açıklamaz veya ikinci jenerasyon siRNA'ların bunu yapmaya yönelik olarak kullanılabildiği şeklinde yorumlamaz.

Aynı zamanda, Vanilloid Reseptörü 1 (VR-1) olarak adlandırılan, Geçici Reseptör Potansiyel Vanilloid-1 (TRPV1), 1997'de ilk kez keşfedilen bir kapsaisin-duyarlı ligand-kapılı katyon kanalıdır (Caterina, 1997). TRPV1, esas olarak, duyuşal nöronlar üzerinde

eksprese edilir ve ısı, kapsaisin, protonlar ve endovanilloidler için bir moleküler detektör görevi görür (Caterina, 2001; Montell, 2002; Baumann, 2000). Bununla birlikte, mevcut başvurunun sahipleri, lakrimal bez ve siliyer gövde dokularında TRPV1 ekspresyonunu bulmuşlardır.

5

TRPV1, kapsaisin gibi agonistler ve ısı, asidoz, lipoksijenaz ürünleri veya anandamid gibi diğer faktörler tarafından aktive edildiğinde, kalsiyum hücrenin içine girer ve ağrı sinyalleri başlatılır. Kanalin aktivasyonu, merkezi ve periferik duyu sinir terminallerinden nöropeptit salınımını indükler, bu durum, ağrı hissi, nörojenik iltihap ve bazen düz kas kasılması ve öksürük ile sonuçlanır. Aslına bakılırsa, yeni kanıtlar, ağrı, 10 öksürük, astım ve üriner inkontinansta TRPV1'in rolünü düşündürür (Jia, 2005). Esasen, TRPV1 ağrı uyaranlarına yanıt olarak analjezi ile tedavilere yönelik bilinen bir hedefdir. Ayrıca, farklı teknolojiler kullanılarak TRPV1'in ekspresyon seviyelerini azaltmak üzere tasarlanan tedaviler, W02004/042046'da (Schubert, 2005), ağrının 15 tedavisine odaklanarak tanımlanmıştır. Örneğin US2006/122136, tür 10-23 DNA enzimlerinin VR1 mRNA'ya bölünmesine yönelik olarak kullanımını açıklar, burada bu enzimler nükleolitik bozunmaya karşı daha yüksek stabilite gösterir. Aslında, mevcut buluşta açıklandığı üzere, bu doküman yüksek derecede etkili TRPV1 spesifik siRNA'ların kullanımını açıklamaz.

20

Polimodal nosiseptörler, korneada en çok bulunan nosiseptör tipidir. Kapsaisine, ısıya ve aside tepki vermeleri nedeniyle, bu reseptör fiberlerinin, TRPV1 reseptörünü eksprese ettiğine dair farmakolojik kanıtlar mevcuttur. Ayrıca, yüksek dozda kapsaisin, korneal polimodal nosiseptörlerin ısı ve aside duyarlılıklarını inaktive eder ve mekanik 25 duyarlılığı etkilenmez. Bu, korneal polimodal sinir uçlarında bulunan TRPV1 reseptörlerinin, seçici olarak etkisiz hale getirildiğini gösterir. Bu nedenle, korneal hasarın akut nosiseptif tepkisinin önemli bir parçasının ve bu dokudaki enflamatuar ve irritatif süreçlere eşlik eden sürekli ağrı duyularına TRPV1 aktivasyonunun aracılık etmesi muhtemeldir.

30

US2006/122136 ayrıca TRPV1 spesifik siRNA'ların, VR1 ile ilişkili ağrının ve diğer patolojik rahatsızlıkların tedavisine yönelik kullanımını açıklar. Dahası, W02007/045930, oküler ağrı ve kuru göz sendromu ile ilgili oküler patolojilerin tedavisine yönelik TRPV1 spesifik siRNA'ların kullanımını açıklar. WO2009/023025 35 ayrıca, ototoksisiteyi engellemek üzere ayrıca reaktif oksijen türlerinin ekspresyonunu

düşürmeye yönelik bir çaba ile TRPV1 spesifik siRNA'ların, NOX3'lere karşı yönlendirilen siRNA'lar ile kombineli şekilde kullanımını açıklar. Bununla birlikte, mevcut buluş TRPV1 ekspresyonunu ve sonuçta ortaya çıkan oküler rahatsızlığı azaltmaya yönelik geliştirilmiş ürünler sağlar. Bu koşulları, geleneksel kimyasal inhibitörlere karşı siRNA ürünleri ile tedavi etmenin avantajı, siRNA'yı baz alan tedavilerin daha uzun süreli bir etkiye sahip olmasıdır. Bu sonuç, geleneksel tedaviler, hücre zarındaki reseptör seviyelerini bozulmamış olarak bırakırken, hücrenin efektör molekül mevcut olmadığı takdirde, yeni reseptörleri sıfırdan sentezlemek zorunda kalması sebebiyledir.

10

Mevcut yaşam tarzı nedeniyle, değişen oküler duyarlılık ile ilişkili oküler patolojilerden etkilenen insan sayısı oldukça yüksektir ve nüfusun yaşlanması ile birlikte artması beklenir. Genellikle, refraksiyon cerrahisi ve kontakt lens kullanımı, hastada, değişen kornea duyarlılığı ve kuru göz hissi oluşturur. Bu, aynı zamanda, bilgisayar ekranlarına bakarak uzun çalışma saatleri ve genellikle atmosferi daha fazla kurutan klima sistemlerinin kullanımı aracılığıyla şiddetlenir. Ayrıca, yaşın ilerlemesi ile gözyaşı miktarı ve kalitesi azalır. Kuru göz sendromlarına eşlik eden semptomlar, kaşıntı, yanma ve oküler dokuların tahrişini içerir. Sjogren sendromuna sahip olan hastalarda, daha ciddi bir kuru göz formu oluşur. Bu hislerin birinin veya farklı kombinasyonlarının varlığı, mevcut metnin anlamı içinde oküler ağrı olarak adlandırılır. Mevcut durumda, kuru göz sendromunun 10 milyondan fazla Amerikalıyı etkilediği tahmin edilir.

20

ŞEKİLLERİN AÇIKLAMASI

25

Şekil 1, TRLV1'i hedefleyen farklı siRNA'lar ile HeLa hücrelerinin transfeksiyonundan sonra, Qrt-PCR kullanılarak, TRPV1'in geçici ekspresyon profilini gösteren bir diyagramdır: mevcut buluşa göre bir bileşik (SEQ ID NO: 2), TRPV1'i hedeflemek üzere tasarlanmış olan, daha önce tarif edilen farklı bir bölgeyi (SEQ ID NO: 7) ve başka bir dört adet siRNA'yı (SEQ ID NO: 17 ila 20) hedefleyen bir bileşik ve negatif kontrol olarak kullanılan bir karıştırma dizisi. Netliği sağlamak üzere aynı sonuçlara ait iki alternatif temsil gösterilir.

30

Şekil 2, mevcut buluşun farklı siRNA'ları ile HeLa hücrelerinin transfeksiyonundan sonra, Qrt-PCR kullanılarak TRPV1'in geçici ekspresyon profilini gösteren bir

diyagramdır: SEQ ID NO: 2 ila SEQ ID NO: 6 ve SEQ ID NO: 8 ila SEQ ID NO: 16 ve bir negatif kontrol olarak kullanılan bir karıştırma dizisi.

Şekil 3, kapsaisin ile uyardıktan sonra, TRPV1'e bağlı ağrıya yönelik kabul edilen spesifik bir analjezik olan kapsazepine kıyasla, mevcut buluşun bir bileşiği (SEQ ID NO: 2) ile muamele edilmiş tavşanlara ait gözlerin mm'sinde ölçülen palpebral açıklığa sahip bir zaman çizelgesini gösterir.

Şekil 4, mevcut buluşun bir bileşiği (SEQ ID NO: 2) ve kapsazepin ile tedaviden kaynaklanan, kapsaisin ile ağrı indüksiyonundan sonra palpebral açıklığın ön test değerlerine göre oranını (%) gösteren bir grafikdir.

Şekil 5, 24 saat boyunca %10 plazmaya maruz bıraktıktan sonra bozulmamış halde kalan (%) miktarını gösteren bir grafikdir.

15 **BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI**

İlk aşıda, tarifname bir siRNA molekülünün tedariki ile ilgilidir, burada söz konusu molekül, spesifik olarak, SEQ ID NO: 1'i hedefler ve bir hücre içine yerleştirildiğinde, TRPV1 geninin ekspresyonunu azaltır.

20

Örneğin, siRNA molekülü, genin ekspresyonunu seçici olarak azalttığı veya inhibe ettiğinde, bir gen, mevcut buluşa göre bir siRNA tarafından "hedeflenir". Burada kullanılan "seçici olarak azaltma veya inhibe etme" ifadesi, bir genin ekspresyonunu etkileyen, bu durumda TRPV1 olan, siRNA'ları kapsar. Alternatif olarak, bir siRNA, siRNA, sıkı koşullar altında, gen transkriptine, diğer bir deyişle mRNA'sına hibritleştiğinde, bir geni hedefler. "Sıkı koşullar altında" hibridize edilebilmek, hedef mRNA bölgesine, örneğin hibritleşmeyi reddetme eğilimi gösteren yüksek sıcaklık ve/veya düşük tuz içeriği gibi standart koşullar altında, yeniden birleşme anlamına gelir. Uygun bir protokol (2 saat boyunca 0.1 x SSC, 68°C karıştırılır), Maniatis, T., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, at pages 387-389'da açıklanır.

30

Burada belirtilen nükleik asit dizileri, aksi belirtilmediği sürece, 5 'ila 3' yönünde yazılır. "Nükleik asit" terimi, DNA (adenin "A", sitozin "C", guanin "G", timin "T") veya RNA'da (adenin "A", sitozin "C", guanin "G", urasil "U") bulunan pürin veya pirimidin bazlarını

35

içeren DNA'yı veya RNA'yı veya bunun modifiye edilmiş bir formunu referans eder. Burada sağlanan etkileşen RNA'lar, "T" bazları RNA'da doğal olarak meydana gelmesi dahi, "T" bazlarını, örneğin 3 'uçları içerebilir. Bazı durumlarda bu bazlar, bir ribonükleotit zincirinde bulunan deoksiribonükleotitleri ayırt etmek üzere "dT" olarak
5 görünebilir.

Yukarıda tanımlanan hedef dizi, siRNA'ların tasarlanması amacıyla kullanılan veri tabanlarındaki transkript varyantlarının tanımlanmasına yönelik kullanılan bir hedef DNA dizisi olarak tanımlanır, böylece kullanılacak spesifik bileşikler, bu şekilde
10 tanımlanmış RNA dizileri olacaktır.

TRPV1'e karşılık gelen farklı transkript varyantları tanımlanmıştır. Alternatif birleşme aracılığıyla üretilen dört TRPV1 transkriptine karşılık gelen GenBank Erişim Numaraları aşağıdakileri içerir: NM_080704 (NM_080704.3, GI:117306161), NM_018727
15 (NM_018727.5, GI:117306160), NM_080706 (NM_080706.3, GI:117306163) and NM_080705 (NM_080705.3, GI:117306162). Ayrıca, ENSEMBL (MBL-EBI/Wellcome Trust Sanger Institute), aynı zamanda, yayınlanmış olan aşağıdaki 5 adet TRPV1 transkriptine sahiptir: ENST00000174621, ENST00000310522, ENST00000344161, ENST00000399752, ENST00000399756, ENST00000399759, ENST00000425167.

20 Tarifname, TRPV1 gen ekspresyonunu inhibe eden siRNA'ları sağlar, bu siRNA'lar, özellikle tekniğin bilinen durumunda açıklananlar ile karşılaştırıldığında etkilidir. Özellikle, etkinlik, zaman içinde daha yüksek derecede inhibisyon ve/veya uzatılmış bir etki elde edilmesi anlamına gelir.

25 Bu özgün siRNA'lar, önceki paragrafta açıklanan TRPV1'in tüm transkript varyantları için ortak olan bir hedef dizisine karşı tasarlanır ve böylece TRPV1 proteinini kodlayan hücrede mevcut olan tüm olası mRNA'ların RISC-aracılı bozunmasına aracılık eder. Tarifname ile tanımlanan söz konusu tercih edilen hedef bölge, SEQ ID NO: 1'de (5'-
30 AAGCGCATCTTCTACTTCA-3 ') tanımlanır.

Sonuç olarak, tarifnameye göre bir siRNA, antisens zinciri, SEQ ID NO: 1'e esas olarak tamamlayıcı olan bir RNA dizisini içerecek olan bir çift zincirli RNA molekülünü tercihen içerecektir ve duyu zinciri, antisens zinciri tamamlayıcı olan bir RNA dizisi içerecektir,
35 burada her iki zincir, nükleotitler arasında standart baz eşleşmesi aracılığıyla hibritlenir.

Tarifnamenin anlamı içinde bir hedef mRNA dizisine "esas olarak tamamlayıcı", aynı zamanda, söz konusu hedef diziye "esas olarak özdeş" olarak anlaşılabilir. Teknikte uzman bir kişi tarafından bilindiği gibi "özdeşlik", diziler arasındaki nükleotitlerin sırasını ve özdeşliğini eşleştirerek belirlenen, nükleotit dizileri arasındaki dizi bağıntısının derecesidir. Bir açıda, örneğin hedef mRNA dizisine, %85, %90 veya %95 oranında tamamlayıcılığa sahip olan, %80 ve %80 ile %100 arasında tamamlayıcılığa sahip olan bir siRNA'nın antisens zinciri, esas olarak tamamlayıcı olarak kabul edilir ve mevcut buluşta kullanılabilir. Tamamlayıcılık yüzdesi, bir ikinci nükleik asit molekülünde bir dizi bitişik nükleotit ile Watson-Crick duyusunda çift oluşturabilen bir birinci nükleik asit molekülündeki bitişik nükleotitlerin yüzdesini açıklar.

Tekniğin bilinen durumundan bilindiği gibi, RNA etkileşimini sağlamak üzere birçok farklı yapı önerilmiştir. Genel olarak, bu çift zincirli moleküller, yaklaşık olarak 19 ila yaklaşık olarak 25 nükleotit uzunluğundadır ve künt uçlu yapıları ve çıkıntıları olanları içerir. Bunların, RNAz'lar tarafından tanınmayı azaltması ve Dicer'in doğal substratını taklit etmesi nedeniyle, çıkıntıların avantajlı olduğu açıklanmıştır ve her iki telin 5' uçlarında veya 3' uçlarında mevcut olabilirler. Bazı makale yazarları, moleküllerin her iki ucunda bulunan çıkıntıları dahil etmeyi önerirken, diğerleri bir çıkıntının yeterli olduğunu düşünür. Diğerleri, spesifik modifikasyon paternleri (EP 1527176, WO 2008/104978 ve diğerleri) ile künt uçlu yapıların kullanımını tarif etmişlerdir.

Çıkıntılar 1 ila 5 nükleotitten oluşabilir, tipik olarak çıkıntılar dinükleotitlerden oluşur. Sahada kullanılan klasik moleküller, ayrıca, Tuschl (W002/44321) tarafından ilk çalışmalarda öğretildiği gibi tercihen deoksinükleotitleri içeren 3' dinükleotit çıkıntılarını içeren 19 nükleotide sahip çift zincirli bir molekülü içerir. Bu çıkıntıların nükleaz (RNAz) bozunmasına karşı olan direnci, daha fazla arttırdığı söylenir. Daha sonra, Kim et al 2005, 21-mer ürünlerinin (dinükleotit çıkıntıları içeren) RISC'ye yüklenmeye yönelik gerekli olduğunu açıklar. Ayrıca, Bramsen et al. 2009, susturma verimliliğini daha fazla arttırmak üzere çıkıntılara karşı olası denge bozucu değişikliklerin tanıtılmasını açıklar.

Bu haliyle, tarifnamenin bir açısı, en az bir çıkıntı içeren SEQ ID NO: 1'i hedefleyen siRNA moleküllerine refere eder.

Mevcut tarifnamenin bir başka açısı, künt uçlu moleküller sağlar.

Ayrıca, tarifnamenin tercih edilen bir açısı, SEQ ID NO: 1'i hedefleyen bir 19 nükleotit çift zincirli yapı içeren veya bunlardan oluşan bir siRNA ile ilgilidir. Şaşırtıcı bir şekilde, söz konusu 19 nükleotide sahip çift zincirli RNA'nın, Şekil 5'de görülebileceği gibi 21 adet nükleotit ve 3' çıkıntıları ile daha önce tarif edilen ürünlere kıyasla bozulmaya karşı daha dirençli olduğu kanıtlanmıştır.

Tarifnamenin belirli bir açısı, SEQ ID NO: 1'e karşı hedeflenen 19 nükleotit içeren çift zincirli, künt uçlu bir siRNA ile ilgilidir. Başka bir özel düzenlemede, bu bileşik SEQ ID NO: 2 (5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3') olarak tanımlanır. Tercih edilen başka bir açıda, bu siRNA'nın antisens zinciri, SEQ ID NO: 1'e tamamlayıcı olarak, en az %80, tercihen en az %90 oranında mevcut olur.

Ayrıca, tekniğin alt yapısının belirlenen bölümünde tarif edildiği gibi, siRNA moleküllerine ait önemli bir konu, RNAz'ların genel yapısı nedeniyle biyolojik sıvılardaki kararsızlıklarıdır. Sonuç olarak, nükleotitlerde birçok farklı kimyasal modifikasyonun kullanılması, bileşik stabilitesini arttırmak amacıyla tarif edilmiştir.

siRNA moleküllerinin bir başka dahili problemi, immünojenikliğidir, böylece, bazı sitokinlerin yukarı regülasyonu, örneğin tip I ve/veya tip II interferonun yanı sıra IL-12, IL-6 ve/veya TNF-alfa üretimi dahil olmak üzere, siRNA'ların, temelinde olan bağışıklık sisteminin spesifik olmayan aktivasyonunu indüklediği bulunmuştur. Bu etkilerin kaynağının, siRNA ile TLR7, TLR8 ve/veya TLR3 gibi Toll-benzeri reseptörlerin aktivasyonu olduğu düşünülür.

Bu etkilerin her ikisi, RNAzların ve immünojenisitenin tanınması aracılığıyla, aynı zamanda, diziye bağımlı olarak tarif edilmiştir.

RNAzlara duyarlılığın azaltılması aracılığıyla, bileşik stabilitesini artıran bazı kimyasal modifikasyonlar, aynı zamanda, sonraki yanıtın immün tanıma indüksiyonunu azaltabilir. Bununla birlikte, kimyasal olarak modifiye edilmiş nükleotitlerin bir siRNA'ya yerleştirilmesi, aynı zamanda, bir önceki bölümde tarif edildiği gibi susturma etkinliğinin azalmasıyla sonuçlanabilir ve dolayısıyla dikkatle yaklaşılmalıdır.

Sonuç olarak, mevcut tarifnamenin tercih edilen bir açısında, siRNA ayrıca bir kimyasal modifikasyon ile en az bir nükleotit içerir.

Stabiliteyi artıran ve immünojenik etkileri azaltan tercih edilen kimyasal modifikasyonlar arasında, 2'-O-metil nükleotitler, 2'-floro nükleotitler 2'-amino nükleotitler, 2'-deoksi nükleotitler, 2'-O veya 4'-C metilen köprüler içeren nükleotitler bulunur. Ayrıca, fosforotioat modifiye nükleotitlerin yerleştirilmesi aracılığıyla bitişik nükleotitleri bağlayan ribonükleotit omurgasının modifikasyonudur. Tarifnamenin anlamı dahilinde başka bir tercih edilen kimyasal modifikasyon, urasil ribonükleotitlerin, deoksitimidin (deoksiribonükleotitler) ile sübtitüe edilmesine ilişkindir. Tarifnamenin tercih edilen başka bir açısında, kimyasal olarak modifiye edilmiş en az bir nükleotit, duyu zinciri üzerinde, antisens zinciri üzerinde veya siRNA'nın her iki zincirinde bulunur.

Buna göre bir düzenlemede, siRNA, SEQ ID. NO.3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 veya 16'dan seçilir. Yukarıda tarif edildiği gibi siRNA molekülleri, teknikte bilinen yöntemler kullanılarak kendi doğal yapılarında hücre iç kısmına iletilebilir. Örneğin, *in vitro* gen susturmasının araştırıldığı sırada, bu bileşikler standart transfeksiyon reaktifleri kullanılarak uygulanır. *In vivo* etkilerin elde edilmesine yönelik olarak, bu bileşikler ayrıca, çıplak olarak veya örneğin lipozomlar veya spesifik bir parça ile konjugasyon gibi iletim artırıcı ajanlar kullanılarak uygulanabilir, ancak teknikte birçok farklı alternatif bilinir ve vücuttaki istenen hedef bölgeye bağlı olarak farklı şekilde kullanılır.

Alternatif olarak, buluşun siRNA molekülleri, ökaryotik promoterlerden hücreler içinde eksprese edilebilir. siRNA moleküllerini eksprese edebilen rekombinant vektörler, hedef hücrelerde verilebilir ve sürdürülebilir. Alternatif olarak, nükleik asit moleküllerinin geçici ekspresyonunu sağlayan vektörler kullanılabilir. Bu tür vektörler, gerektiği zaman tekrar tekrar uygulanabilir. Eksprese edildikten sonra, siRNA molekülü, hedef mRNA ile etkileşir ve bir RNA etkileşim tepkisi üretir. Bu şekilde üretilen siRNA molekülleri, genellikle, duyu ve antisens zincirlerinin küçük bir nükleotit döngüsü aracılığıyla birleştirilmesi nedeniyle shRNA (kısa firkete RNA) olarak adlandırılır. Bir deneğe yeniden aşılamanın ardından bir denekten eksplante edilen hedef hücrelerin uygulanması aracılığıyla veya istenen hedef hücreye yeniden aşılama olarak sağlayacak başka herhangi bir yol aracılığıyla, intravenöz veya intramusküler uygulama gibi siRNA molekülüne ait eksprese edilen vektörlerin verilmesi sistemik olabilir.

Bir başka açı, TRPV1'in artan ekspresyonu ve/veya aktivitesi ile karakterize edilen bir göz rahatsızlığının tedavisine yönelik bir yöntemde kullanılmak üzere bir ilacın preparasyonunda SEQ ID NO.1'i hedefleyen siRNA'nın kullanımı ile ilgilidir. Yöntem, bir hastada TRPV1 ekspresyonunun inhibe edilmesini içerir. İnhibisyon terimi, 5 ekspresyonun veya aktivitenin azalmasını veya downregülasyonunu belirtmek üzere kullanılır. Tercihen, göz rahatsızlığı, oküler ağrıdır. Bir düzenlemede, göz rahatsızlığı, refraktif cerrahiyi takiben oküler rahatsızlık ve değişen duyarlılığı, kontakt lenslerin kullanımını, kuru göz sendromunu, Sjogren sendromunu ve diğer göz patolojilerini içeren gruptan seçilir.

10

TRPV1 mRNA'ya karşı yöneltilen siRNA'lar ile terapötik tedavinin, etkinin gözlemlendiği zamanın uzunluğunun artırılması aracılığıyla küçük molekül topikal oküler damlalar üzerinde yararlı olması beklenir, böylece daha az sıklıkta dozlama ve daha fazla hasta uyumu sağlanır. Bu, özellikle kuru göz sendromu ve sıklıkla kronik durumlardan dolayı 15 değişen kornea hassasiyeti gibi durumlarda önemlidir.

20

Böyle bir ilacın preparasyonu dikkate alınarak, mevcut buluşun siRNA'sı formüle edilebilir. Tercihen, söz konusu siRNA'ların bileşimleri ve formülasyonları, ilgili organa topikal olarak uygulanabilir. Daha fazla tercih edilen bir açıda, bunlar göze, tercihen 20 gözün korneal yüzeyine topikal uygulamaya yönelik formüle edilebilirler. Kornea yüzeyine uygulama, örneğin göz damlası, jel, losyon, krem veya oküler ek parça şeklinde olabilir. Göze diğer uygulama şekilleri, göz içine enjeksiyon içerebilir.

25

Tarifnamenin tercih edilen bir başka açısı, TRPV1'in artan ekspresyonu ve/veya 25 aktivitesi ile karakterize edilen bir göz rahatsızlığının tedavisine yönelik bir ilaç olarak kullanılmak üzere, önceki paragraflarda açıklandığı gibi, SEQ ID NO: 1'i spesifik olarak hedefleyen bir siRNA ile ilgilidir. Yukarıda tarif edildiği gibi, SEQ ID NO: 1'i hedefleyen 19 nükleotitli bir çift zincirli yapı içeren veya bunlardan oluşan bir siRNA olabilir. Bu siRNA, künt uçlu olabilir. Tercihen, siRNA, SEQ ID NO: 2'dir. Tarifnameye göre 30 kullanıma yönelik diğer siRNA, SEQ ID. NO.3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 veya 16'dan seçilebilir.

Tarifnamenin kapsamında, bir diziyi "spesifik olarak hedeflemek" üzere, tarifnamenin siRNA'sı, en azından bu tohum dizisini içermelidir. Dolayısıyla, SEQ ID No.1'i spesifik

olarak hedefleyen herhangi bir dizi, antisens zincirin 2-8 pozisyonlarında özdeş olmalıdır.

Yukarıdakiler göz ardı edilerek, tarifnamenin siRNA'ları, göz dışındaki dokularda TRPV1 ekspresyonunu susturmak üzere kullanılabilir. Sonuç olarak, söz konusu siRNA'lar buna göre formüle edilmelidir.

Örneğin, bir siRNA molekülü, bir deneğe uygulamaya yönelik lipozomları içeren bir iletim aracını içerebilir. Taşıyıcılar ve seyrelticiler ve bunların tuzları, farmasötik olarak kabul edilebilir formülasyonlarda mevcut olabilir. Nükleik asit molekülleri, bunlarla kısıtlı olmamak üzere, lipozomlarda kapsülleme, iyontoforez aracılığıyla veya biyobozunabilir polimerler, hidrojel, siklodekstrinler poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) ve PLGA mikroküreleri, biyobozunabilir nanokapsüller ve biyoyapışkan mikroküreler gibi başka araçların dahil edilmesi aracılığıyla veya proteinli vektörler aracılığıyla, teknikte uzman kişilerce bilinen çeşitli yöntemler tarafından hücrelere uygulanabilir. Başka bir açıda, buluşun nükleik asit molekülleri, aynı zamanda, polietilenimin-polietilenglikol-N-asetilgalaktozamin (PEI-PEG-GAL) veya polietilenimin-polietilenglikol-tri-N-asetilgalaktozamin (PEI-PEG-triGAL) türevleri gibi polietilenimin ve bunun türevleri ile formüle edilebilir veya kompleks haline getirilebilir.

Buluşun siRNA molekülü, membran yıkıcı ajanlar ve/veya bir katyonik lipit veya yardımcı lipit molekülü aracılığıyla kompleks haline getirilebilir.

Buluş ile kullanılacak iletim sistemleri örneğin, aköz ve aköz olmayan jeller, kremler, çoklu emülsiyonlar, mikroemülsiyonlar, lipozomlar, merhemler, aköz ve aköz olmayan çözeltiler, losyonlar, aerosoller, hidrokarbon bazlar ve tozları içerir ve çözücüler, permeasyon güçlendiricileri (örneğin, yağ asitleri, yağ asidi esterleri, yağ alkoller ve amino asitler) ve hidrofilik polimerler (örneğin, polikarbofil ve polivinilpirolidon) gibi yardımcı maddeler içerebilir. Bir açıda, farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı, bir lipozom veya bir transdermal güçlendiricidir.

Buluşun bir farmasötik formülasyonu, örneğin bir insanı içeren bir hücreye veya deneğe, örneğin sistemik veya lokal olarak uygulamaya yönelik uygun bir formdadır. Uygun formlar, kısmen, örneğin oral, transdermal veya enjeksiyon aracılığıyla kullanıma veya giriş yoluna bağlıdır. Teknikte başka faktörler bilinir ve bileşimin veya formülasyonun etkisini göstermesini engelleyen toksisite ve formlar gibi hususları içerir.

Mevcut buluş ayrıca farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı veya seyreltici içinde arzu edilen bileşiklerin farmasötik olarak etkili bir miktarını içeren depolama veya uygulamaya yönelik hazırlanan bileşimleri içerir. Terapötik kullanıma yönelik kabul edilebilir taşıyıcılar veya seyrelticiler, farmasötik teknikte iyi bilinir. Örneğin, koruyucu maddeler, stabilizatörler, boyalar ve aroma verici maddeler sağlanabilir. Bunlar sodyum benzoat, sorbik asit ve p-hidroksibenzoik asit esterlerini içerir. Ek olarak, antioksidanlar ve süspanse edici ajanlar kullanılabilir.

10 Farmasötik olarak etkili bir doz, bir hastalık durumunu önlemek, meydana gelmesini inhibe etmek veya tedavi etmek (bir semptomu, tercihen tüm semptomları bir dereceye kadar hafifletmek) üzere gerekli olan dozdur. Farmasötik olarak etkili doz, hastalığın türüne, kullanılan bileşime, uygulama yoluna, tedavi edilen memeli tipine, göz önüne alınan spesifik memelinin fiziksel özelliklerine, eş zamanlı ilaç tedavisine ve tıp
15 tekniğinde uzman kişilerin tanıyacağı diğer faktörlere bağlıdır.

Buluşun formülasyonları veya siRNA'sı, geleneksel toksik olmayan farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar, adjuvanlar ve/veya araçlar içeren birim dozaj formülasyonları halinde uygulanabilir. Formülasyonlar, örneğin tabletler, haplar, pastiller, aköz veya yağ
20 süspansiyonları, dağılılabılır tozlar veya granüller, emülsiyon, sert veya yumuşak kapsüller veya şuruplar veya eliksirler gibi oral kullanıma yönelik uygun bir formda olabilir. Oral kullanım için tasarlanan bileşimler, farmasötik bileşimlerin üretimine yönelik teknikte bilinen herhangi bir yöntemle hazırlanabilir ve bu gibi bileşimler, farmasötik olarak mükemmel ve lezzetli preparasyonlar sağlamak amacıyla, bir veya
25 daha fazla bu gibi tatlandırıcı ajanları, aroma ajanlarını, renklendirici ajanları veya koruyucu ajanları içerebilir. Tabletler, aktif içerik maddesini, tabletlerin üretimine yönelik uygun olan, toksik olmayan farmasötik olarak kabul edilebilir yardımcı maddelerle karışım halinde içerir.

30 Bu yardımcı maddeler, örneğin, kalsiyum karbonat, sodyum karbonat, laktoz, kalsiyum fosfat veya sodyum fosfat gibi inert seyrelticiler; örneğin mısır nişastası veya aljinik asit gibi granüle edici ve parçalayıcı ajanlar; örneğin nişasta, jelatin veya akasya gibi bağlayıcı ajanlar ve örneğin magnezyum stearat, stearik asit veya talk gibi yağlayıcı ajanlar olabilir. Tabletler kaplanmamış olabilir veya bilinen tekniklerle kaplanabilirler.

35 Bazı durumlarda bu tür kaplamalar, gastrointestinal sistemde parçalanmayı ve

emilmeyi geciktirmek üzere bilinen teknikler aracılığıyla hazırlanabilir ve böylece daha uzun bir süre boyunca devam eden bir etki sağlar. Örneğin, gliseril monostearat veya gliseril distearat gibi bir zaman geciktirme materyali kullanılabilir.

- 5 Oral kullanım için formülasyonlar ayrıca sert jelatin kapsüller olarak sunulabilir, burada aktif içerik maddesi, örneğin, kalsiyum karbonat, kalsiyum fosfat veya kaolin veya yumuşak jelatin kapsüller gibi inert bir katı seyreltici ile karıştırılır, burada aktif içerik maddesi, örneğin yerfıstığı yağı, sıvı parafin veya zeytinyağı gibi su veya bir yağ ortamı ile karıştırılır.

10

Aköz süspansiyonlar, aktif materyalleri, aköz süspansiyonların üretimine yönelik uygun olan yardımcı maddeler ile bir karışım halinde içerir. Bu gibi yardımcı maddeler, örneğin sodyum karboksimetilselüloz, metilselüloz, hidropropil-metilselüloz, sodyum aljinat, polivinilpirrolidon, kitre ve akasya sakızı gibi süspanse edici ajanlardır; dağıtıcı veya ıslatıcı ajanlar, doğal olarak oluşan bir fosfatid, örneğin lesitin veya bir alkilen oksidin yağ asitleriyle, örneğin polioksietilen stearat ile yoğunlaşma ürünleri veya örneğin heptadekaetilenoksietanol gibi, uzun zincirli alifatik alkollere sahip etilen oksidin yoğunlaşma ürünleri veya polietilen sorbitan monooleat gibi yağ asitleri ve heksitol anhidritlerden türetilen kısmi esterlere sahip etilen oksidin yoğunlaşma ürünleri olabilir.

15

Aynı zamanda aköz süspansiyonlar, örneğin etil veya n-propil p-hidroksibenzoat, bir veya daha fazla renklendirici ajan, bir veya daha fazla aroma ajanı ve sakaroz veya sakarin gibi bir veya daha fazla tatlandırıcı ajan gibi bir veya daha fazla koruyucu madde içerebilir.

25

Yağ süspansiyonları, aktif içerik maddelerinin, örneğin yerfıstığı yağı, zeytinyağı, susam yağı veya hindistancevizi yağı gibi bir bitkisel yağ içinde veya sıvı parafin gibi bir mineral yağ içinde süspanse edilmesi aracılığıyla formüle edilebilir. Yağ süspansiyonları, örneğin balmumu, sert parafin veya setil alkol gibi bir kıvamlaştırıcı ajan içerebilir. Tatlandırıcı oral preparasyonlar sağlamak üzere, tatlandırıcı ajanlar ve

30

aroma verici ajanlar eklenebilir. Bu bileşimler, askorbik asit gibi bir antioksidan ilavesiyle korunabilir.

35

Su ilavesi aracılığıyla aköz bir süspansiyonun preparasyonuna yönelik uygun dağılılabılır tozlar ve granüller, aktif içerik maddesini, bir dağıtıcı veya ıslatıcı ajan, süspanse edici ajan ve bir veya daha fazla koruyucu madde ile karışım halinde sağlar. Uygun dağıtıcı

veya ıslatıcı ajanlar veya süspanse edici ajanlar, yukarıda bahsedilenler aracılığıyla örneklendirilir. Aynı zamanda, tatlandırıcı, aroma verici ve renklendirici ajanlar gibi ek yardımcı maddeler mevcut olabilir.

- 5 Buluşun farmasötik bileşimleri, ayrıca, su içinde yağ emülsiyonları formunda olabilir. Yağ fazı, bir bitkisel yağ veya bir mineral yağı veya bunların bir karışımı olabilir. Uygun emülsifiye edici ajanlar, örneğin akasya sakızı veya kitre, doğal olarak oluşan fosfatidler gibi, örneğin soya fasülyesi, lesitin gibi doğal olarak oluşan sakızlar ve yağ asitlerinden ve heksitolden, anhidritlerden, örneğin sorbitan monooleatdan türetilen esterler veya kısmi esterler ve örneğin polioksietilen sorbitan monooleat gibi etilen oksite sahip söz konusu kısmi esterlerin yoğunlaştırma ürünleri olabilir. Emülsiyonlar, ayrıca, tatlandırıcı ve aroma verici ajanlar içerebilir.

- 15 Şuruplar ve eliksirler, örneğin gliserol, propilen glikol, sorbitol, glikoz veya sükroz gibi tatlandırıcı ajanlar ile formüle edilebilir. Bu tür formülasyonlar, aynı zamanda, bir demulsent, bir koruyucu madde ve aroma verici ve renklendirici ajanlar içerebilir. Buluşun farmasötik bileşimleri veya siRNA'sı, steril olarak enjekte edilebilir aköz veya bir yağ süspansiyonu formunda olabilir.

- 20 Bu süspansiyon bilinen tekniğe göre, yukarıda belirtilen uygun dağıtıcı veya ıslatıcı ajanlar ve süspanse edici ajanlar kullanılarak formüle edilebilir.

- 25 Steril olarak enjekte edilebilir bir preparasyon, aynı zamanda, toksik olmayan parental olarak kabul edilebilir bir seyreltici veya çözücü içinde, örneğin 1,3-bütandiol içinde bir çözelti halinde, steril olarak enjekte edilebilir bir çözelti veya süspansiyon olabilir. Kullanılabilecek kabul edilebilir araçlar ve çözücüler, su, Ringer çözeltisi ve izotonik sodyum klorür çözeltisi içerir. Ek olarak, steril, sabit yağlar, geleneksel olarak bir çözücü veya süspansiyon ortamı olarak kullanılır. Bu amaca yönelik, sentetik mono-veya digliseritleri içeren herhangi bir tatsız sabit yağ kullanılabilir. Ek olarak, oleik asit gibi yağ asitleri, enjekte edilebilir maddelerin preparasyonunda kullanım alanı bulur.

- 35 Buluşun nükleik asit molekülleri, aynı zamanda, örneğin ilacın rektal uygulanması için fitiller formunda uygulanabilir. Bu bileşimler, ilacın, normal sıcaklıklarda katı olan, ancak rektal sıcaklıkta sıvı olan ve bu nedenle ilacı serbest bırakmak üzere rektumda eriyen uygun bir tahriş edici olmayan yardımcı madde ile karıştırılması aracılığıyla

5 hazırlanabilir. Bu materyaller arasında, kakao yağı ve polietilen glikoller bulunur. Buluşun nükleik asit molekülleri, steril bir ortamda parenteral olarak uygulanabilir. İlaç, kullanılan araca ve konsantrasyona bağlı olarak, araç içinde süspansiyon edilebilir veya çözülebilir. Avantajlı olarak, lokal anestezi, koruyucular ve tampon ajanları gibi adjuvanlar, araç içinde çözülebilir.

10 Bu şekilde, tarifnamenin tercih edilen bir başka açısı farmasötik bir bileşim ile ilgilidir, burada söz konusu bileşim, önceki paragraflarda açıklandığı gibi, SEQ ID NO: 1'i hedefleyen en az bir siRNA'yı içerir.

15 Belirli herhangi bir deneğe yönelik spesifik doz seviyesinin çeşitli faktörlere örneğin; kullanılan spesifik bileşimin aktivitesine, yaşa, vücut ağırlığına, genel sağlığa, cinsiyete, beslenmeye, uygulama zamanına, uygulama yoluna ve boşaltım oranına, ilaç kombinasyonuna ve tedavi gören belirli hastalığın önem derecesine bağlı olduğu anlaşılır.

20 Mevcut buluşun nükleik asit molekülleri, ayrıca genel terapötik etkiyi arttırmak üzere diğer terapötik bileşiklerle kombinasyon halinde bir deneğe uygulanabilir. Bir endikasyonu tedavi etmek üzere çoklu bileşiklerin kullanılması, yan etkilerin varlığını azaltarak yararlı etkileri arttırabilir.

Buluş ayrıca aşağıdaki sınırlayıcı olmayan örneklerde açıklanır.

ÖRNEKLER

25

In vitro analiz

30 TRPV1'i susturmak üzere siRNA'lar için özellikle etkili bir hedef dizinin (gen ifadesinin önemli inhibisyonunu sağlayan) bulunması amacıyla, altı farklı siRNA test edilmiştir. Bu siRNA'lar, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 (yalnızca referansa yönelik) ve SEQ ID NO: 17 ila 20 (yalnızca referansa yönelik) olarak tarif edilir.

SEQ ID NO: 2, aşağıdaki diziye sahip olan SEQ ID NO: 1'i buluşa göre hedefleyen bir siRNA'dır:

35 Duyu: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'

Antisens:5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

SEQ ID NO: 7 (yalnızca referansa yönelik) (5'-UCGCCACGACAUGCUCUUGdTdT-3'), TRPV1'i etkili bir şekilde hedeflemek ve kapsaisin uyarıcılarına oküler tepkiyi azaltmak üzere daha önce WO 2007/045930'da tarif edilen klasik bir siRNA molekülüne
5 (deoksitimidin'den oluşan 3' çıkıntılarını içeren 21 nükleotit uzunluğunda olan) karşılık gelir. SEQ ID NO: 17 ila 19, Reynolds et al. 2004 or Ui-Tei et al 2004, and others tarafından tarif edilenler gibi teknolojide mevcut olan farklı algoritmalara göre TRPV1'e karşı tasarlanan siRNA'lara karşılık gelir. SEQ ID NO: 20 (yalnızca referansa yönelik) , Ambion tarafından tedarik edilen ve TRPV1'e karşı tasarlanmış olan ticari olarak temin
10 edilebilen bir siRNA'dır.

SEQ ID NO: 17 (yalnızca referansa yönelik)

Duyu: 5'-CGCAUCUUCUACUUCAACU-3'
15 Antisens: 5'-AGUUGAAGUAGAAGAUGCG-3'

SEQ ID NO: 18 (yalnızca referansa yönelik)

Duyu: 5'-GCGCAUCUUCUACUUCAAC-3'
20 Antisens: 5'-GUUGAAGUAGAAGAUGCGC-3'

SEQ ID NO: 19 (yalnızca referansa yönelik)

Duyu: 5'-AAAGCCAUGCUCUACCUUGC-3'
25 Antisens: 5'-GCAGGUUGAGCAUGGCUUU-3'

SEQ ID NO: 20 (yalnızca referansa yönelik)

Duyu: 5'-UGAUCGCAGGAGUAUCUUUdTdT-3'
30 Antisens:5'-AAAGAUACUCCUGCGAUCAdTdT-3'

Yukarıda tarif edilen siRNA'nın etkinliğini test etmek üzere bir model olarak, HeLa (insan serviks adenokarsinomu) hücre kültürleri kullanılmıştır. HeLa hücreleri, 100 nM'lik farklı bileşikler ve transfektan ajanı olarak Lipofectamine 2000 ile transfekte
35 edilmiştir. Tüm transfeksiyonlar, standart üreticinin koşullarını takiben yapılmıştır. Bu

transfeksiyonda, kontrol olarak farklı bir karıştırılmış siRNA kullanılmıştır. Hücre topakları, protein seviyelerindeki muhtemel varyasyonları değerlendirmek ve gerçek zamanlı PCR ile işlenmek üzere 24, 48 ve 72. saatlerde toplanmıştır. Gerçek zamanlı Qrt-PCR ile elde edilen sonuçları ölçmek amacıyla Karşılaştırmalı Eşik Yöntemi'ni
5 kullandık.

Sonuçların gösterdiği gibi (şekil 1), hedef dizi SEQ ID NO: 1'e karşı yönlendirilmiş bir siRNA, TRPV1 gen susturulması açısından, bu genin farklı bir bölgesine karşı yönlendirilmiş siRNA ürünlerinden çok daha etkilidir. Ayrıca, bu etki zaman içinde
10 devam eder, transfeksiyondan 72 saat sonra, mRNA seviyelerinin önemli ölçüde down-regülasyonu mevcuttur. Bu etki süresi tahmin edilemez ve diziye özgüdür.

Daha fazla gelişmiş ürünler sunmak amacıyla, aşağıdaki tarifnameye göre, yukarıda belirtilen ürüne yönelik farklı kimyasal modifikasyonlar getirilmiştir:

15

SEQ ID NO: 3,

Duyu: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'

Antisens: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

20

SEQ ID NO: 4,

Duyu: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'

Antisens: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

25

SEQ ID NO: 8,

Duyu: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'

Antisens: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

30

SEQ ID NO: 9,

Duyu: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'

Antisens: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

35

SEQ ID NO: 10,

Duyu: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'

Antisens: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

5 SEQ ID NO: 11,

Duyu: 5'-AAGCGCAUCUUCUACUUCA-3'

Antisens: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

10

Burada alt çizgi, bir 2'-Ometil grubu içeren bazları temsil eder.

SEQ ID NO: 5,

15 Duyu: 5'-AAGCGCAdTCdTdTCdTACdTdTCA-3'

Antisens: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

SEQ ID NO: 6,

20 Duyu: 5'-AAGCGCAdTCdTdTCdTACdTdTCA-3'

Antisens: 5'-dTGAAGdTAGAAGAdTGCGCdTdT-3'

SEQ ID NO: 12,

25 Duyu: 5'-AAGCGCAdTCUdTCdTACdTdTCA-3'

Antisens: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

SEQ ID NO: 13,

30 Duyu: 5'-AAGCGCAdTCUdTCdTACUdTCA-3'

Antisens: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

SEQ ID NO: 14,

35 Duyu: 5'-AAGCGCAdTCUUCdTACUdTCA-3'

Antisens: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'
SEQ ID NO: 15,

Duyu: 5'-AAGCGCAdTCUUCUACUdTCA-3'
5 Antisens: 5'-UGAAGUAGAAGAUGCGCUU-3'

SEQ ID NO: 16,

Duyu: 5'-AAGCGCAdTCUUCUACUdTCA-3'
10 Antisens: 5'-UGAAGdTAGAAGAdTGCGCUU-3'

Burada urasil nükleotitlerinin bazıları veya tümü, deoksitimidin nükleotitlerine yönelik süstitüe edilmiştir.

15 Bu bileşikler, SEQ ID NO: 2 (modifiye edilmiş nükleotitler içermeyen bu bileşik) ile birlikte immünojenisite deneylerinde test edilmiştir. Sonuçlar, tüm bu bileşiklerin, periferal kan mononükleer hücrelerinde bir bağışıklık tepkisinin indüksiyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Ayrıca, bileşiklerin çoğu, en yüksek seviyelerinde, bir kontrol olarak deneylere dahil edilen insan klinik deneyleri (bevasiranib ve Sirna-027)
20 aracılığıyla geliştirilmiş olan siRNA'lar tarafından üretilenler kadar düşük bir tepki uyandırmıştır.

Değişik derecelerde modifikasyonların siRNA'ların gen susturma yeteneğini değiştirebilmesi nedeniyle, bu bileşikler ayrıca, HeLa hücrelerine transfeksiyon yoluyla
25 RNA interferans kapasitelerine yönelik test edilmiş ve sonuçta, TRPV1 mRNA seviyeleri, önceki paragraflarda açıklanan yöntemle ölçülmüştür.

Şekil 2'de görülebileceği gibi, bütün bileşikler, değişen derecelerde TRPV1 mRNA seviyelerini etkili bir şekilde azaltma kabiliyetine sahiptir.

30

Yukarıda tarif edilen bileşiklerden türetilen bir başka beklenmeyen faydalı etki, Şekil 5'te görülebileceği gibi, RNazlar tarafından bozunmaya karşı arttırılmış olan dirençleridir.

Bu deneylere yönelik, bileşikler, 2 µM'lik bir nihai konsantrasyonda PBS içinde %10 oranındaki insan plazmasında süspansiyon edilmiştir ve 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Numuneler, daha sonra, HPLC-UV kullanılarak analiz edilmiştir ve kalan bozulmamış ürün miktarı belirlenmiştir. Şekil 5'de görülebileceği gibi, SEQ ID NO: 2'nin

5 19 nükleotide sahip çift zincirli bileşiği (herhangi bir kimyasal modifikasyon olmadan), 3' çıkıntılarını içeren daha önce tarif edilen SEQ ID NO: 21: (yalnızca referansa yönelik) 5'-CAAGAUCGCACAGGAGAGCdTdT-3' (aynı zamanda, WO 2007045930'da tarif edilmiştir) ile karşılaştırıldığında, bozulmaya karşı yaklaşık 3 kat daha fazla dirençlidir. Bu etki, aynı zamanda, önceki paragraflarda tarif edildiği gibi, bazı kimyasal olarak

10 modifiye edilmiş nükleotitleri içeren SEQ ID NO: 3'ün bileşiğine yönelik geliştirilmiştir.

In vivo analiz

Kuru göz ve oküler ağrının hayvan modelleri, genellikle, Yeni Zelanda Beyaz tavşanları

15 olan tavşanları kullanır. Bu amaçla, tarifnamenin siRNA'larının bir başka avantajı, hedef dizinin, SEQ ID NO: 1, farklı hayvan dizileri boyunca TRPV1 geninin yüksek derecede korunmuş bir bölgesi olmasıdır. Aslında, bu dizi insan ve tavşan arasında özdeştir, bu durum, hayvan modelini özellikle söz konusu hastalıkların araştırılmasına yönelik uygun hale getirir.

20

Aşağıda tarif edilen deney, alanda uzman bir kişi tarafından bilinen standart bir oküler ağrı modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Gonzalez et al. 1993). Kısaca, uygun bir mikropipet kullanılarak, göze 30 µl'lik %1 oranında bir kapsaisin instilasyonu (TRPV1'in bilinen bir agonisti) kullanılarak ağrı indüklenmiştir. Etik hususlar nedeniyle, kapsaisin

25 ile tedavi edilecek hayvanlar, daha öncesinde, bilinen bir kapsaisin antagonistine ait 5mM'lik bir kapsazepin dozu veya test edilen bileşiği ihtiva eden 40 µl'lik bir çözeltiyi almıştır. Bu nedenle analjezik etki, bir referans tedavi olarak kapsazepine kıyasla ölçülür.

30 Test ve referans maddeleri, Gün 1 ile Gün 3 arasında günlük olarak bir kez ve sağ gözlerde 4. Günde (60 dakikadan biraz daha fazla) günlük olarak iki kez aşılanmıştır. 4. Günde, son aşılama işleminden 15 dakika sonra, hayvanların sağ gözünde, %1 oranında bir kapsaisin instilasyonu aracılığıyla korneal ağrı indüklenmiştir. Kontralateral göz, çalışma boyunca PBS ile aşılanmış ve kontrol olarak kullanılmıştır.

35

Ağrıya tepkisini ölçmek üzere palpebral açıklık ölçülmüştür. Göz ağrısına tepki olarak kapalı olduğu ve palpebral açıklıktan kaynaklanan ağrı duyumlarının normal seviyelere yükseleceği düşünülür. Palpebral açıklık, tedaviden önce (başlangıç çizgisi), ağrı indüksiyonundan hemen önce ve daha sonra, ağrı indüksiyonundan 1, 5, 10, 15, 20, 5 25, 30 dakika sonra ölçülmüştür.

Şekil 3 ve 4'ten görülebileceği gibi, mevcut buluşa göre bir bileşik, özellikle SEQ ID NO: 2'ye ait olan bileşik test edilmiştir ve kapsazepinden daha yüksek bir analjezik etki indüklediği gözlenmiştir (palpebral açıklığın derecesiyle ölçülmesi aracılığıyla gözün iyileşmesi). Bu nedenle, bu bileşiğin oküler rahatsızlık için etkili bir terapötik tedavi 10 olduğu kanıtlanmıştır.

Ayrıca, daha önce WO 2007045930'da tarif edilen SEQ ID NO: 21 (yalnızca referansa yönelik) ile birlikte, tavşanların gözlerine tarifnamenin bileşiklerinin (SEQ ID NO: 2, 15 SEQ ID NO: 4 ve SEQ ID NO: 5) uygulandığı başka bir *in vivo* deney gerçekleştirilmiştir. Bu durumda, tavşanlar (tedavi grubu başına 6 hayvan), art arda 3 gün boyunca bileşiğin günlük bir uygulamasını almışlardır. Üçüncü günde, son instilasyondan iki saat sonra, hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Bu tavşanlardan oküler dokular geri kazanılmıştır ve TRPV1 spesifik mRNA'nın varlığı, RT-PCR kullanılarak 20 analiz edilmiştir. Aşağıdaki tablo, referans bileşimi SEQ ID NO: 21 (yalnızca referansa yönelik) ile elde edilen inhibisyon yüzdesinin bir oranı olarak ifade edilen belirli bir dokuda elde edilen TRPV1 gen susturma seviyesini gösterir.

	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5
Gözyaşı bezi	3.06	3.15	1.92
Siliyer cisim	6.54	2.48	3.57

Bu sonuçlardan açıkça anlaşılabilceği gibi, mevcut buluşun bileşikleri, daha önce tarif 25 edilen bileşiklere kıyasla oküler dokularda bulunan TRPV1 gen ekspresyonunu susturduğu sırada daha fazla etkilidir. Dozlar arasında daha fazla zamana olanak sağlanmasının, hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde arttırması nedeniyle, buluşun bileşiklerinin daha uzun süreli etkisi ile birlikte daha yüksek seviyedeki etkinlik, avantajlı doz rejimleri sağlamalıdır.

30

REFERANSLAR

- Baumann TK & Martenson ME. (2000). "Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsaicin-gated channels." *J Neurosci* 20:RC80.
- Caterina et al. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* 389(6653):816-24.
- 5 Caterina et al. (2001). "The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway." *Annu Rev Neurosci.* 24:487-517.
- Cerutti, L., N. Mian, et al. (2000). "Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain." *Trends Biochem*
- 10 *Sci* 25(10): 481-2.
- Collins, R. E. and X. Cheng (2005). "Structural domains in RNAi." *FEBS Lett* 579(26): 5841-9.
- Doench, J.G. Sharp, P.A. "specificity of microRNA target selection in translational repression" *Genes Dev.* 18, 504-511; 2004
- 15 Elbashir, S. M., W. Lendeckel, et al. (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." *Genes Dev* 15(2): 188-200.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391 (6669): 806-11.
- Gonzalez, G. G., Garcia, P. et al. (1993). "Reduction of capsaicin-induced ocular pain and neurogenic inflammation by calcium antagonists." *Invest Ophthalmol Vis Sci*
- 20 *34*(12):3329-3335.
- Hutvagner, G. and P. D. Zamore (2002). "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." *Science* 297(5589): 2056-60.
- Jia et al. (2005). "TRPV1 receptor: a target for the treatment of pain, cough, airway disease and urinary incontinence." *Drug News Perspect* 18(3):165-71.
- 25 Lewis, B.P., Shih I. Et al. "prediction of mammalian micro RNA targets" *Cell* 115:787-798;2003
- Liu, J., M. A. Carmell, et al. (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." *Science* 305(5689): 1437-41.
- 30 Ma, J. B., Y. R. Yuan, et al. (2005). "Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein." *Nature* 434(7033): 666-70.
- Montell et al. (2002). "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells." *Genes Dev* 16(8):948-58.
- Nykanen, A., B. Haley, et al. (2001). "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway." *Cell* 107(3): 309-21.
- 35

- Orban, T. I. and E. Izaurralde (2005). "Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome." *Rna* 11(4): 459-69.
- Parrish, S., J. Fleenor, et al. (2000). "Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference." *Mol Cell* 6(5): 1077-87.
- Rand, T. A., S. Petersen, et al. (2005). "Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation." *Cell* 123(4): 621-9.
- Reynolds, A., Leake, D., et al. (2004). "Rational siRNA design for RNA interference " *Nat Biotechnol* 22(3):326-30.
- Schubert, S. et al. (2005). "Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions." *J Mol Biol* 348:883-893.
- Song, J. J., S. K. Smith, et al. (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." *Science* 305(5689): 1434-7.
- Ui-Tei, K., Naito, Y., et al. (2004). "Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference." *Nucleic Acids Res* 32(3): 936-48.

DİZİ LİSTESİ

- <110> Sylentis S.A
- <120> siRNA ve göz rahatsızlıklarının tedavisi ve/veya önlenmesine yönelik yöntemler ve bileşimlerde kullanımları
- <130> PC925428EP
- <160> 41
- <170> Patentln versiyonu 3.3
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- aagcgcacatct tctacttca 19
- <210> 2
- <211> 19
- <212> RNA
- <213> Yapay

- <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 2
 aagcgcaucu ucuacuuca 19
- 5 <210> 3
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
- 10 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (8)..(8)
 <223> urasil bir 2'-o metil gruba sahiptir
- 15 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (10)..(11)
 <223> urasil bir 2'-o metil gruba sahiptir
 <220>
- 20 <221> çeşitli_özellik
 <222> (16)..(17)
 <223> urasil bir 2'-o metil gruba sahiptir
 <400> 3
 aagcgcaucu ucuacuuca 19
- 25 <210> 4
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
- 30 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (1)..(2)
 <223> adedin bir 2'-o metil gruba sahiptir

- <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (7)..(7)
 <223> adedin bir 2'-o metil gruba sahiptir
- 5 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (14)..(14)
 <223> adedin bir 2'-o metil gruba sahiptir
 <220>
- 10 <221> çeşitli_özellik
 <222> (19)..(19)
 <223> adedin bir 2'-o metil gruba sahiptir
 <400> 4
 aagcgcaucu ucuacuuca 19
- 15 <210> 5
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
- 20 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (8)..(8)
 <223> n=deoksitimidin
- 25 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (10)..(11)
 <223> n=deoksitimidin
 <220>
- 30 <221> çeşitli_özellik
 <222> (13)..(13)
 <223> n=deoksitimidin
 <220>
 <221> çeşitli_özellik

- <222> (16)..(17)
 <223> n=deoksitimidin
 <400> 5
 aagcgancn ncnacnca 19
- 5 <210> 6
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
- 10 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (8)..(8)
 <223> n=deoksitimidin
- 15 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (10)..(11)
 <223> n=deoksitimidin
 <220>
- 20 <221> çeşitli_özellik
 <222> (13)..(13)
 <223> n=deoksitimidin
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
- 25 <222> (16)..(17)
 <223> n= deoksitimidin
 <400> 6
 aagcgancn ncnacnca 19
 <210> 7
- 30 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA

- <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (20)..(21)
 <223> n=deoksitimidin
- 5 <400> 7
 ucgccacgac augcucuugn n 21
 <210> 8
 <211> 19
 <212> RNA
- 10 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
- 15 <222> (8)..(8)
 <223> urasil bir 2'-o metil gruba sahiptir
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (13)..(13)
- 20 <223> urasil bir 2'-o metil gruba sahiptir
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (17)..(17)
 <223> urasil bir 2'-o metil gruba sahiptir
- 25 <400> 8
 aagcgcaucu ucuacuuca 19
 <210> 9
 <211> 19
 <212> RNA
- 30 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik

- <222> (8)..(8)
 <223> urasil bir 2'-o metil gruba sahiptir
 <220>
 <221> misc-feature
- 5 <222> (17)..(17)
 <223> urasil bir 2'-o metil gruba sahiptir
 <400> 9
 aagcgcaucu ucuacuuca 19
 <210> 10
- 10 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
- 15 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (2)..(2)
 <223> adedin bir 2'-o metil gruba sahiptir
 <220>
- 20 <221> çeşitli_özellik
 <222> (7)..(7)
 <223> adedin bir 2'-o metil gruba sahiptir
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
- 25 <222> (19)..(19)
 <223> adedin bir 2'-o metil gruba sahiptir
 <400> 10
 aagcgcaucu ucuacuuca 19
 <210> 11
- 30 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA

- <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (2)..(2)
 <223> adedin bir 2'-o metil gruba sahiptir
- 5 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (19)..(19)
 <223> adedin bir 2'-o metil gruba sahiptir
 <400> 11
- 10 aagcgcaucu ucuacuuca 19
 <210> 12
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
- 15 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (8)..(8)
- 20 <223> n=deoksitimidin
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (11)..(11)
 <223> n=deoksitimidin
- 25 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (13)..(13)
 <223> n=deoksitimidin
 <220>
- 30 <221> çeşitli_özellik
 <222> (16)..(17)
 <223> n=deoksitimidin
 <400> 12
 aagcgcanca ncnacnca 19

- <210> 13
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 5 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (8)..(8)
 10 <223> n=deoksitimidin
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (11)..(11)
 <223> n=deoksitimidin
 15 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (13)..(13)
 <223> n=deoksitimidin
 <220>
 20 <221> çeşitli_özellik
 <222> (17)..(17)
 <223> n=deoksitimidin
 <400> 13
 aagcgancu ncnacunca 19
 25 <210> 14
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 30 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (8)..(8)
 <223> n=deoksitimidin

- <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (13)..(13)
 <223> n=deoksitimidin
- 5 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (17)..(17)
 <223> n=deoksitimidin
 <400> 14
- 10 aagcgancu ucnacunca 19
 <210> 15
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
- 15 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (8)..(8)
- 20 <223> n=deoksitimidin
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (17)..(17)
 <223> n=deoksitimidin
- 25 <400> 15
 aagcgancu ucuacunca 19
 <210> 16
 <211> 19
 <212> RNA
- 30 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik

- <222> (8)..(8)
 <223> n=deoksitimidin
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
- 5 <222> (17)..(17)
 <223> n=deoksitimidin
 <400> 16
 aagcgancu ucuacunca 19
 <210> 17
- 10 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
- 15 <400> 17
 cgcaucuucu acuucaacu 19
 <210> 18
 <211> 19
 <212> RNA
- 20 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 18
 gcgcaucuuc uacuucaac 19
- 25 <210> 19
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
- 30 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 19
 aaagccaugc ucaaccugc 19
 <210> 20
 <211> 21

- <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 5 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (20)..(21)
 <223> n=deoksitimidin
 <400> 20
 10 ugaucgcagg aguaucuuun n 21
 <210> 21
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Yapay
 15 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (20)..(21)
 20 <223> n=deoksitimidin
 <400> 21
 caagaucgca caggagagcn n 21
 <210> 22
 <211> 19
 25 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 22
 30 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 <210> 23
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay

<220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 23
 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 5 <210> 24
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 10 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 24
 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 <210> 25
 <211> 19
 15 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 25
 20 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 <210> 26
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 25 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (1) .. (1)
 30 <223> n=deoksitimidin
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (6)..(6)
 <223> n=deoksitimidin

- <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (13)..(13)
 <223> n=deoksitimidin
- 5 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (18)..(19)
 <223> n=deoksitimidin
 <400> 26
- 10 ngaagnagaa gangcgcn 19
 <210> 27
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Yapay
- 15 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (20)..(21)
- 20 <223> n=deoksitimidin
 <400> 27
 caagagcaug ucguggcgan n 21
 <210> 28
 <211> 19
- 25 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 28
- 30 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 <210> 29
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay

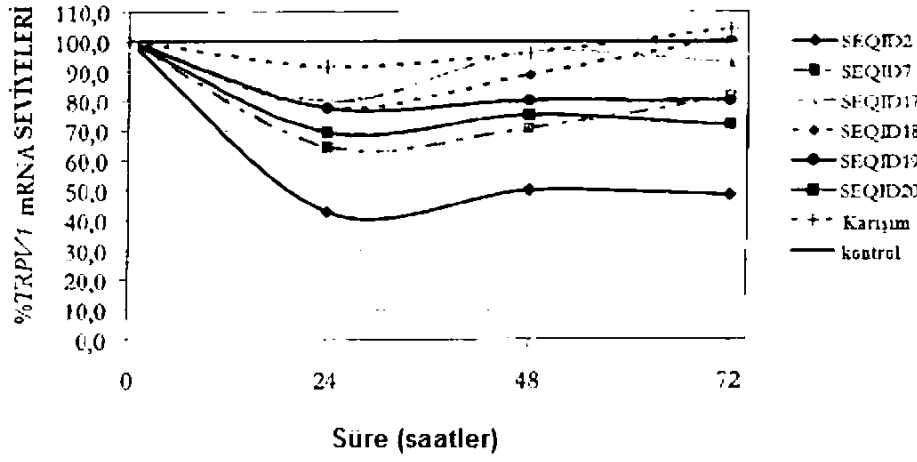
<220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 29
 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 5 <210> 30
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 10 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 30
 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 <210> 31
 <211> 19
 15 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 31
 20 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 <210> 32
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 25 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 32
 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 <210> 33
 30 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA

<400> 33
 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 <210> 34
 <211> 19
 5 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 34
 10 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 <210> 35
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 15 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 35
 ugaaguagaa gaugcgcuu 19
 <210> 36
 20 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 25 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (6)..(6)
 <223> n=deoksitimidin
 <220>
 30 <221> çeşitli_özellik
 <222> (13)..(13)
 <223> n=deoksitimidin
 <400> 36
 ugaagnagaa gangcgcuu 19

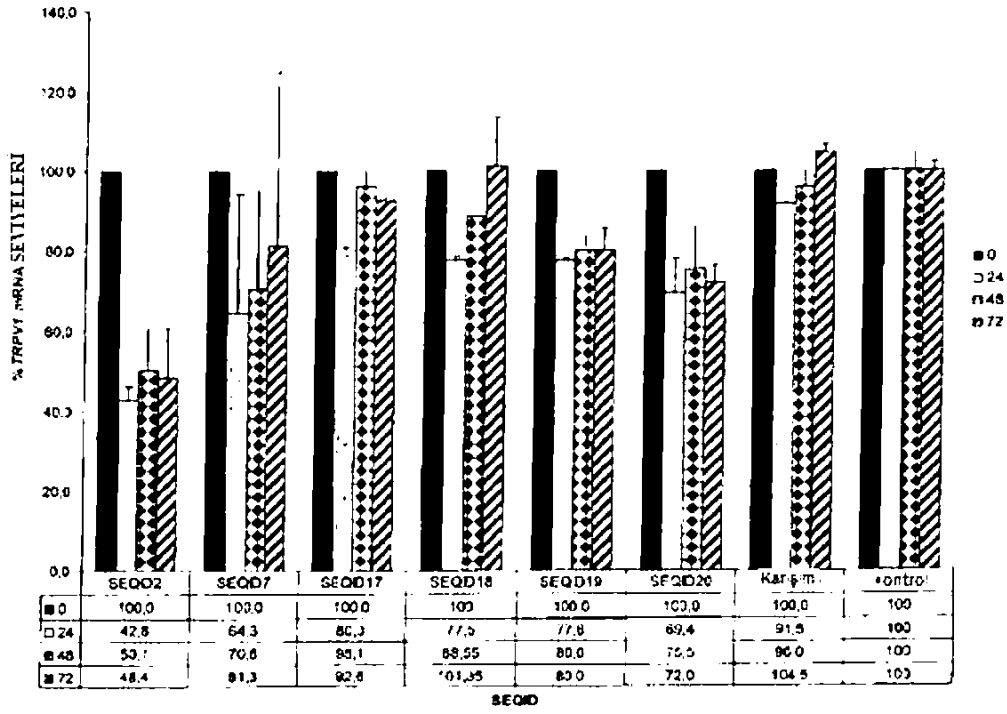
<210> 37
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 5 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 37
 aguugaagua gaaugcg 19
 <210> 38
 10 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 15 <400> 38
 guugaaguag aaugcgcg 19
 <210> 39
 <211> 19
 <212> RNA
 20 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <400> 39
 gcagguugag cauggcuu 19
 25 <210> 40
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 30 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 <221> çeşitli_özellik
 <222> (20)..(21)
 <223> n=deoksitimidin

<400> 40
 aaagauacuc cugcgaucan n 21
 <210> 41
 <211> 21
 5 <212> RNA
 <213> Yapay
 <220>
 <223> TRPV1'e karşı siRNA
 <220>
 10 <221> çeşitli_özellik
 <222> (20)..(21)
 <223> n=deoksitimidin
 <400> 41
 gcucuccugu gcgaucuugn n 21
 15

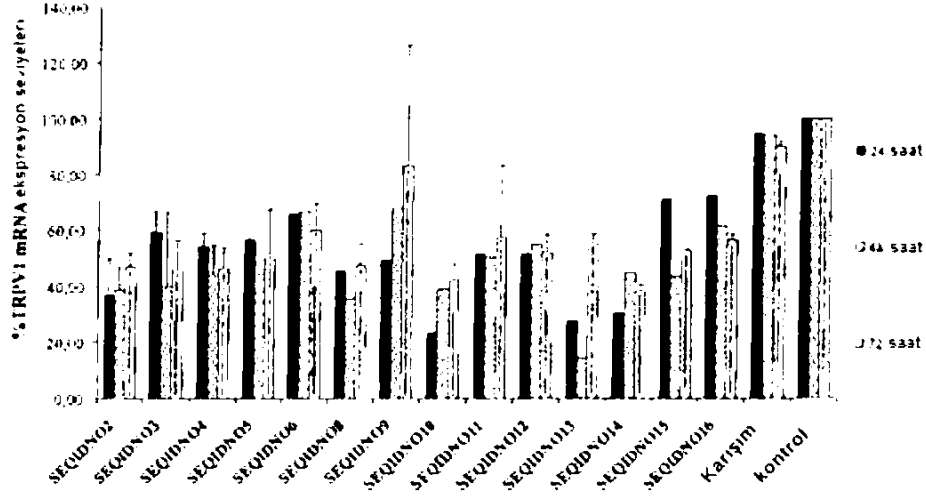
A



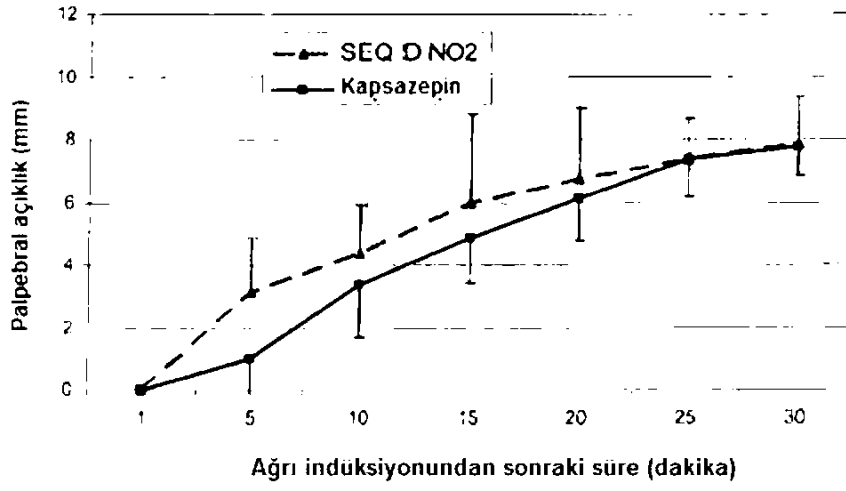
B



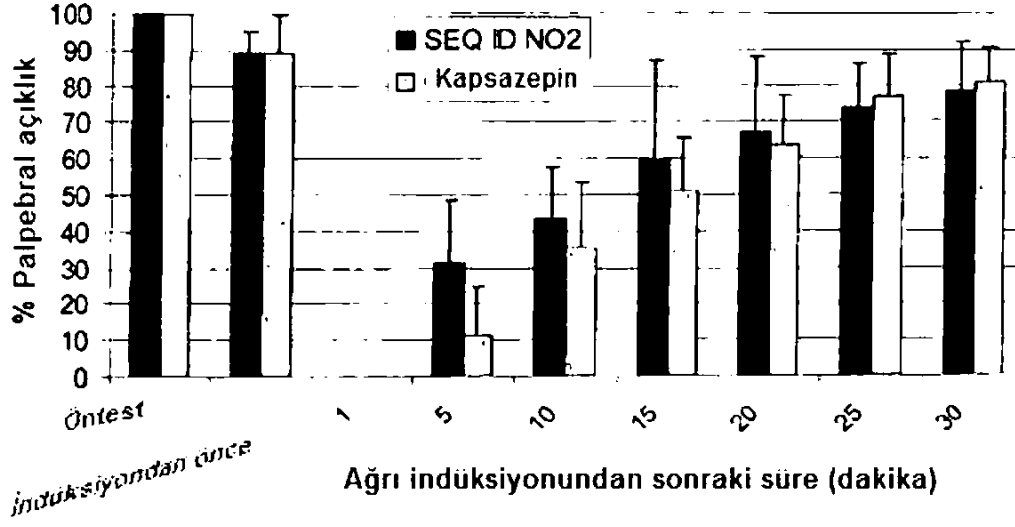
ŞEKİL 1



ŞEKİL 2

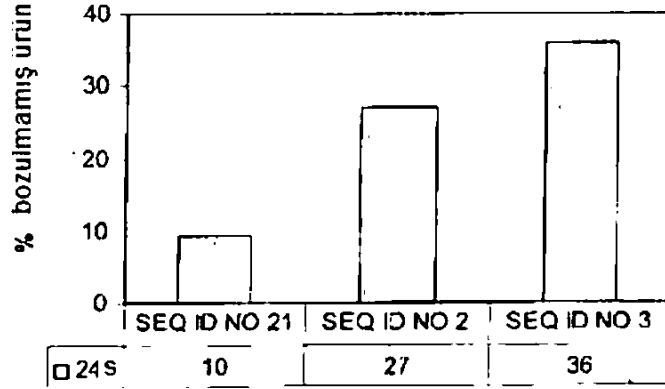


ŞEKİL 3



ŞEKİL 4

%10 insan plazması



ŞEKİL 5