



(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)



1-0036534

(51)^{2017.01} C07H 21/04; A61K 47/54; C12N
15/113; A61P 35/00; A61K 31/713;
A61K 47/56

(13) B

(21) 1-2018-01335

(22) 22/08/2016

(86) PCT/US2016/047946 22/08/2016

(87) WO2017/040078 09/03/2017

(30) 62/213,224 02/09/2015 US

(45) 25/08/2023 425

(43) 26/11/2018 368A

(73) ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. (US)

300 Third Street, 3rd Floor, Cambridge, MA 02142, United States of America

(72) HINKLE, Gregory (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) TÁC NHÂN AXIT RIBONUCLEIC SỢI KÉP (DSARNI) ĐỂ ỨC CHẾ SỰ BIỂU HIỆN CỦA PHỐI TỬ 1 GÂY CHẾT TẾ BÀO THEO CHƯƠNG TRÌNH 1 (PD-L1), VÀ ĐƯỢC PHÂN CHỨA NÓ

(57) Sáng chế đề cập đến tác nhân ARNi sợi kép dùng để ức chế sự biểu hiện của phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1 (programmed cell death 1 ligand 1 - PD-L1), và được phân chứa chúng. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp in vitro ức chế sự biểu hiện PD-L1 ở tế bào.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tác nhân axit ribonucleic sợi kép (dsARNi) để ức chế sự biểu hiện của phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-L1), được phẩm chứa nó, và phương pháp in vitro ức chế sự biểu hiện PD-L1 ở tế bào.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-L1) là protein xuyên màng loại I gồm 290 axit amin được mã hóa bởi gen CD274 trên nhiễm sắc thể thứ 19 ở chuột và nhiễm sắc thể thứ 9 ở người. Sự biểu hiện PD-L1 liên quan đến việc tránh đáp ứng miễn dịch có liên quan đến lây nhiễm mạn tính, *chẳng hạn*, nhiễm virus mạn tính (bao gồm, ví dụ, HIV, HBV, HCV và HTLV, ngoài các bệnh nhiễm virus khác), bệnh nhiễm khuẩn mạn tính (bao gồm, ví dụ, *Helicobacter pylori*, ngoài các bệnh nhiễm khuẩn khác), và nhiễm ký sinh trùng mạn tính (bao gồm, ví dụ, *Schistosoma mansoni*). Sự biểu hiện PD-L1 đã được phát hiện ở một số loại mô và tế bào bao gồm tế bào T, tế bào B, đại thực bào, tế bào tua, và tế bào không tạo huyết bao gồm tế bào nội mô, tế bào gan, tế bào cơ, và nhau thai.

Sự biểu hiện PD-L1 cũng liên quan đến sự kìm hãm hoạt tính miễn dịch chống khối u. Các khối u biểu hiện kháng nguyên mà có thể được nhận biết bởi các tế bào T của vật chủ, nhưng sự loại bỏ khối u nhờ miễn dịch là rất hiếm. Một phần là do sự ức chế miễn dịch bởi vi môi trường khối u. Sự biểu hiện PD-L1 ở nhiều khối u là một hợp phần của môi trường ức chế này và hoạt động phối hợp với các tín hiệu ức chế miễn dịch khác. Sự biểu hiện PD-L1 đã được nhận thấy *in situ* ở nhiều khối u rắn bao gồm vú, phổi, ruột kết, buồng trứng, u hắc tố, bàng quang, gan, tuyến nước bọt, dạ dày, u thần kinh đệm, tuyến giáp, biểu mô tuyến ức, đầu, và cổ (Brown JA *et al.*, 2003. *J. Immunol.* 170:1257–66; Dong H *et al.* 2002. *Nat. Med.* 8:793–800; Hamanishi J, *et al.*

2007. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:3360–65; Strome SE *et al.* 2003. *Cancer Res.* 63:6501–5; Inman BA *et al.* 2007. *Cancer* 109:1499–505; Konishi J *et al.* 2004. *Clin. Cancer Res.* 10:5094–100; Nakanishi J *et al.* 2007. *Cancer Immunol. Immunother.* 56:1173–82; Nomi T *et al.* 2007. *Clin. Cancer Res.* 13:2151–57; Thompson RH *et al.* 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:17174–79; Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG, Xu N. 2006. *Acta Histochem.* 108:19–24). Ngoài ra, sự biểu hiện của thụ thể này đối với PD-L1, protein chết tế bào theo chương trình 1 (Programmed cell death protein 1) (còn được biết đến như là PD-1 và CD279) được điều tiết tăng ở các tế bào bạch huyết thâm nhập khối u, và điều này cũng góp phần ức chế miễn dịch khối u (Blank C *et al.* 2003. *J. Immunol.* 171:4574–81). Quan trọng nhất là, các nghiên cứu liên quan đến sự biểu hiện PD-L1 ở khối u đến kết cục bệnh chỉ ra rằng sự biểu hiện PD-L1 có liên quan chặt chẽ với tiên lượng bệnh không tốt ở bệnh ung thư thận, buồng trứng, bàng quang, vú, dạ dày, và tụy (Hamanishi J *et al.* 2007. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:3360–65; Inman BA *et al.* 2007. *Cancer* 109:1499–505; Konishi J *et al.* 2004. *Clin. Cancer Res.* 10:5094–100; Nakanishi J *et al.* 2007. *Cancer Immunol. Immunother.* 56:1173–82; Nomi T *et al.* 2007. *Clin. Cancer Res.* 13:2151–57; Thompson RH *et al.* 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:17174–79; Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG, Xu N. 2006. *Acta Histochem.* 108:19–24). Ngoài ra, các nghiên cứu này gợi ý rằng mức biểu hiện PD-L1 cao hơn ở khối u có thể tạo điều kiện thuận lợi cho khối u tiến triển và sự xâm lấn sâu hơn vào các cấu trúc mô.

Con đường PD-1 cũng có thể đóng vai trò trong các khối u ác tính huyết học. PD-L1 được biểu hiện ở nhiều tế bào u tủy nhưng không được biểu hiện ở tương bào bình thường (Liu J *et al.* 2007. *Blood* 110:296–304). PD-L1 được biểu hiện ở một số u bạch huyết tế bào T nguyên phát, đặc biệt là u lympho tế bào T lớn tự ghép (Brown JA *et al.*, 2003. *J. Immunol.* 170:1257–66). PD-1 được biểu hiện ở mức cao ở các tế bào T của u lympho nguyên bào miễn dịch-mạch máu, và PD-L1 được biểu hiện ở mạng tế bào tua dạng nang có liên quan (Dorfman DM *et al.* 2006. *Am. J. Surg. Pathol.* 30:802–10). Ở u lympho Hodgkin chiếm ưu thế tế bào lympho dạng nốt sần, tế bào T liên kết với tế bào lympho hoặc mô bào (L&H) biểu hiện PD-1. Phân tích vi mảng bằng cách sử dụng số liệu của các gen được gây ra bởi việc nổi PD-1 gợi ý rằng tế bào T gắn kết khối u đáp ứng với các tín hiệu PD-1 *in situ* ở u lympho Hodgkin (Chemnitz

JM *et al.* 2007. *Blood* 110:3226–33). PD-1 và PD-L1 được biểu hiện ở các tế bào CD4 T ở bệnh bạch cầu và u lympho tế bào T ở người trưởng thành qua trung gian HTLV-1 (Shimauchi T *et al.* 2007. *Int. J. Cancer* 121: 2585–90). Các tế bào khối u này đáp ứng thấp đối với các tín hiệu TCR.

Các nghiên cứu trên các mô hình động vật chứng tỏ rằng PD-L1 ở các khối u ức chế sự hoạt hóa tế bào T và phân giải tế bào khối u và trong một số trường hợp dẫn đến sự chết tế bào T đặc hiệu khối u gia tăng (Dong H *et al.* 2002. *Nat. Med.* 8:793–800; Hirano F *et al.* 2005. *Cancer Res.* 65:1089–96). APC có liên quan khối u cũng có thể sử dụng con đường PD-1:PD-L để kiểm soát đáp ứng tế bào T chống khối u. Sự biểu hiện PD-L1 ở quần thể DC thuộc tủy có liên quan đến khối u được điều tiết tăng bởi các yếu tố môi trường khối u (Curiel TJ *et al.* 2003. *Nat. Med.* 9:562-67). Tế bào tua có trong tương bào (Plasmacytoid dendritic cell - DC) ở các hạch bạch huyết dẫn lưu khối u của u hắc tố B16 biểu hiệnIDO, mà nó hoạt hóa mạnh hoạt tính ức chế của tế bào T điều tiết. Hoạt tính ức chế của tế bào T điều tiết được xử lýIDO đòi hỏi tế bào tiếp xúc với các DC biểu hiệnIDO (Sharma MD *et al.* 2007. *J. Clin. Invest.* 117:2570-82).

Vì vậy, cần có các phương pháp điều trị hữu hiệu đối với các bệnh có liên quan đến PD-L1, như bệnh lây nhiễm, chẳng hạn như bệnh lây nhiễm nội bào mạn tính, *chẳng hạn*, bệnh nhiễm virus, *chẳng hạn*, bệnh nhiễm virus viêm gan, hoặc bệnh nhiễm khuẩn, *chẳng hạn*, bệnh nhiễm khuẩn lao; và bệnh ung thư, *chẳng hạn*, bệnh ung thư gan, *chẳng hạn*, caxinom tế bào gan.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các chế phẩm ARNi mà tác động đến sự phân cắt qua trung gian phức bất hoạt cảm ứng bằng ARN (RNA-induced silencing complex - RISC) của các sản phẩm phiên mã ARN của gen PD-L1. Gen PD-L1 có thể nằm trong tế bào, *chẳng hạn*, tế bào bên trong đối tượng, như người.

Vì vậy, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tác nhân axit ribonucleic sợi kép (ARNi) để ức chế sự biểu hiện của phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-L1), trong đó ARNi này bao gồm một sợi có nghĩa và một sợi đối nghĩa, trong đó sợi có nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kế khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ

trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và sợi đối nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ trình tự nucleotit SEQ ID NO:2.

Theo các phương án nhất định, các sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa chứa các trình tự được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự trong bảng 3. Theo các phương án khác, các sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa chứa các trình tự được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự trong bảng 5.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tác nhân axit ribonucleic sợi kép (ARN sợi kép) để ức chế sự biểu hiện của phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-L1), trong đó ARNi bao gồm một sợi có nghĩa và một sợi đối nghĩa, sợi đối nghĩa bao gồm vùng bổ trợ mà bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ trình tự đối nghĩa bất kỳ được liệt kê trong bảng 3. Theo các phương án nhất định, các sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa chứa các trình tự được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự trong bảng. 5

Theo các phương án nhất định, ARNi bao gồm ít nhất một nucleotit cải biến. Theo một số phương án, về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa và tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa bao gồm cải biến. Theo một số phương án, tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa và tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa bao gồm cải biến.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tác nhân axit ribonucleic sợi kép (ARNi) để ức chế sự biểu hiện của phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-L1), trong đó tác nhân ARNi này bao gồm sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa, trong đó sợi có nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ nucleotit bất kỳ trong số 3221-3243, 351-372, 618-641, 618-639, 619-640, 620-641, 1093-1115, 1093-1114, 1094-1115, 1167-1188, 1293-1314, 1518-1539, 2103-2124, 2220-2261, 2220-2241, 2240-2261, 2648-2680, 2648-2669, 2658-2679, 2659-2680, 3143-3164, 3198-3219, 3221-3242, hoặc 3222-3243 của trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và sợi đối nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ phần bổ trợ của trình tự nucleotit SEQ ID NO:2, và trong đó tác nhân ARNi bao gồm ít nhất một nucleotit cải biến.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tác nhân axit ribonucleic sợi kép (ARNi) để ức chế sự biểu hiện của phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-

L1), trong đó tác nhân ARNi này bao gồm một sợi có nghĩa và một sợi đối nghĩa, sợi đối nghĩa bao gồm vùng bổ trợ mà bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ trình tự đối nghĩa bất kỳ trong sợi kép bất kỳ trong số các sợi kép sau AD-67635, AD-67637, AD-67658, AD-67632, AD-67629, AD-67631, AD-67633, AD-67643, AD-67653, AD-67640, AD-67650, AD-67676, AD-67661, AD-67667, AD-67655, AD-67672, AD-67659, AD-67673, AD-67664, AD-67662, AD-67660, AD-67656, AD-67628, AD-67647, AD-67626, hoặc AD-67645.

Theo một phương án, các sợi có nghĩa và đối nghĩa bao gồm các trình tự nucleotit được chọn từ nhóm gồm trình tự nucleotit bất kỳ trong các sợi kép bất kỳ trong số các sợi kép AD-67635, AD-67637, AD-67658, AD-67632, AD-67629, AD-67631, AD-67633, AD-67643, AD-67653, AD-67640, AD-67650, AD-67676, AD-67661, AD-67667, AD-67655, AD-67672, AD-67659, AD-67673, AD-67664, AD-67662, AD-67660, AD-67656, AD-67628, AD-67647, AD-67626, hoặc AD-67645.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tác nhân ARNi sợi kép để ức chế sự biểu hiện của phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-L1), trong đó tác nhân ARNi sợi kép này bao gồm một sợi có nghĩa và một sợi đối nghĩa tạo thành vùng sợi kép, trong đó sợi có nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và sợi đối nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ trình tự nucleotit SEQ ID NO:2, trong đó về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa và về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa là các nucleotit cải biến, và trong đó sợi có nghĩa được tiếp hợp với một phối tử được gắn ở đầu tận cùng 3'.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tác nhân ARNi sợi kép để ức chế sự biểu hiện của PD-L1, tác nhân này bao gồm một sợi có nghĩa và một sợi đối nghĩa tạo thành vùng sợi kép, trong đó sợi có nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ các nucleotit 3221-3243, 351-372, 618-641, 618-639, 619-640, 620-641, 1093-1115, 1093-1114, 1094-1115, 1167-1188, 1293-1314, 1518-1539, 2103-2124, 2220-2261, 2220-2241, 2240-2261, 2648-2680, 2648-2669, 2658-2679, 2659-2680, 3143-3164, 3198-3219, 3221-3242, hoặc 3222-3243 của trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và sợi đối nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau

bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ phần bổ trợ tương ứng của trình tự nucleotit SEQ ID NO:2 sao cho sợi đối nghĩa bổ trợ cho ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit trong sợi có nghĩa.

Theo các phương án nhất định, sợi có nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ các nucleotit 3221-3243, 351-372, 1093-1115, 1093-1114, 1094-1115, 1167-1188, 1293-1314, 1518-1539, 2103-2124, 2220-2261, 2220-2241, 2240-2261, 2648-2680, 2648-2669, 2658-2679, 2659-2680, 3143-3164, 3198-3219, 3221-3242, hoặc 3222-3243 của trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và sợi đối nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ phần bổ trợ tương ứng của trình tự nucleotit SEQ ID NO:2 sao cho sợi đối nghĩa bổ trợ cho ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit trong sợi có nghĩa.

Theo các phương án nhất định, sợi có nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ các nucleotit 3221-3243, 1093-1115, 1093-1114, 1094-1115, 3221-3242, hoặc 3222-3243 của trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và sợi đối nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ phần bổ trợ tương ứng của trình tự nucleotit SEQ ID NO:2 sao cho sợi đối nghĩa bổ trợ cho ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit trong sợi có nghĩa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tác nhân axit ribonucleic sợi kép (ARNi) để ức chế sự biểu hiện của phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-L1), trong đó tác nhân ARNi sợi kép bao gồm một sợi có nghĩa và một sợi đối nghĩa tạo thành vùng sợi kép, trong đó sợi có nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ nucleotit bất kỳ trong số các nucleotit 3221-3243, 351-372, 618-641, 618-639, 619-640, 620-641, 1093-1115, 1093-1114, 1094-1115, 1167-1188, 1293-1314, 1518-1539, 2103-2124, 2220-2261, 2220-2241, 2240-2261, 2648-2680, 2648-2669, 2658-2679, 2659-2680, 3143-3164, 3198-3219, 3221-3242, hoặc 3222-3243 của trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và sợi đối nghĩa đã nêu bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ phần bổ trợ của trình tự nucleotit SEQ ID NO:2, trong đó về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi

có nghĩa đã nêu và về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa đã nêu bao gồm các cải biến nucleotit, và trong đó sợi có nghĩa được tiếp hợp với một phối tử được gắn ở đầu tận cùng 3'.

Theo các phương án nhất định, về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa hoặc về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa là các nucleotit cải biến, hoặc về cơ bản tất cả các nucleotit của cả hai sợi được cải biến; và trong đó sợi có nghĩa được tiếp hợp với một phối tử được gắn ở đầu tận cùng 3'.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tác nhân ARNi sợi kép để ức chế sự biểu hiện của PD-L1, mà nó bao gồm một sợi có nghĩa và một sợi đối nghĩa tạo thành vùng sợi kép, trong đó sợi có nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên tiếp từ các nucleotit 3221-3243, 351-372, 618-641, 618-639, 619-640, 620-641, 1093-1115, 1093-1114, 1094-1115, 1167-1188, 1293-1314, 1518-1539, 2103-2124, 2220-2261, 2220-2241, 2240-2261, 2648-2680, 2648-2669, 2658-2679, 2659-2680, 3143-3164, 3198-3219, 3221-3242, hoặc 3222-3243 của trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và sợi đối nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên tiếp từ phần bổ trợ tương ứng của trình tự nucleotit SEQ ID NO:2 sao cho sợi đối nghĩa bổ trợ cho ít nhất 15 nucleotit liên tiếp trong sợi có nghĩa.

Theo các phương án nhất định, tác nhân này bao gồm một sợi có nghĩa và một sợi đối nghĩa tạo thành vùng sợi kép, trong đó sợi có nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên tiếp từ các nucleotit 3221-3243, 351-372, 1093-1115, 1093-1114, 1094-1115, 1167-1188, 1293-1314, 1518-1539, 2103-2124, 2220-2261, 2220-2241, 2240-2261, 2648-2680, 2648-2669, 2658-2679, 2659-2680, 3143-3164, 3198-3219, 3221-3242, hoặc 3222-3243 của trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và sợi đối nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên tiếp từ phần bổ trợ tương ứng của trình tự nucleotit SEQ ID NO:2 sao cho sợi đối nghĩa bổ trợ cho ít nhất 15 nucleotit liên tiếp trong sợi có nghĩa.

Theo các phương án nhất định, các tác nhân này bao gồm một sợi có nghĩa và một sợi đối nghĩa tạo thành vùng sợi kép, trong đó sợi có nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên tiếp từ các nucleotit 3222-3243 1093-1115, 1093-1114, 1094-1115, 3221-3243, hoặc 3221-3242, của trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và sợi đối nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên tiếp từ phần bổ trợ tương ứng của trình tự nucleotit SEQ ID NO:2 sao cho sợi đối nghĩa bổ trợ cho ít nhất 15 nucleotit liên tiếp trong sợi có nghĩa. Theo các

phương án nhất định, về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa là các nucleotit cải biến. Theo các phương án nhất định, về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa là các nucleotit cải biến. Theo các phương án nhất định, về cơ bản tất cả các nucleotit của cả hai sợi được cải biến. Theo các phương án được ưu tiên, sợi có nghĩa được tiếp hợp với một phối tử được gắn ở đầu tận cùng 3'.

Theo các phương án nhất định, sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa chứa vùng hỗ trợ bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kế khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ trình tự đối nghĩa bất kỳ được liệt kê trong bảng bất kỳ trong số các bảng 3 và 5. Ví dụ, theo phương án nhất định, sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa chứa vùng hỗ trợ bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kế khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ trình tự đối nghĩa bất kỳ thuộc các sợi kép AD-67635, AD-67637, AD-67658, AD-67632, AD-67629, AD-67631, AD-67633, AD-67643, AD-67653, AD-67640, AD-67650, AD-67676, AD-67661, AD-67667, AD-67655, AD-67672, AD-67659, AD-67673, AD-67664, AD-67662, AD-67660, AD-67656, AD-67628, AD-67647, AD-67626, hoặc AD-67645. Theo các phương án nhất định, sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa chứa vùng hỗ trợ bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kế thuộc trình tự đối nghĩa bất kỳ trong số các trình tự đối nghĩa thuộc các sợi kép nêu trên.

Theo một số phương án, tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa và tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa bao gồm cải biến. Theo một phương án, ít nhất một trong số các nucleotit cải biến được chọn từ nhóm bao gồm deoxy-nucleotit, nucleotit deoxy-thymin (dT) ở đầu tận cùng 3', nucleotit cải biến 2'-O-methyl, nucleotit cải biến 2'-flo, nucleotit cải biến 2'-deoxy, nucleotit dạng khóa, nucleotit dạng không khóa, nucleotit giới hạn một cách thích ứng, etyl nucleotit không tự nhiên, nucleotit mất một bazơ, nucleotit cải biến 2'-amino, nucleotit cải biến 2'-O-allyl, nucleotit cải biến 2'-C-alkyl, nucleotit cải biến 2'-hydroxly, nucleotit cải biến 2'-metoxyetyl, nucleotit cải biến 2'-O-alkyl, morpholino nucleotit, phosphoramidat, nucleotit chứa bazơ không tự nhiên, nucleotit cải biến tetrahydropyran, nucleotit cải biến 1,5-anhydrohexitol, nucleotit cải biến xyclohexenyl, nucleotit chứa nhóm phosphorothioat, nucleotit chứa nhóm methylphosphonat, nucleotit chứa 5'-phosphat, và nucleotit chứa hóm giả 5'-phosphat. Theo một phương án khác, các nucleotit cải biến chứa một trình tự ngắn của các nucleotit deoxy-thymin (dT) đầu tận cùng 3'.

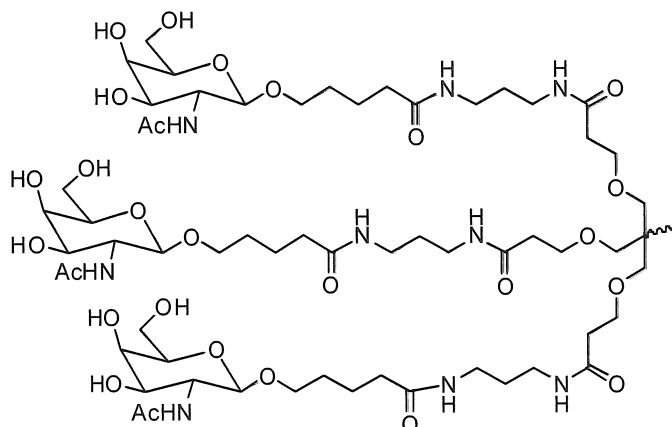
Theo các phương án nhất định, về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa được cải biến. Theo các phương án nhất định, về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa được cải biến. Theo các phương án nhất định, về cơ bản tất cả các nucleotit của cả hai sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa được cải biến.

Theo các phương án nhất định, sợi kép bao gồm một sợi đối nghĩa được cải biến được đưa ra trong bảng 5. Theo các phương án nhất định, sợi kép bao gồm một sợi có nghĩa được cải biến được đưa ra trong bảng 5. Theo các phương án nhất định, sợi kép bao gồm một sợi kép được cải biến được đưa ra trong bảng 5.

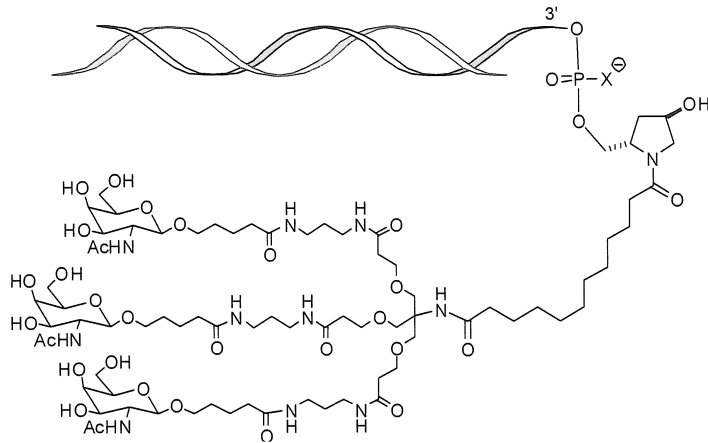
Theo các phương án nhất định, vùng bổ trợ giữa sợi đối nghĩa và sợi đích có chiều dài ít nhất là 17 nucleotit. Ví dụ, vùng bổ trợ giữa sợi đối nghĩa và sợi đích có chiều dài từ 19 đến 21 nucleotit, ví dụ, vùng bổ trợ có chiều dài 21 nucleotit. Theo các phương án được ưu tiên, mỗi sợi có chiều dài không nhiều hơn 30 nucleotit.

Theo một số phương án, ít nhất một sợi chứa phần nhô ra ở đầu 3' gồm ít nhất 1 nucleotit, *chẳng hạn*, ít nhất một sợi chứa phần nhô ra ở đầu 3' gồm ít nhất 2 nucleotit.

Theo nhiều phương án, tác nhân ARNi còn bao gồm phối tử. Phối tử có thể được tiếp hợp với đầu 3' của sợi có nghĩa của tác nhân ARNi. Phối tử có thể là dẫn xuất N-axetylgalactosamin (GalNAc) bao gồm, nhưng không giới hạn ở



Ví dụ về tác nhân ARNi được tiếp hợp với phối tử như được chỉ ra trong sơ đồ sau:



và, trong đó X là O hoặc S. Theo một phương án, X là O.

Theo các phương án nhất định, phối tử có thể là gốc cholesterol.

Theo các phương án nhất định, vùng hỗ trợ chứa một trong số các trình tự đối nghĩa trong bảng bất kỳ trong số bảng 3 và bảng 5. Theo một phương án khác, vùng hỗ trợ chỉ chứa một trong số các trình tự đối nghĩa trong bảng bất kỳ trong số bảng 3 và bảng 5.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tác nhân ARNi sợi kép có khả năng ức chế sự biểu hiện của PD-L1, trong đó tác nhân ARNi sợi kép chứa sợi có nghĩa hỗ trợ cho sợi đối nghĩa, trong đó sợi đối nghĩa bao gồm vùng hỗ trợ cho phần ARNm mã hóa PD-L1, trong đó mỗi sợi có chiều dài khoảng 14 đến 30 nucleotit, trong đó tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (III):

có nghĩa: $5' \text{ } n_p \text{ } -N_a \text{ } -(X \text{ } X \text{ } X)_i \text{ } -N_b \text{ } -Y \text{ } Y \text{ } Y \text{ } -N_b \text{ } -(Z \text{ } Z \text{ } Z)_j \text{ } -N_a \text{ } -n_q \text{ } 3'$

đối nghĩa: $3' \text{ } n_{p'} \text{ } -N_{a'} \text{ } -(X'X'X')_k \text{ } -N_{b'} \text{ } -Y'Y'Y' \text{ } -N_{b'} \text{ } -(Z'Z'Z')_l \text{ } -N_{a'} \text{ } -n_{q'} \text{ } 5' \text{ } \text{ (III)}$

trong đó: i, j, k, và l độc lập với nhau bằng 0 hoặc 1; p, p', q, và q' độc lập với nhau bằng 0-6; mỗi N_a và $N_{a'}$ độc lập là trình tự oligonucleotit bao gồm 0-25 nucleotit cải biến hoặc không được cải biến hoặc tổ hợp của chúng, mỗi trình tự bao gồm ít nhất hai nucleotit cải biến khác nhau; mỗi N_b và $N_{b'}$ độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-10 nucleotit cải biến hoặc không được cải biến hoặc tổ hợp của chúng; mỗi n_p , $n_{p'}$, n_q , và $n_{q'}$, có thể có mặt hoặc không có mặt, độc lập là nucleotit nhô ra; mỗi XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', và Z'Z'Z' độc lập là một motif gồm ba cải biến giống nhau trên

ba nucleotit liền kề; các cải biến ở N_b khác với cải biến ở Y và cải biến ở N_b' khác với cải biến ở Y' ; và trong đó sợi có nghĩa được tiếp hợp với ít nhất một phối tử.

Theo các phương án nhất định, i bằng 0; j bằng 0; i bằng 1; j bằng 1; cả i và j bằng 0; hoặc cả i và j bằng 1. Theo một phương án khác, k bằng 0; l bằng 0; k bằng 1; l bằng 1; cả k và l bằng 0; hoặc cả k và l bằng 1. Theo một phương án khác, XXX hỗ trợ cho $X'X'X'$, YYY hỗ trợ cho $Y'Y'Y'$, và ZZZ hỗ trợ cho $Z'Z'Z'$. Theo một phương án khác, motif YYY xuất hiện ở hoặc ở gần vị trí phân cắt của sợi có nghĩa. Theo một phương án khác, motif $Y'Y'Y'$ xuất hiện ở các vị trí 11, 12 và 13 của sợi đối nghĩa từ đầu 5'. Theo một phương án, Y' là 2'-O-metyl.

Ví dụ, công thức (III) có thể được biểu thị bởi công thức (IIIa):

có nghĩa: $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

đối nghĩa: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIa).

Theo một phương án khác, công thức (III) được biểu thị bởi công thức (IIIb):

có nghĩa: $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

đối nghĩa: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIb)

trong đó mỗi N_b và N_b' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 1-5 nucleotit cải biến.

Theo cách khác, công thức (III) có thể được biểu thị bởi công thức (IIIc):

có nghĩa: $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

đối nghĩa: $3' n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIc)

trong đó mỗi N_b và N_b' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 1-5 nucleotit cải biến.

Hơn nữa, công thức (III) có thể được biểu thị bởi công thức (IIId):

có nghĩa: $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

đối nghĩa: $3' n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$ (IIId)

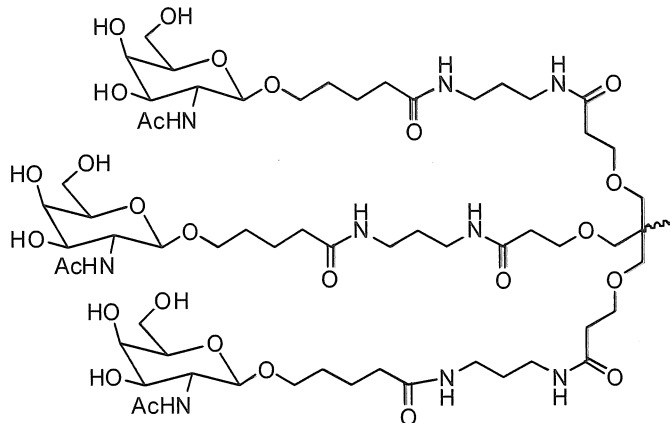
trong đó mỗi N_b và N_b' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 1-5 nucleotit cải biến và mỗi N_a và N_a' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 2-10 nucleotit cải biến.

Theo phương án nhất định, vùng sợi kép có chiều dài 15-30 cặp nucleotit. Ví dụ, vùng sợi kép có thể có chiều dài 17-23 cặp nucleotit. Vùng sợi kép có thể có chiều dài 17-25 cặp nucleotit. Vùng sợi kép có thể có chiều dài 23-27 cặp nucleotit. Vùng sợi kép có thể có chiều dài 19-21 cặp nucleotit. Vùng sợi kép có thể có chiều dài 21-23 cặp nucleotit.

Theo các phương án nhất định, mỗi sợi có 15-30 nucleotit. Theo các phương án khác, mỗi sợi có 19-30 nucleotit.

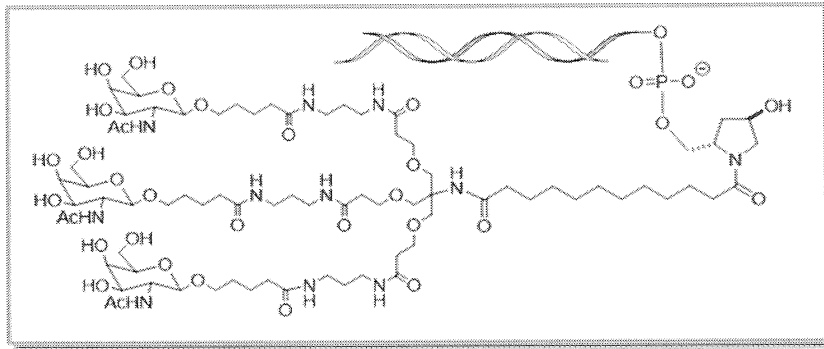
Các cải biến trên nucleotit có thể được lựa chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxyetyl, 2'-O-alkyl, 2'-O-allyl, 2'-C-allyl, 2'-flo, 2'-deoxy, 2'-hydroxyl, và tổ hợp của chúng. Theo một phương án khác, các cải biến trên các nucleotit là các cải biến 2'-O-metyl or 2'-flo.

Theo các phương án nhất định, phối tử là một hoặc nhiều chất dẫn xuất GalNAc được gắn qua đoạn liên kết hóa trị một hoặc đoạn liên kết mạch nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba. Theo một phương án, phối tử là



Phối tử có thể được gắn với đầu 3' của sợi có nghĩa.

Ví dụ về cấu trúc gồm tác nhân ARNi được tiếp hợp với phối tử được thể hiện trong sơ đồ sau:



Theo các phương án nhất định, phối tử có thể là gốc cholesterol.

Theo các phương án nhất định, tác nhân ARNi còn bao gồm ít nhất liên kết liên nucleotit phosphorothioat hoặc metylphosphonat. Ví dụ, liên kết liên nucleotit phosphorothioat hoặc metylphosphonat có thể ở đầu tận cùng 3' của một sợi, *nghĩa là*, sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa; hoặc ở các đầu của cả hai sợi, sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa.

Theo các phương án nhất định, liên kết liên nucleotit phosphorothioat hoặc metylphosphonat ở đầu tận cùng 5' của một sợi, *nghĩa là*, sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa; hoặc ở các đầu của cả hai sợi, sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa.

Theo các phương án nhất định, liên kết liên nucleotit phosphorothioat hoặc metylphosphonat nằm ở cả đầu tận cùng 5' và 3' của một sợi, *nghĩa là*, sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa; hoặc ở các đầu của cả hai sợi, sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa.

Theo các phương án nhất định, cặp bazơ ở vị trí 1 của đầu 5' của sợi đối nghĩa thuộc sợi kép là cặp bazơ AU.

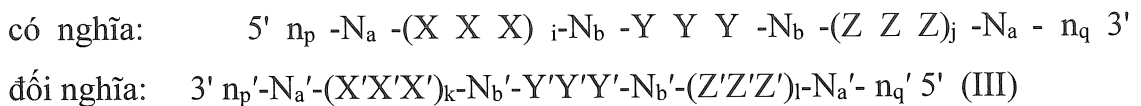
Theo các phương án nhất định, nucleotit Y chứa cải biến 2'-flo. Theo một phương án khác, nucleotit Y' chứa cải biến 2'-O-metyl. Theo một phương án khác, $p' > 0$. Theo một số phương án, $p' = 2$. Theo một số phương án, $q' = 0$, $p = 0$, $q = 0$, và các nucleotit nhô ra p' hỗ trợ cho ARN đích. Theo một số phương án, $q' = 0$, $p = 0$, $q = 0$, và các nucleotit nhô ra p' không hỗ trợ cho ARNm đích.

Theo các phương án nhất định, sợi có nghĩa có tổng số 21 nucleotit và sợi đối nghĩa có tổng số 23 nucleotit.

Theo các phương án nhất định, ít nhất một n_p' được liên kết với nucleotit liền kề nhờ liên kết phosphorothioat. Theo các phương án khác, tất cả n_p' được liên kết với nucleotit liền kề nhờ các liên kết phosphorothioat.

Theo các phương án nhất định, tác nhân ARNi được chọn từ nhóm gồm tác nhân ARNi được liệt kê trong bảng bất kỳ trong số các bảng 3 và 5. Theo các phương án nhất định, tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa và tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa bao gồm cải biến.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tác nhân ARNi sợi kép có khả năng ức chế sự biểu hiện của PD-L1 ở tế bào, trong đó tác nhân ARNi sợi kép này bao gồm một sợi có nghĩa hỗ trợ cho sợi đối nghĩa, trong đó sợi đối nghĩa bao gồm vùng hỗ trợ cho phần ARNm mã hóa PD-L1, trong đó mỗi sợi có chiều dài khoảng 14 đến 30 nucleotit, trong đó tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (III):



trong đó i , j , k , và l độc lập với nhau bằng 0 hoặc 1; p , p' , q , và q' độc lập với nhau bằng 0-6; mỗi N_a và N_a' độc lập là trình tự oligonucleotit bao gồm 0-25 nucleotit cải biến hoặc không được cải biến hoặc tổ hợp của chúng, mỗi trình tự bao gồm ít nhất hai nucleotit cải biến khác nhau; mỗi N_b và N_b' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-10 nucleotit cải biến hoặc không được cải biến hoặc tổ hợp của chúng; mỗi n_p , n_p' , n_q , và n_q' , có thể có mặt hoặc không có mặt độc lập là nucleotit nhô ra; mỗi XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', và Z'Z'Z' độc lập là một motif gồm ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liền kề, và trong đó các cải biến này là các cải biến 2'-O-methyl hoặc 2'-flo; các cải biến ở N_b khác với cải biến ở Y và cải biến ở N_b' khác với cải biến ở Y' ; và trong đó sợi có nghĩa được tiếp hợp với ít nhất một phối tử.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tác nhân ARNi sợi kép có khả năng ức chế sự biểu hiện của PD-L1 ở tế bào, trong đó tác nhân ARNi sợi kép này bao gồm một sợi có nghĩa hỗ trợ cho sợi đối nghĩa, trong đó sợi đối nghĩa bao gồm vùng hỗ trợ cho phần ARNm mã hóa PD-L1, trong đó mỗi sợi có chiều dài khoảng 14 đến 30 nucleotit, trong đó tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (III):

có nghĩa: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

đối nghĩa: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5' \text{ (III)}$

trong đó: i, j, k, và l độc lập với nhau bằng 0 hoặc 1; mỗi n_p , n_q , và n_q' , có thể có mặt hoặc không có mặt, độc lập là nucleotit nhô ra;

p, q, và q' độc lập với nhau bằng 0-6; $n_p' > 0$ và ít nhất một n_p' được liên kết với nucleotit liền kề nhờ liên kết phosphorothioat; mỗi N_a và N_a' độc lập là trình tự oligonucleotit bao gồm 0-25 nucleotit cải biến hoặc không được cải biến hoặc tổ hợp của chúng, mỗi trình tự bao gồm ít nhất hai nucleotit cải biến khác nhau; mỗi N_b và N_b' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-10 nucleotit cải biến hoặc không được cải biến hoặc tổ hợp của chúng; mỗi XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', và Z'Z'Z' độc lập là một motif gồm ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liền kề, và trong đó các cải biến này là các cải biến 2'-O-metyl hoặc 2'-flo; các cải biến ở N_b khác với cải biến ở Y và cải biến ở N_b' khác với cải biến ở Y'; và trong đó sợi có nghĩa được tiếp hợp với ít nhất một phối tử.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tác nhân ARNi sợi kép có khả năng ức chế sự biểu hiện của PD-L1 ở tế bào, trong đó tác nhân ARNi sợi kép này bao gồm một sợi có nghĩa bổ trợ cho sợi đối nghĩa, trong đó sợi đối nghĩa bao gồm vùng bổ trợ cho phần ARNm mã hóa PD-L1, trong đó mỗi sợi có chiều dài khoảng 14 đến 30 nucleotit, trong đó tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (III):

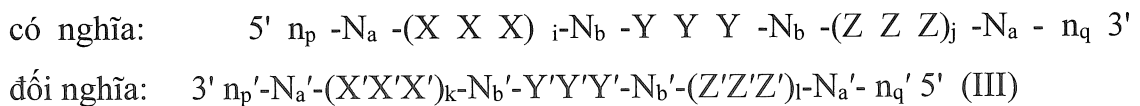
có nghĩa: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

đối nghĩa: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5' \text{ (III)}$

trong đó i, j, k, và l độc lập với nhau bằng 0 hoặc 1; mỗi n_p , n_q , và n_q' , có thể có mặt hoặc không có mặt, độc lập là nucleotit nhô ra; p, q, và q' độc lập với nhau bằng 0-6; $n_p' > 0$ và ít nhất một n_p' được liên kết với nucleotit liền kề nhờ liên kết phosphorothioat; mỗi N_a và N_a' độc lập là trình tự oligonucleotit bao gồm 0-25 nucleotit cải biến hoặc không được cải biến hoặc tổ hợp của chúng, mỗi trình tự bao gồm ít nhất hai nucleotit cải biến khác nhau; mỗi N_b và N_b' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-10 nucleotit cải biến hoặc không được cải biến hoặc tổ hợp của chúng; mỗi XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', và Z'Z'Z' độc lập là một motif gồm ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liền kề, và trong đó các cải biến này là các cải biến 2'-O-metyl or 2'-

flo; các cải biến ở N_b khác với cải biến ở Y và cải biến ở N_b' khác với cải biến ở Y' ; và trong đó sợi có nghĩa được tiếp hợp với ít nhất một phối tử, trong đó phối tử là một hoặc nhiều chất dẫn xuất GalNAc được gắn qua đoạn liên kết hóa trị một hoặc đoạn liên kết mạch nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tác nhân ARNi sợi kép có khả năng ức chế sự biểu hiện của PD-L1 ở tế bào, trong đó tác nhân ARNi sợi kép này bao gồm một sợi có nghĩa bổ trợ cho sợi đối nghĩa, trong đó sợi đối nghĩa bao gồm vùng bổ trợ cho phần ARNm mã hóa PD-L1, trong đó mỗi sợi có chiều dài khoảng 14 đến 30 nucleotit, trong đó tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (III):



trong đó i , j , k , và l độc lập với nhau bằng 0 hoặc 1; mỗi n_p , n_q , và n_q' , có thể có mặt hoặc không có mặt, độc lập là nucleotit nhô ra; p , q , và q' độc lập với nhau bằng 0-6; $n_p' > 0$ và ít nhất một n_p' được liên kết với nucleotit liền kề nhờ liên kết phosphorothioat; mỗi N_a và N_a' độc lập là trình tự oligonucleotit bao gồm 0-25 nucleotit cải biến hoặc không được cải biến hoặc tổ hợp của chúng, mỗi trình tự bao gồm ít nhất hai nucleotit cải biến khác nhau; mỗi N_b và N_b' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-10 nucleotit cải biến hoặc không được cải biến hoặc tổ hợp của chúng; mỗi XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', và Z'Z'Z' độc lập là một motif gồm ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liền kề, và trong đó các cải biến này là các cải biến 2'-O-metyl hoặc 2'-flo; các cải biến ở N_b khác với cải biến ở Y và cải biến ở N_b' khác với cải biến ở Y' ; trong đó sợi có nghĩa bao gồm ít nhất một liên kết phosphorothioat; và trong đó sợi có nghĩa được tiếp hợp với ít nhất một phối tử, trong đó phối tử là một hoặc nhiều chất dẫn xuất GalNAc được gắn qua đoạn liên kết hóa trị một hoặc đoạn liên kết mạch nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tác nhân ARNi sợi kép có khả năng ức chế sự biểu hiện của PD-L1 ở tế bào, trong đó tác nhân ARNi sợi kép này bao gồm một sợi có nghĩa bổ trợ cho sợi đối nghĩa, trong đó sợi đối nghĩa bao gồm vùng bổ trợ cho phần ARNm mã hóa PD-L1, trong đó mỗi sợi có chiều dài khoảng 14 đến 30 nucleotit, trong đó tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (III):

có nghĩa: 5' n_p - N_a -YYY- N_a - n_q 3'

đôi nghĩa: 3' n_p '- N_a '- Y'Y'Y'- N_a '- n_q ' 5' (IIIa)

trong đó mỗi n_p , n_q , và n_q' , có thể có mặt hoặc không có mặt, độc lập là nucleotit nhô ra; p , q , và q' độc lập với nhau bằng 0-6; $n_p' > 0$ và ít nhất một n_p' được liên kết với nucleotit liền kề nhờ liên kết phosphorothioat; mỗi N_a và N_a' độc lập là trình tự oligonucleotit bao gồm 0-25 nucleotit cải biến hoặc không được cải biến hoặc tổ hợp của chúng, mỗi trình tự bao gồm ít nhất hai nucleotit cải biến khác nhau; mỗi YYY và Y'Y'Y' độc lập là một motif gồm ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liền kề, và trong đó các cải biến này là các cải biến 2'-O-metyl or 2'-flo; trong đó sợi có nghĩa bao gồm ít nhất một liên kết phosphorothioat; và trong đó sợi có nghĩa được tiếp hợp với ít nhất một phối tử, trong đó phối tử là một hoặc nhiều chất dẫn xuất GalNAc được gắn qua đoạn liên kết hóa trị một hoặc đoạn liên kết mạch nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tác nhân ARNi sợi kép để ức chế sự biểu hiện của PD-L1, trong đó tác nhân ARNi sợi kép này bao gồm một sợi có nghĩa và một sợi đối nghĩa tạo thành vùng sợi kép, trong đó sợi có nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liền kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và sợi đối nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liền kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ trình tự nucleotit SEQ ID NO:2, trong đó về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa chứa cải biến được chọn từ cải biến 2'-O-metyl và cải biến 2'-flo trong đó sợi có nghĩa chứa hai liên kết phosphorothioat ở đầu tận cùng 5', trong đó về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa chứa cải biến được chọn từ cải biến 2'-O-metyl và cải biến 2'-flo trong đó sợi đối nghĩa chứa hai liên kết phosphorothioat ở đầu tận cùng 5' và hai liên kết liên nucleotit phosphorothioat ở đầu tận cùng 3', và trong đó sợi có nghĩa được tiếp hợp với một hoặc nhiều chất dẫn xuất GalNAc được gắn qua đoạn liên kết hóa trị một hoặc đoạn liên kết phân nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba ở đầu tận cùng 3'.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tác nhân axit ribonucleic sợi kép (ARNi) để ức chế sự biểu hiện của PD-L1, trong đó tác nhân ARNi sợi kép này bao gồm một sợi có nghĩa và một sợi đối nghĩa tạo thành vùng sợi kép, trong đó sợi có nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liền kề khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ các nucleotit 3221-3243, 351-372, 618-641, 618-639, 619-640, 620-641, 1093-1115,

1093-1114, 1094-1115, 1167-1188, 1293-1314, 1518-1539, 2103-2124, 2220-2261, 2220-2241, 2240-2261, 2648-2680, 2648-2669, 2658-2679, 2659-2680, 3143-3164, 3198-3219, 3221-3242, hoặc 3222-3243 của trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và sợi đối nghĩa bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kế khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ phần bổ trợ của trình tự nucleotit SEQ ID NO:2, trong đó về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa chứa cải biến nucleotit được chọn từ nhóm gồm cải biến 2'-O-metyl và cải biến 2'-flo trong đó sợi có nghĩa chứa hai liên kết phosphorothioat ở đầu tận cùng 5', trong đó về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa chứa một cải biến nucleotit được chọn từ nhóm gồm cải biến 2'-O-metyl và cải biến 2'-flo trong đó sợi đối nghĩa chứa hai liên kết phosphorothioat ở đầu tận cùng 5' và hai liên kết liên nucleotit phosphorothioat ở đầu tận cùng 3', và trong đó sợi có nghĩa được tiếp hợp với một hoặc nhiều chất dẫn xuất GalNAc được gắn qua một đoạn liên kết mạch nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba ở đầu tận cùng 3'.

Theo các phương án nhất định, tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa và tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa là các nucleotit cải biến. Theo các phương án nhất định, mỗi sợi có 19-30 nucleotit.

Theo các phương án nhất định, về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa được cải biến. Theo các phương án nhất định, về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa được cải biến. Theo các phương án nhất định, về cơ bản tất cả các nucleotit của cả hai sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa được cải biến.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tế bào chứa tác nhân ARNi như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vector mã hóa ít nhất một sợi của tác nhân ARNi, trong đó tác nhân ARNi chứa vùng bổ trợ cho ít nhất một phần ARNm mã hóa PD-L1, trong đó ARNi có chiều dài 30 cặp bazơ hoặc ít hơn, và trong đó tác nhân ARNi hướng đích ARNm để phân cắt. Theo các phương án nhất định, vùng bổ trợ có chiều dài ít nhất 15 nucleotit. Theo các phương án nhất định, vùng bổ trợ có chiều dài từ 19 đến 23 nucleotit.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tế bào chứa vector như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất được phẩm để ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 chứa tác nhân ARNi theo sáng chế. Theo một phương án, tác nhân ARNi được dùng trong dung dịch không phải dung dịch đệm. Theo các phương án nhất định, dung dịch không phải dung dịch đệm là nước muối hoặc nước. Theo các phương án khác, tác nhân RNAi được dùng trong dung dịch đệm. Theo các phương án như vậy, dung dịch đệm có thể bao gồm axetat, xitrat, prolamin, cacbonat, hoặc phosphat, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Ví dụ, dung dịch đệm có thể là nước muối đệm phosphat (PBS).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất được phẩm chứa tác nhân ARNi sợi kép theo sáng chế và một chế phẩm lipit. Theo các phương án nhất định, chế phẩm lipit chứa LNP. Theo các phương án nhất định, chế phẩm lipit chứa MC3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự biểu hiện PD-L1 ở tế bào, phương pháp này bao gồm các bước (a) cho tế bào tiếp xúc với tác nhân ARNi sợi kép theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế; và (b) duy trì tế bào được tạo ra ở bước (a) trong thời gian đủ để đạt được sự phân hủy của sản phẩm phiên mã ARNm của gen PD-L1, nhờ đó ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 ở tế bào. Theo các phương án nhất định, tế bào thuộc đối tượng, ví dụ, đối tượng người, ví dụ nam giới hoặc nữ giới. Theo các phương án được ưu tiên, sự biểu hiện PD-L1 được ức chế ít nhất 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%, hoặc đến dưới ngưỡng phát hiện của phương pháp thử nghiệm được sử dụng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn mà việc làm giảm sự biểu hiện PD-L1 là có lợi, phương pháp này bao gồm cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của tác nhân ARNi theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế, bằng cách đó điều trị cho đối tượng này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp phòng ngừa ít nhất một triệu chứng ở đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn mà việc làm giảm sự biểu hiện PD-L1 là có lợi, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng phòng ngừa của tác nhân ARNi theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế, nhờ đó phòng ngừa ít nhất một triệu chứng ở đối tượng mắc rối loạn mà việc làm giảm sự biểu hiện PD-L1 là có lợi.

Theo các phương án nhất định, việc dùng ARNi cho đối tượng gây ra sự suy giảm trong con đường truyền tín hiệu PD-L1. Theo các phương án nhất định, việc sử dụng ARNi gây ra sự giảm mức PD-L1 ở đối tượng, *chẳng hạn*, mức PD-L1 trong huyết thanh ở đối tượng.

Theo các phương án nhất định, bệnh có liên quan đến PD-L1 là bệnh lây nhiễm, như bệnh lây nhiễm nội bào mạn tính, *chẳng hạn*, bệnh nhiễm virus, *chẳng hạn*, bệnh nhiễm virus viêm gan, hoặc bệnh nhiễm khuẩn, *chẳng hạn*, bệnh nhiễm khuẩn lao.

Theo các phương án nhất định, bệnh có liên quan đến PD-L1 là bệnh ung thư, *chẳng hạn*, bệnh ung thư gan, *chẳng hạn*, caxinom tế bào gan.

Theo các phương án nhất định, sáng chế còn bao gồm việc cho đối tượng mắc bệnh có liên quan đến PD-L1 sử dụng tác nhân chống virus. Theo các phương án nhất định, tác nhân chống virus là nucleotit hoặc chất tương tự nucleosit. Theo các phương án nhất định, tác nhân chống virus dùng để điều trị nhiễm virus viêm gan, *chẳng hạn*, nhiễm HBV, nhiễm HDV. Theo các phương án nhất định, tác nhân chống virus không là tác nhân kích thích miễn dịch.

Theo các phương án nhất định, sáng chế còn bao gồm bước cho đối tượng mắc bệnh có liên quan đến PD-L1 sử dụng tác nhân hóa trị liệu.

Theo các phương án nhất định trong đó bệnh có liên quan đến PD-L1 là bệnh ung thư, đối tượng còn được điều trị bệnh ung thư. Theo các phương án nhất định, việc điều trị bệnh ung thư bao gồm phẫu thuật. Theo các phương án nhất định, việc điều trị bệnh ung thư bao gồm xạ trị. Theo các phương án nhất định, việc điều trị bệnh ung thư bao gồm sử dụng tác nhân hóa trị liệu.

Theo các phương án khác nhau, tác nhân ARNi được dùng ở liều lượng khoảng 0,01 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg hoặc khoảng 0,5 mg/kg đến khoảng 50 mg/kg. Theo một số phương án, tác nhân ARNi được dùng ở liều lượng khoảng 10 mg/kg đến khoảng 30 mg/kg. Theo các phương án nhất định, tác nhân ARNi được dùng ở liều lượng được chọn từ khoảng 0,5 mg/kg 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, và 30 mg/kg. Theo các phương án nhất định, tác nhân ARNi được dùng khoảng mỗi tuần một lần, mỗi tháng một lần, hai tháng một lần, hoặc một quý một lần (*nghĩa là*, cứ ba tháng một lần) ở liều lượng khoảng 0,1 mg/kg đến khoảng 5,0 mg/kg.

Theo các phương án nhất định, tác nhân ARNi được dùng cho đối tượng một tuần một lần. Theo các phương án nhất định, tác nhân ARNi được dùng cho đối tượng một tháng một lần. Theo các phương án nhất định, tác nhân ARNi được dùng một quý một lần (*nghĩa là*, ba tháng một lần).

Theo một số phương án, tác nhân ARNi được dùng dưới da cho đối tượng.

Theo các phương án khác nhau, phương pháp theo sáng chế còn bao gồm bước xác định mức PD-L1 ở đối tượng. Theo các phương án nhất định, việc giảm mức biểu hiện hoặc hoạt tính của con đường truyền tín hiệu PD-L1 chỉ ra rằng bệnh có liên quan đến PD-L1 đã được điều trị.

Theo các phương án khác nhau, dấu chuẩn đại diện của sự biểu hiện PD-L1 được xác định. Ví dụ, trong điều trị bệnh lây nhiễm, sự có mặt của mầm bệnh được phát hiện, *chẳng hạn*, protein hoặc axit nucleic từ mầm bệnh, *chẳng hạn*, HBsAg, HBeAg, HBcccDNA. Theo các phương án nhất định, chất chỉ thị của đáp ứng miễn dịch chống lại mầm bệnh được phát hiện, *chẳng hạn*, kháng thể kháng HBs. Theo các phương án nhất định, sự thay đổi, tốt hơn là sự thay đổi thích đáng về mặt lâm sàng đối với dấu chuẩn đại diện cho thấy việc điều trị hữu hiệu đối với sự lây nhiễm. Trong điều trị bệnh ung thư, việc chứng minh sự ổn định hoặc giảm tải lượng khối u bằng cách sử dụng tiêu chí RECIST có thể được sử dụng làm dấu chuẩn đại diện cho sự giảm biểu hiện PD-L1 hoặc hoạt tính PD-L1.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ thể hiện việc truyền tín hiệu PD-L1 giữa tế bào trình diện kháng nguyên và tế bào T.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các chế phẩm ARNi tác động đến sự phân cắt qua trung gian phức bất hoạt cảm ứng bằng ARN (RISC) của các sản phẩm phiên mã ARN của gen phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-L1). Gen này có thể nằm trong tế bào, *chẳng hạn*, tế bào bên trong đối tượng, như người. Việc sử dụng các ARNi này cho phép phá hủy hướng đích ARNm của gen tương ứng (gen PD-L1) ở động vật có vú.

ARNi theo sáng chế được thiết kế để hướng đích gen PD-L1 ở người, bao gồm các phần của gen mà được bảo toàn trong trình tự gen tương đồng PD-L1 của các loài động vật có vú khác. Không nhằm giới hạn bởi nguyên lý, tin rằng tổ hợp hoặc tổ hợp phụ của các đặc tính nêu trên và các vị trí đích đặc hiệu hoặc các cải biến đặc hiệu trên các tác nhân ARNi này giúp cho ARNi theo sáng chế cải thiện hiệu quả, độ ổn định, hiệu lực, tính bền, và độ an toàn.

Vì vậy, sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị đối tượng mắc rối loạn mà việc ức chế hoặc làm giảm sự biểu hiện của gen PD-L1 là có lợi, *chẳng hạn*, bệnh có liên quan đến PD-L1, như bệnh lây nhiễm, *chẳng hạn*, nhiễm virus, *chẳng hạn*, nhiễm virus viêm gan, hoặc bệnh ung thư, như bệnh ung thư gan, *chẳng hạn*, caxinom tế bào gan, bằng cách sử dụng các chế phẩm ARNi mà tác động đến sự phân cắt qua trung gian phức bất hoạt cảm ứng bằng ARN (RISC) của các sản phẩm phiên mã ARN của gen PD-L1.

Cụ thể, các liều lượng rất thấp của ARNi theo sáng chế có thể gây ra ARN can thiệp (ARNi) một cách đặc hiệu và hiệu quả, tạo ra sự ức chế đáng kể sự biểu hiện của gen tương ứng (gen PD-L1).

ARNi theo sáng chế bao gồm một sợi ARN (sợi đối nghĩa) có một vùng có chiều dài khoảng 30 nucleotit hoặc ít hơn, *chẳng hạn*, có chiều dài 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, hoặc 21-22 nucleotit, vùng này về cơ bản hỗ trợ cho ít nhất một phần của sản phẩm phiên mã ARNm của gen PD-L1. Theo các phương án nhất định, ARNi theo sáng chế bao gồm một sợi ARN (sợi đối nghĩa) mà có thể có chiều dài lớn hơn, ví dụ có chiều dài lên tới 66 nucleotit, *chẳng hạn*, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 nucleotit với một vùng gồm ít nhất 19 nucleotit liên kề mà về cơ bản hỗ trợ cho ít nhất một phần của sản phẩm phiên mã ARNm của gen PD-L1. Các ARNi với các sợi đối nghĩa có chiều dài lớn hơn này tốt hơn là bao gồm sợi ARN thứ hai (sợi có nghĩa) có chiều dài 20-60 nucleotit trong đó các sợi có nghĩa và đối nghĩa tạo thành sợi kép gồm

18-30 nucleotit liên kề. Việc sử dụng các ARNi này cho phép phá hủy hướng đích ARNm của gen tương ứng (gen PD-L1) ở động vật có vú. Cụ thể, các liều lượng rất thấp của ARNi theo sáng chế có thể gây ra ARN can thiệp (ARNi) một cách đặc hiệu và hiệu quả, tạo ra sự ức chế đáng kể sự biểu hiện của gen tương ứng (gen PD-L1). Bằng cách sử dụng thử nghiệm *in vitro* và *in vivo*, tác giả sáng chế đã chứng minh được rằng ARNi hướng đích gen PD-L1 có thể gây ra ARNi, dẫn đến ức chế đáng kể sự biểu hiện của PD-L1, cũng như làm giảm quá trình truyền tín hiệu của con đường PD-L1 mà nó sẽ làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan đến bệnh có liên quan đến PD-L1, như bệnh lây nhiễm, *chẳng hạn*, bệnh nhiễm virus hoặc bệnh lây nhiễm nội bào mạn tính; hoặc bệnh ung thư. Vì vậy, các phương pháp và chế phẩm bao gồm các ARNi này là hữu hiệu để điều trị cho đối tượng mắc bệnh có liên quan đến PD-L1, như bệnh lây nhiễm, *chẳng hạn*, bệnh nhiễm virus hoặc bệnh lây nhiễm nội bào mạn tính, hoặc bệnh ung thư. Phương pháp và chế phẩm trong bản mô tả này là hữu hiệu để làm giảm mức PD-L1 ở đối tượng, *chẳng hạn*, mức PD-L1 có trong gan ở đối tượng, đặc biệt là ở đối tượng mắc bệnh lây nhiễm nội bào mạn tính, đặc biệt là nhiễm viêm gan mạn tính, hoặc khối u.

Phần mô tả chi tiết dưới đây bộc lộ cách tạo ra và sử dụng chế phẩm chứa ARNi để ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 cũng như chế phẩm, sử dụng, và phương pháp điều trị cho đối tượng mắc bệnh và rối loạn mà việc làm giảm sự biểu hiện của gen PD-L1 là có lợi.

I. Phân định nghĩa

Để sáng chế có thể được dễ hiểu hơn, một số thuật ngữ được định nghĩa trước tiên. Ngoài ra, cần chú ý rằng bất cứ khi nào trị số hoặc khoảng trị số của một thông số được chỉ ra, dự định rằng các trị số và khoảng nằm giữa các trị số đã chỉ ra cũng được dự định trở thành một phần của sáng chế.

Các mạo từ "một" được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ một hoặc nhiều hơn một (nghĩa là, ít nhất là một) bỏ ngữ theo ngữ pháp của mạo từ này. Để làm ví dụ, "một yếu tố" có nghĩa là một yếu tố hoặc nhiều hơn một yếu tố, *chẳng hạn*, nhiều yếu tố.

Thuật ngữ "bao gồm" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa, và được dùng thay thế cho, cụm từ "bao gồm nhưng không giới hạn ở".

Thuật ngữ "hoặc" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa, và được dùng thay thế cho, thuật ngữ "và/hoặc," trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ ra theo cách khác. Ví dụ, “sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa” được hiểu như là “sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa hoặc sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa.”

Thuật ngữ “khoảng” được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa thuộc khoảng dung sai điển hình trong lĩnh vực. Ví dụ, “khoảng” có thể được hiểu là độ lệch chuẩn bằng khoảng 2 từ giá trị trung bình. Theo các phương án nhất định, khoảng có nghĩa là $\pm 10\%$. Theo các phương án nhất định, khoảng có nghĩa là $\pm 5\%$. Khi khoảng có mặt trước một dãy các số hoặc một khoảng, cần hiểu rằng “khoảng” có thể bỏ nghĩa cho mỗi số trong các số thuộc dãy này hoặc khoảng này.

Thuật ngữ “ít nhất” đứng trước một số hoặc một dãy các số được hiểu là bao gồm số liền kề với thuật ngữ “ít nhất”, và tất cả các số hoặc các số nguyên tiếp theo mà về logic có thể được bao hàm, như được thấy rõ từ ngữ cảnh. Ví dụ, số nucleotit trong phân tử axit nucleic cần phải là một số nguyên. Ví dụ, “ít nhất 18 nucleotit của phân tử axit nucleic gồm 21 nucleotit” có nghĩa là 18, 19, 20, hoặc 21 nucleotit có đặc tính đã được chỉ ra. Khi ít nhất có mặt trước một dãy các số hoặc một khoảng, cần hiểu rằng “ít nhất” có thể bỏ nghĩa cho mỗi số trong các số thuộc dãy này hoặc khoảng này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “không nhiều hơn” hoặc “ít hơn” có nghĩa là giá trị liền kề với cụm từ này và các giá trị hoặc các số nguyên thấp hơn theo logic, một cách hợp lý từ ngữ cảnh, đến 0. Ví dụ, sợi kép với phân nhô ra gồm “không nhiều hơn 2 nucleotit” có phân nhô ra gồm 2, 1, hoặc 0 nucleotit. Khi “không nhiều hơn” có mặt trước một dãy các số hoặc một khoảng, cần hiểu rằng “không nhiều hơn” có thể bỏ nghĩa cho mỗi số thuộc dãy này hoặc khoảng này.

Trong trường hợp xung đột giữa một trình tự và vị trí được chỉ ra của nó trên sản phẩm phiên mã hoặc một trình tự khác, trình tự nucleotit được nêu trong bản mô tả được ưu tiên.

Các phương án khác theo sáng chế có thể được kết hợp như được xác định bởi Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

“Phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1”, “PD-L1”, hoặc “CD274,” còn được biết đến như là B7-H; B7H1; PDL1; PD-L1; PDCD1L1; PDCD1LG1, B7 đồng đẳng 1, phối tử 1 PDCD1, và phối tử 1 chết tế bào theo chương trình, đã được chỉ ra là được biểu hiện cơ định ở các tế bào T và B, các DC, đại thực bào, tế bào gốc trung mô, và dưỡng bào bắt nguồn từ tủy xương thuộc chuột nhắt. Sự biểu hiện PD-L1 cũng được phát hiện ở nhiều tế bào không tạo huyết và được điều tiết tăng ở một số loại tế bào sau khi hoạt hóa. Nhờ sự kích thích bởi IFN- γ , PD-L1 được biểu hiện ở các tế bào T, tế bào NK, đại thực bào, DC tủy sống, tế bào B, tế bào biểu mô, và tế bào nội mô mạch (Flies DB and Chen L (2007) *J Immunother.* 30 (3): 251-60). PD-L1 được biểu hiện đặc biệt ở đại thực bào. Các thông tin khác về PD-L1 được cung cấp, ví dụ trong cơ sở dữ liệu gen NCBI ở www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29126 (được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn tính đến ngày nộp đơn sáng chế này).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1” được sử dụng thay cho thuật ngữ “PD-L1” (và tùy ý bất kỳ một tên gọi khác được công nhận được liệt kê trên đây) dùng để chỉ gen xuất hiện trong tự nhiên mã hóa protein phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1. Axit amin và các trình tự mã hóa hoàn thiện của trình tự tham chiếu của gen PDL-1 ở người có thể được tìm thấy trong, ví dụ, số truy cập ngân hàng gen (GenBank Accession No.) GI: 390979638 (RefSeq Accession No. NM_001267706.1; SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2) và số truy cập ngân hàng gen GI: 292658763 (RefSeq Accession No. NM_014143.3; SEQ ID NO: 9 và 10). Các biến thể ghép nối khác được cung cấp, ví dụ, trong Grzywnowicz *et al.*, *PLoS One.* 2012;7:e35178 mà được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Các ortholog từ động vật có vú của gen PD-L1 ở người có thể được tìm thấy trong, ví dụ, GI: 755563510 (RefSeq Accession No. XM_006527249.2, chuột nhắt; SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4); GI: 672040129 (RefSeq Accession No. XM_006231248.2, chuột cống; SEQ ID NO:5 và SEQ ID NO:6); GenBank Accession Nos. GI: 544494555 (RefSeq Accession No. XM_005581779.1, khỉ cynomolgus; SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8).

Một số SNP xuất hiện trong tự nhiên là đã biết và có thể được tìm thấy trong, ví dụ, trong cơ sở dữ liệu SNP của NCBI ở www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=29126 (mà được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn tính từ ngày nộp đơn sáng chế này) có liệt kê các SNP ở PD-L1 ở

người. Theo các phương án được ưu tiên, các biến thể xuất hiện trong tự nhiên này được bao hàm trong phạm vi của trình tự gen PD-L1.

Các ví dụ khác về các trình tự PD-L1 ARNm là sẵn có bằng cách sử dụng các cơ sở dữ liệu có sẵn công khai, *chẳng hạn*, GenBank, UniProt, và OMIM.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “trình tự đích” dùng để chỉ phần tiếp giáp của trình tự nucleotit của phân tử ARNm được tạo thành trong quá trình phiên mã gen PD-L1, bao gồm ARNm mà là sản phẩm của quá trình xử lý ARN của sản phẩm phiên mã sơ cấp. Phần hướng đích của trình tự này sẽ có chiều dài ít nhất đủ để đóng vai trò làm chất nền cho sự phân cắt hướng ARNi ở hoặc ở gần phần của trình tự nucleotit của phân tử ARNm được tạo thành trong quá trình phiên mã gen PD-L1. Theo một phương án, trình tự đích thuộc vùng mã hóa protein của PD-L1.

Trình tự đích có thể có chiều dài từ khoảng 9-36 nucleotit, *chẳng hạn*, chiều dài khoảng 15-30 nucleotit. Ví dụ, trình tự đích có thể có chiều dài từ khoảng 15-30 nucleotit, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, hoặc 21-22 nucleotit. Các khoảng và các chiều dài giữa các khoảng và các chiều dài nêu trên cũng được dự tính là một phần của sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ “sợi bao gồm một trình tự” dùng để chỉ oligonucleotit bao gồm một mạch nucleotit được mô tả bởi trình tự được đề cập đến bằng cách sử dụng danh pháp nucleotit tiêu chuẩn.

Mỗi “G,” “C,” “A,” “T,” và “U” thường là chữ viết tắt của nucleotit chứa bazơ là guanin, xytosin, adenin, thymidin, và uraxil, tương ứng. Tuy nhiên, cần hiểu rằng thuật ngữ “ribonucleotit” hoặc “nucleotit” cũng có thể dùng để chỉ nucleotit cải biến, như được mô tả cụ thể dưới đây, hoặc gốc thay thế đại diện (xem bảng 2 *chẳng hạn*). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực nhận thức rõ ràng guanin, xytosin, adenin, và uraxil có thể được thay thế bởi các gốc khác mà không làm thay đổi đáng kể các đặc tính ghép đôi bazơ của oligonucleotit bao gồm nucleotit mang gốc thay thế này. Ví dụ,

không nhằm giới hạn, nucleotit chứa inosin là bazơ của nó có thể ghép đôi bazơ với nucleotit chứa adenin, xytosin, hoặc uraxil. Vì vậy, nucleotit chứa uraxil, guanin, hoặc adenin có thể được thay thế trong các trình tự nucleotit của ARN sợi kép được đưa ra trong sáng chế bằng một nucleotit chứa, ví dụ, inosin. Trong một ví dụ khác, adenin và xytosin ở bất cứ nơi nào trong oligonucleotit có thể được thay bằng guanin và uraxil, tương ứng để tạo thành bazơ G-U Wobble ghép đôi với ARNm đích. Các trình tự chứa các gốc thay thế này là thích hợp đối với các chế phẩm và phương pháp được đề xuất trong sáng chế.

Thuật ngữ “ARNi”, “tác nhân ARNi,” và “tác nhân iARN”, “tác nhân ARN can thiệp” như được sử dụng thay cho nhau, dùng để chỉ tác nhân chứa ARN mà thuật ngữ này được định nghĩa trong bản mô tả này, và gây ra sự phân cắt hướng đích của sản phẩm phiên mã ARN *qua* con đường phức bất hoạt cảm ứng bằng ARNi (RISC). iARN nhằm phân hủy đặc hiệu trình tự của ARNm thông qua một quá trình được biết đến như là ARN can thiệp (ARNi). iARN điều biến, *chẳng hạn*, ức chế, sự biểu hiện của gen PD-L1 ở tế bào, *chẳng hạn*, tế bào bên trong đối tượng, như đối tượng có vú.

Theo một phương án, tác nhân ARNi theo sáng chế bao gồm một RNA sợi đơn có thể tương tác với trình tự ARN đích, *chẳng hạn*, trình tự ARNm đích PD-L1, để nhằm phân cắt ARN đích này. Không mong muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, tin rằng ARN sợi kép dài được đưa vào trong tế bào bị phân cắt thành ARN can thiệp ngắn (siARN) bằng endonucleaza typ III được biết đến như là Dicer (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, enzym giống ribonucleaza-III, phân cắt ARN sợi kép thành các ARN can thiệp ngắn gồm 19-23 cặp bazơ với hai phần nhô ra đặc trưng ở bazơ đầu 3' (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Các siARN sau đó được kết hợp vào phức bất hoạt cảm ứng bằng ARNi (RISC) trong đó một hoặc nhiều helicaza tháo xoắn sợi kép siARN, cho phép sợi đối nghĩa hỗ trợ hướng đến nhận biết đích (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). Bằng cách gắn kết với ARNm thích hợp, một hoặc nhiều endonucleaza trong RISC cắt đích này để gây ra sự bất hoạt (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Vì vậy, theo một khía cạnh sáng chế đề cập đến ARN sợi đơn (siARN) được tạo ra trong tế bào và thúc đẩy sự hình thành phức RISC để gây ra sự bất hoạt gen đích, *nghĩa là*, gen PD-L1. Vì vậy, thuật ngữ “siARN” trong bản mô tả này cũng được sử dụng để đề cập đến iARN như đã mô tả ở trên.

Theo các phương án nhất định, tác nhân ARNi có thể là siARN sợi đơn (ssARNi) mà được đưa vào tế bào hoặc cơ quan để ức chế ARNm đích. Tác nhân ARNi sợi đơn gắn kết với RISC endonucleaza, Argonaute 2, sau đó phân cắt ARNm đích. siARN sợi đơn thường có 15-30 nucleotit và được cải biến hóa học. Việc thiết kế và thử nghiệm siARN sợi đơn được mô tả trong patent Mỹ số 8,101,348 và trong tài liệu Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894, toàn bộ nội dung của mỗi trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Trình tự nucleotit đối nghĩa bất kỳ trong số các trình tự nucleotit đối nghĩa được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng làm siARN sợi đơn như được mô tả trong bản mô tả này hoặc như được cải biến hóa học bằng các phương pháp được mô tả trong tài liệu Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894.

Theo các phương án nhất định, “iARN” đề dùng trong chế phẩm, ứng dụng, và phương pháp theo sáng chế là ARN sợi kép và trong bản mô tả này được dùng để chỉ “tác nhân ARNi sợi kép”, “phân tử ARN sợi kép (dsARN)”, “tác nhân ARN sợi kép” hoặc “ARN sợi kép”. Thuật ngữ “ARN sợi kép” dùng để chỉ phức hợp gồm phân tử axit ribonucleic, có cấu trúc sợi kép gồm hai sợi axit nucleic đối song song và về cơ bản hỗ trợ nhau, được đề cập đến như là có hướng “có nghĩa” và “đối nghĩa” đối với ARN đích, *nghĩa là*, gen PD-L1. Theo một số phương án của sáng chế, ARN sợi kép (ARN sợi kép) gây ra sự phân giải ARN đích, *chẳng hạn*, ARNm, thông qua cơ chế cơ chế bất hoạt gen sau phiên mã được đề cập đến trong bản mô tả này như là ARN can thiệp hoặc ARNi.

Nhìn chung, phần lớn các nucleotit của mỗi sợi thuộc phân tử ARN sợi kép là các ribonucleotit, nhưng như được mô tả cụ thể ở đây, mỗi sợi hoặc cả hai sợi cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều nucleotit không phải là ribonucleotit, *chẳng hạn*, deoxyribonucleotit hoặc nucleotit cải biến. Ngoài ra, như được sử dụng trong bản mô tả này, “iARN” có thể bao gồm ribonucleotit với các cải biến hóa học; iARN có thể bao gồm các cải biến đáng kể ở nhiều nucleotit. Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ “nucleotit cải biến” dùng để chỉ nucleotit có, một cách độc lập, gốc đường được cải biến, đoạn liên kết được cải biến trong phân tử nucleotit, hoặc nucleobazơ được cải biến, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Vì vậy, thuật ngữ nucleotit cải biến bao hàm cả sự thay thế, bổ sung hoặc loại bỏ của, *chẳng hạn*, nhóm chức hoặc nguyên tử, của đoạn liên kết trong phân tử nucleosit, các gốc đường, hoặc nucleobazơ. Các cải

biến thích hợp để dùng trong tác nhân theo sáng chế bao gồm tất cả các loại cải biến được bộc lộ trong bản mô tả này hoặc đã biết trong lĩnh vực. Các cải biến bất kỳ này, như được sử dụng trong phân tử loại siARN, được bao hàm bởi “iARN” hoặc “tác nhân ARNi” để dùng cho các mục đích nêu trong bản mô tả này và phần yêu cầu bảo hộ.

Vùng sợi kép có thể có chiều dài bất kỳ cho phép phân giải đặc hiệu ARN đích mong muốn thông qua con đường RISC, và có thể có chiều dài nằm trong khoảng từ 9 đến 36 cặp bazơ, *chẳng hạn*, chiều dài khoảng 15-30 cặp bazơ, ví dụ, chiều dài khoảng 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, hoặc 36 cặp bazơ, như chiều dài khoảng 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, hoặc 21-22 cặp bazơ. Các khoảng và các chiều dài giữa các khoảng và các chiều dài nêu trên cũng được dự tính là một phần của sáng chế.

Hai sợi hình thành cấu trúc sợi kép có thể là các phần khác nhau của một phân tử ARN lớn, hoặc chúng có thể là các phân tử ARN riêng rẽ. Khi hai sợi là một phần của một phân tử lớn, và do vậy được liên kết bởi một mạch nucleotit liên tục giữa đầu 3' của một sợi và đầu 5' của sợi tương ứng còn lại tạo thành cấu trúc sợi kép, mạch ARN liên kết được gọi là “vòng cặp tóc.” Vòng cặp tóc có thể bao gồm ít nhất một nucleotit chưa ghép đôi. Theo một số phương án, vòng cặp tóc có thể bao gồm ít nhất 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 23 nucleotit chưa ghép đôi hoặc nhiều hơn. Theo một số phương án, vòng cặp tóc có thể là 10 nucleotit hoặc ít hơn. Theo một số phương án, vòng cặp tóc có thể là 8 nucleotit chưa ghép đôi hoặc ít hơn. Theo một số phương án, vòng cặp tóc có thể là 4-10 nucleotit chưa ghép đôi. Theo một số phương án, vòng cặp tóc có thể là 4-8 nucleotit.

Khi hai sợi về cơ bản hỗ trợ của một ARN sợi kép được chứa trong các phân tử ARN riêng rẽ, các phân tử này không cần, nhưng có thể, được liên kết cộng hóa trị. Khi hai sợi này được liên kết cộng hóa trị bằng các cách khác ngoài mạch nucleotit liên tục giữa đầu 3' của một sợi và đầu 5' của sợi tương ứng còn lại tạo thành cấu trúc sợi kép,

cấu trúc liên kết được gọi là “đoạn liên kết.” Các sợi ARN có thể có số nucleotit giống nhau hoặc khác nhau. Số cặp bazơ tối đa là số nucleotit trong sợi ngắn nhất của ARN sợi kép trừ đi phần nhô ra bất kỳ mà có mặt trong sợi kép. Ngoài cấu trúc sợi kép, ARNi có thể bao gồm một hoặc nhiều nucleotit nhô ra.

Theo các phương án nhất định, tác nhân iARN theo sáng chế là ARN sợi kép, mỗi sợi trong sợi kép này bao gồm 19-23 nucleotit, mà tương tác với trình tự ARN đích, *chẳng hạn*, gen PD-L1, không mong muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, ARN sợi kép dài được đưa vào tế bào bị phân cắt thành siARN nhờ endonucleaza typ III được biết đến như là Dicer (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, enzym giống ribonucleaza-III, phân cắt ARN sợi kép thành các ARN can thiệp ngắn gồm 19-23 cặp bazơ với hai phần nhô ra đặc trưng ở bazơ đầu 3' (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Các siARN sau đó được kết hợp vào phức bất hoạt cảm ứng bằng ARNi (RISC) ở đó một hoặc nhiều helicaza sẽ tháo xoắn sợi kép siARN, cho phép sợi đối nghĩa hỗ trợ hướng đến nhận biết đích (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). Bằng cách gắn kết với ARNm thích hợp, một hoặc nhiều endonucleaza trong RISC phân cắt đích này để gây ra sự bất hoạt (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188).

Theo một số phương án, iARN theo sáng chế là ARN sợi kép gồm 24-30 nucleotit, hoặc thậm chí có thể dài hơn, *chẳng hạn*, 25-35, 27-53, hoặc 27-49 nucleotit, mà nó tương tác với trình tự ARN đích, *chẳng hạn*, trình tự ARNm đích trong PD-L1, để phân cắt ARN đích này. Không mong muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, ARN sợi kép dài được đưa vào tế bào được cắt thành siARN bằng endonucleaza typ III được biết đến như là Dicer (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, enzym giống ribonucleaza-III, phân cắt ARN sợi kép thành các ARN can thiệp ngắn gồm 19-23 cặp bazơ với hai phần nhô ra đặc trưng ở bazơ đầu 3' (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Tiếp theo, các siARN được kết hợp vào phức bất hoạt cảm ứng bằng ARNi (RISC) ở đó một hoặc nhiều helicaza sẽ tháo xoắn sợi kép siARN, cho phép sợi đối nghĩa hỗ trợ hướng đến nhận biết đích (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). Bằng cách gắn kết với ARNm thích hợp, một hoặc nhiều endonucleaza trong RISC cắt đích này để gây ra sự bất hoạt (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188).

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ “phần nucleotit nhô ra” dùng để chỉ ít nhất một nucleotit chưa ghép đôi mà nó nhô ra từ cấu trúc sợi kép của iARN sợi kép. Ví dụ, khi đầu 3' của một sợi của ARN sợi kép kéo dài vượt quá đầu 5' của sợi còn lại, hoặc *ngược lại*, một phần nucleotit nhô ra. ARN sợi kép có thể chứa phần nhô ra gồm ít nhất một nucleotit; theo cách khác phần nhô ra có thể bao gồm ít nhất hai nucleotit, ít nhất ba nucleotit, ít nhất bốn nucleotit, ít nhất năm nucleotit hoặc nhiều hơn. Phần nucleotit nhô ra có thể bao gồm hoặc chỉ bao gồm một nucleotit/chất tương tự nucleosit, bao gồm deoxynucleotit/nucleosit. Phần nhô ra có thể nằm trên sợi có nghĩa, sợi đối nghĩa, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Ngoài ra, nucleotit của phần nhô ra có thể có mặt ở đầu 5', đầu 3', hoặc cả hai đầu của sợi đối nghĩa hoặc sợi có nghĩa của ARN sợi kép.

Theo các phương án nhất định, sợi đối nghĩa của ARN sợi kép có 1-10 nucleotit, *chẳng hạn*, 0-3, 1-3, 2-4, 2-5, 4-10, 5-10, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 nucleotit, nhô ra ở đầu 3' hoặc đầu 5'. Theo các phương án nhất định, phần nhô ra trên sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa, hoặc cả hai, có thể bao gồm các đoạn kéo dài có chiều dài dài hơn 10 nucleotit, *chẳng hạn*, 1-30 nucleotit, 2-30 nucleotit, 10-30 nucleotit, hoặc 10-15 nucleotit. Theo các phương án nhất định, phần nhô ra kéo dài này nằm trên sợi có nghĩa của sợi kép. Theo các phương án nhất định, phần nhô ra kéo dài có mặt trên đầu 3' của sợi có nghĩa của sợi kép. Theo các phương án nhất định, phần nhô ra kéo dài có mặt trên đầu 5' của sợi có nghĩa của sợi kép. Theo các phương án nhất định, phần nhô ra kéo dài nằm trên sợi đối nghĩa của sợi kép. Theo các phương án nhất định, phần nhô ra kéo dài có mặt trên đầu 3' của sợi đối nghĩa của sợi kép. Theo các phương án nhất định, phần nhô ra kéo dài có mặt trên đầu 5' của sợi đối nghĩa của sợi kép. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều nucleotit trong phần nhô ra này được thay thế bằng nucleosit thiophosphat.

“Cùn” hoặc “đầu cùn” có nghĩa là không có nucleotit chưa ghép đôi nào pử đầu này của tác nhân ARNi sợi kép, *nghĩa là*, không có phần nucleotit nhô ra. Tác nhân ARNi sợi kép “đầu cùn” là có dạng sợi kép trên toàn bộ chiều dài của nó, *nghĩa là*, không có nucleotit nhô ra ở cả hai đầu của phân tử này. Tác nhân ARNi theo sáng chế bao gồm tác nhân ARNi không có nucleotit nhô ra ở một đầu (*nghĩa là*, các tác nhân với một đầu nhô ra và một đầu cùn) hoặc không có phần nucleotit nhô ra ở cả hai đầu.

Thuật ngữ “sợi đối nghĩa” hoặc “sợi dẫn” dùng để chỉ sợi của iARN, *chẳng hạn*, ARN sợi kép, mà bao gồm một vùng về cơ bản hỗ trợ cho trình tự đích, *chẳng hạn*, ARNm của PD-L1. Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ “vùng có tính hỗ trợ” dùng để chỉ vùng trên sợi đối nghĩa về cơ bản hỗ trợ cho trình tự, ví dụ trình tự đích, *chẳng hạn*, trình tự nucleotit của PD-L1, như được định nghĩa trong bản mô tả. Khi vùng hỗ trợ không hoàn toàn hỗ trợ cho trình tự đích, sự không hợp đôi có thể xảy ra trong các vùng bên trong hoặc tận cùng của phân tử. Thông thường, sự không hợp đôi hay gặp nhất là ở các vùng đầu tận cùng, *chẳng hạn*, trong phạm vi 5, 4, 3, 2, hoặc 1 nucleotit của đầu 5’ hoặc đầu 3’ của iARN. Theo một số phương án, tác nhân ARNi sợi kép theo sáng chế bao gồm sự không hợp đôi nucleotit trong sợi đối nghĩa. Theo một số phương án, tác nhân ARNi sợi kép theo sáng chế bao gồm sự không hợp đôi nucleotit trong sợi có nghĩa. Theo một số phương án, sự không hợp đôi nucleotit nằm trong phạm vi, ví dụ, 5, 4, 3, 2, hoặc 1 nucleotit từ đầu 3’ của iARN. Theo một phương án khác, sự không hợp đôi nucleotit là ở, ví dụ, nucleotit đầu tận cùng 3’ của iARN.

Thuật ngữ “sợi có nghĩa” hoặc “sợi chò” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ sợi của iARN mà bao gồm vùng về cơ bản hỗ trợ cho một vùng của sợi đối nghĩa mà thuật ngữ đó đã được định nghĩa trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ “vùng phân cắt” dùng để chỉ vùng nằm ngay cạnh vị trí phân cắt. Vị trí phân cắt là vị trí mà ở đó sự phân cắt xảy ra. Theo một số phương án, vùng phân cắt chứa ba bazơ ở cả hai đầu của, và nằm ngay cạnh, vị trí phân cắt. Theo một số phương án, vùng phân cắt chứa hai bazơ ở cả hai đầu của, và nằm ngay cạnh, vị trí phân cắt. Theo một số phương án, vị trí phân cắt xảy ra cụ thể ở vị trí được giới hạn bởi nucleotit 10 và 11 của sợi đối nghĩa, và vùng phân cắt bao gồm các nucleotit 11, 12 và 13.

Như được sử dụng trong bản mô tả này và trừ khi được chỉ ra theo cách khác, thuật ngữ “hỗ trợ,” khi được sử dụng để mô tả trình tự nucleotit thứ nhất so với trình tự nucleotit thứ hai, dùng để chỉ khả năng của một oligonucleotit hoặc polynucleotit chứa trình tự nucleotit thứ nhất lai hóa và tạo thành cấu trúc sợi kép trong các điều kiện nhất định với một oligonucleotit hoặc polynucleotit chứa trình tự nucleotit thứ hai, như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Các điều kiện như vậy có thể là,

ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt, ở đó các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA, 50°C hoặc 70°C trong 12-16 giờ sau đó rửa (xem, *chẳng hạn*, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, *et al.* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Có thể áp dụng các điều kiện khác, như các điều kiện sinh lý thích đáng như có thể được bắt gặp bên trong cơ thể. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ có thể xác định được tập hợp các điều kiện thích hợp nhất cho thử nghiệm về tính bổ trợ của hai trình tự tùy theo ứng dụng sau cùng của nucleotit lai này.

Các trình tự bổ trợ trong một iARN, *chẳng hạn*, trong một ARN sợi kép như được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm ghép đôi bazơ của oligonucleotit hoặc polynucleotit chứa trình tự nucleotit thứ nhất với oligonucleotit hoặc polynucleotit chứa trình tự nucleotit thứ hai trên toàn bộ chiều dài của một hoặc cả hai trình tự nucleotit. Các trình tự như vậy trong bản mô tả này có thể được đề cập đến như là “hoàn toàn bổ trợ” đối với nhau. Tuy nhiên, khi trình tự thứ nhất được đề cập đến như là “bổ trợ về cơ bản” đối với trình tự thứ hai trong bản mô tả này, hai trình tự này có thể hoàn toàn bổ trợ, hoặc chúng có thể tạo thành một hoặc nhiều, nhưng thường không nhiều hơn 5, 4, 3, hoặc 2 cặp bazơ không hợp đôi nhờ sự lai hóa đối với sợi kép lên tới 30 cặp bazơ, đồng thời duy trì khả năng lai hóa trong điều kiện thích hợp nhất đối với ứng dụng cuối cùng của chúng, *chẳng hạn*, ức chế sự biểu hiện gen thông qua con đường RISC. Tuy nhiên, khi hai oligonucleotit được thiết kế, nhờ sự lai hóa, để tạo thành một hoặc nhiều phần nhô ra có dạng sợi đơn, các phần nhô ra này sẽ không được coi là không hợp đôi khi xác định tính bổ trợ. Ví dụ, ARN sợi kép chứa một oligonucleotit có chiều dài gồm 21 nucleotit và một oligonucleotit khác có chiều dài 23 nucleotit, trong đó oligonucleotit dài hơn chứa trình tự gồm 21 nucleotit mà hoàn toàn bổ trợ cho trình tự oligonucleotit ngắn hơn này, cũng có thể được đề cập đến như là “hoàn toàn bổ trợ” đối với các mục đích đã được mô tả trong bản mô tả này.

Các trình tự “bổ trợ”, như được sử dụng trong bản mô tả này cũng có thể bao gồm, hoặc hoàn toàn được tạo thành từ, các cặp bazơ không phải Watson-Crick hoặc các cặp bazơ được tạo thành từ nucleotit không tự nhiên và nucleotit cải biến, miễn là thỏa mãn các yêu cầu nêu trên đối với khả năng lai hóa của chúng. Các cặp bazơ không

phải Watson-Crick như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cặp bazơ G:U Wobble hoặc Hoogstein.

Thuật ngữ “bổ trợ”, “hoàn toàn bổ trợ” và “bổ trợ về cơ bản” trong bản mô tả này có thể được sử dụng đối với việc ghép ghép đôi bazơ giữa sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của một ARN sợi kép, hoặc giữa sợi đối nghĩa của một tác nhân ARNi sợi kép và một trình tự đích, như sẽ được hiểu từ ngữ cảnh ứng dụng của chúng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này polynucleotit mà “bổ trợ về cơ bản cho ít nhất một phần của” ARN thông tin (ARNm) dùng để chỉ polynucleotit bổ trợ về cơ bản cho một phần tiếp giáp của ARNm quan tâm (*chẳng hạn*, ARNm mã hóa gen PD-L1). Ví dụ, polynucleotit bổ trợ cho ít nhất một phần của ARNm của PD-L1 nếu trình tự này bổ trợ về cơ bản cho phần liên tục của ARNm mã hóa gen PD-L1.

Vì vậy, theo một số phương án, các polynucleotit sợi có nghĩa và polynucleotit sợi đối nghĩa được bộc lộ ở đây là hoàn toàn bổ trợ cho trình tự PD-L1 đích.

Theo các phương án khác, polynucleotit đối nghĩa được bộc lộ trong bản mô tả này bổ trợ về cơ bản cho trình tự PD-L1 đích và chứa trình tự nucleotit tiếp giáp mà nó bổ trợ ít nhất khoảng 80% trên toàn bộ chiều dài của nó cho vùng trình tự nucleotit tương đương của bất kỳ trong số SEQ ID NO:1, hoặc đoạn của bất kỳ trong số SEQ ID NO:1, như bổ trợ ít nhất khoảng 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc bổ trợ 100%.

Theo một số phương án, iARN theo sáng chế bao gồm một sợi có nghĩa mà bổ trợ về cơ bản cho polynucleotit đối nghĩa mà, polynucleotit này đến lượt nó, bổ trợ cho trình tự PD-L1 đích và bao gồm trình tự nucleotit tiếp giáp mà bổ trợ ít nhất khoảng 80% trên toàn bộ chiều dài của nó cho vùng trình tự nucleotit tương đương của sợi đối nghĩa bất kỳ trong số các sợi đối nghĩa trong bảng 3 hoặc bảng 5, hoặc đoạn của sợi đối nghĩa bất kỳ trong số các sợi đối nghĩa trong bảng 3 và bảng 5, như bổ trợ khoảng 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, hoặc bổ trợ 100%.

Theo một số phương án, iARN theo sáng chế bao gồm sợi đối nghĩa mà bổ trợ về cơ bản cho trình tự PD-L1 đích và bao gồm trình tự nucleotit tiếp giáp mà bổ trợ ít nhất 80% trên toàn bộ chiều dài của nó cho vùng trình tự nucleotit tương đương của sợi

có nghĩa bất kỳ trong số các sợi có nghĩa trong bảng 3 hoặc 5, hoặc đoạn của sợi có nghĩa bất kỳ trong số các sợi có nghĩa trong bảng 3 và 5, như bổ trợ khoảng 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% , hoặc bổ trợ 100%.

Theo một khía cạnh của sáng chế, tác nhân để dùng trong phương pháp và chế phẩm theo sáng chế là phân tử oligonucleotit đối nghĩa sợi đơn ức chế ARNm đích *nhờ* cơ chế ức chế đối nghĩa. Phân tử oligonucleotit đối nghĩa sợi đơn bổ trợ cho trình tự bên trong ARNm đích. Oligonucleotit đối nghĩa sợi đơn có thể ức chế sự dịch mã theo cách hóa học lượng pháp bằng cách cặp đôi bazơ với ARNm và gây trở ngại về mặt vật lý đối với bộ máy dịch mã, xem tài liệu Dias, N. *et al.*, (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. Phân tử oligonucleotit đối nghĩa sợi đơn có thể có chiều dài khoảng 14 đến khoảng 30 nucleotit và có trình tự bổ trợ cho trình tự đích. Ví dụ, phân tử oligonucleotit đối nghĩa sợi đơn có thể chứa trình tự là ít nhất 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 nucleotit liên kế hoặc nhiều hơn từ trình tự đối nghĩa bất kỳ được mô tả ở đây.

Cụm từ “cho tế bào tiếp xúc với iARN,” như ARN sợi kép, như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm bước cho tế bào tiếp xúc theo phương pháp bất kỳ có thể. Cho tế bào tiếp xúc với iARN bao gồm cho tế bào tiếp xúc *in vitro* với iARN hoặc cho tế bào tiếp xúc *in vivo* với iARN. Bước cho tiếp xúc có thể được thực hiện trực tiếp hoặc gián tiếp. Vì vậy, ví dụ, iARN có thể được cho tiếp xúc vật lý với tế bào bằng cách thực hiện riêng rẽ phương pháp này, hoặc theo cách khác, iARN có thể được đưa đến vị trí mà sẽ cho phép nó hoặc khiến cho nó sau đó đi đến tiếp xúc với tế bào.

Việc cho tế bào tiếp xúc *in vitro* có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách ủ tế bào với iARN. Việc cho tế bào tiếp xúc *in vivo* có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách tiêm iARN vào trong hoặc gần mô mà ở đó có tế bào, hoặc bằng cách tiêm iARN vào một khu vực khác, *chẳng hạn*, dòng máu hoặc khoảng không dưới da, sao cho tác nhân này sau đó sẽ đạt đến mô mà ở đó có mặt tế bào cần cho tiếp xúc. Ví dụ, iARN có thể chứa hoặc được kết hợp với phối tử, *chẳng hạn*, GalNAc, *chẳng hạn*, GalNAc3, mà hướng iARN đến vị trí quan tâm, *chẳng hạn*, gan. Cũng có thể sử dụng tổ hợp các phương pháp tiếp xúc *in vitro* và *in vivo*. Ví dụ, tế bào cũng có thể được tiếp xúc *in vitro* với iARN và sau đó được cấy ghép vào đối tượng.

Theo các phương án nhất định, cho tế bào tiếp xúc với iARN bao gồm “đưa” hoặc “phân phối iARN vào trong tế bào” bằng cách tạo điều kiện hoặc thực hiện sự hấp thu hoặc hấp thụ vào trong tế bào. Sự hấp thụ hoặc hấp thu của iARN có thể xảy ra nhờ các quá trình tế bào hoạt động hoặc khuếch tán không có sự trợ giúp, hoặc bởi các tác nhân hoặc thiết bị hỗ trợ. Việc đưa iARN vào tế bào có thể là *in vitro* hoặc *in vivo*. Ví dụ, để đưa vào *in vivo*, iARN có thể được tiêm vào vị trí mô hoặc được dùng toàn thân. Việc phân phối *in vivo* cũng có thể được thực hiện bởi hệ phân phối beta-glucan, các hệ phân phối được mô tả trong các patent Mỹ số 5,032,401 và 5,607,677, và Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 2005/0281781, toàn bộ nội dung của chúng được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Việc đưa vào tế bào *in vitro* bao gồm các phương pháp đã biết trong lĩnh vực như chuyển gen bằng xung điện và chuyển gen bằng liposom. Các phương pháp khác được mô tả dưới đây hoặc đã được biết đến trong lĩnh vực.

Thuật ngữ “hạt nano lipid” hoặc “LNP” là một túi gồm một lớp lipid chứa phân tử có được tính bên trong, như phân tử axit nucleic, *chẳng hạn*, iARN hoặc plasmit mà từ đó iARN được phiên mã. LNP được mô tả trong, ví dụ, các patent Mỹ số 6,858,225, 6,815,432, 8,158,601, và 8,058,069, toàn bộ nội dung của chúng được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này “đối tượng” là động vật, như động vật có vú, bao gồm động vật linh trưởng (như người, động vật linh trưởng không phải người, *chẳng hạn*, khỉ, và tinh tinh), động vật không thuộc động vật linh trưởng (như bò, lợn, lạc đà, lạc đà không bướu, ngựa, dê, thỏ, cừu, chuột hamster, chuột lang, mèo, chó, chuột cống, chuột nhắt, ngựa, và cá voi), hoặc chim (*chẳng hạn*, vịt hoặc ngỗng) mà biểu hiện gen đích, hoặc nội sinh hoặc khác loại, khi trình tự gen đích có tính hỗ trợ đủ đối với tác nhân iARN để thúc đẩy sự phá vỡ đích. Theo các phương án nhất định, đối tượng là người, như người đang được điều trị hoặc được đánh giá là mắc bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh mà việc làm giảm sự biểu hiện hoặc sự sao chép gen PD-L1 là có lợi; người có nguy cơ mắc bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh mà việc làm giảm sự biểu hiện gen PD-L1 là có lợi; người mắc bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh mà việc làm giảm sự biểu hiện gen PD-L1 là có lợi; or người đang được điều trị bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh mà việc làm giảm sự biểu hiện gen PD-L1 là có lợi, như được mô

tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, đối tượng là nam giới. Theo các phương án khác, đối tượng là nữ giới.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ “việc điều trị” hoặc “điều trị” dùng để chỉ kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, làm thuyên giảm hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan đến sự biểu hiện gen PD-L1 hoặc sự sản sinh protein PD-L1, *chẳng hạn*, sự lây nhiễm, đặc biệt là lây nhiễm nội bào mạn tính, *chẳng hạn*, nhiễm virus mạn tính, hoặc bệnh ung thư. “Điều trị” cũng có thể có nghĩa là kéo dài thời gian sống thêm so với thời gian sống được trông đợi khi không được điều trị. Điều trị có thể bao gồm phòng ngừa sự phát triển của tình trạng bệnh tật xảy ra đồng thời, *chẳng hạn*, làm giảm tổn thương gan ở đối tượng bị nhiễm viêm gan.

Thuật ngữ “làm giảm” trong trường hợp mức độ biểu hiện gen PD-L1n hoặc sự sản sinh protein PD-L1 ở đối tượng, hoặc dấu chuẩn bệnh hoặc triệu chứng dùng để chỉ sự giảm có nghĩa thống kê đối với các mức độ này. Mức giảm có thể là, ví dụ, ít nhất 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95%, so với mẫu đối chứng thích hợp, hoặc giảm đến dưới mức phát hiện đối với phương pháp phát hiện. Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của đích được bình thường hóa, *nghĩa là*, giảm đến mức được chấp nhận là thuộc khoảng bình thường đối với cá nhân không bị mắc rối loạn này. Theo các phương án nhất định, các phương pháp bao gồm bước ức chế thích đáng về mặt lâm sàng sự biểu hiện của PD-L1, *chẳng hạn* như được chứng minh bởi kết quả lâm sàng thích đáng sau khi điều trị đối tượng bằng tác nhân để làm giảm sự biểu hiện của PD-L1.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh có liên quan đến phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1” hoặc “bệnh có liên quan đến PD-L1” là bệnh hoặc rối loạn mà được gây ra bởi, hoặc đi kèm với sự biểu hiện gen PD-L1 hoặc sự sản sinh protein PD-L1. Thuật ngữ “bệnh có liên quan đến PD-L1” bao gồm bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh mà việc làm giảm sự biểu hiện, sự sao chép hoặc hoạt tính protein gen PD-L1 là có lợi. Ví dụ không giới hạn về các bệnh có liên quan đến PD-L1 bao gồm, ví dụ, bệnh lây nhiễm, đặc biệt là bệnh lây nhiễm nội bào mạn tính, *chẳng hạn*, nhiễm virus, *chẳng hạn*, bệnh nhiễm virus viêm gan, hoặc bệnh ung thư.

Theo các phương án nhất định, bệnh có liên quan đến PD-L1 là bệnh lây nhiễm, đặc biệt là lây nhiễm nội bào mạn tính, *chẳng hạn*, nhiễm virus, *chẳng hạn*, nhiễm virus viêm gan, *chẳng hạn*, nhiễm virus viêm gan B hoặc nhiễm virus viêm gan D. Theo các phương án nhất định, bệnh lây nhiễm là bệnh nhiễm khuẩn mạn tính, *chẳng hạn*, bệnh lao. Theo các phương án nhất định, bệnh có liên quan đến PD-L1 là bệnh ung thư, đặc biệt là bệnh ung thư gan, *chẳng hạn*, caxinom tế bào gan (HCC).

“Lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu” như được sử dụng trong bản mô tả này được dự định bao gồm lượng iARN mà, khi được dùng cho bệnh nhân để điều trị cho đối tượng bị lây nhiễm, đặc biệt là bệnh lây nhiễm nội bào mạn tính, hoặc bệnh ung thư, hoặc các bệnh khác có liên quan đến PD-L1, là đủ để điều trị hữu hiệu bệnh này (*chẳng hạn*, bằng cách giảm bớt, cải thiện hoặc duy trì bệnh hiện có hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh hoặc các tình trạng bệnh xuất hiện đồng thời có liên quan đến bệnh này). “Lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu” có thể thay đổi tùy thuộc vào iARN, cách dùng, bệnh và mức độ nghiêm trọng của nó và tiền sử, tuổi tác, thể trọng, tiền sử gia đình, bản chất di truyền, giai đoạn của quá trình bệnh lý được gây ra bởi sự biểu hiện gen PD-L1, các phương pháp điều trị trước đó hoặc đồng thời, nếu có, và các đặc tính riêng khác của bệnh nhân được điều trị.

“Lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu” cũng bao gồm lượng iARN mà tạo ra một số tác dụng cục bộ hoặc toàn thân mong muốn ở tỷ lệ lợi ích/nguy cơ chấp nhận được có thể áp dụng cho phương pháp điều trị bất kỳ. iARN được dùng trong các phương pháp theo sáng chế có thể được dùng với lượng đủ để tạo ra tỷ lệ lợi ích/nguy cơ chấp nhận được có thể được áp dụng cho phương pháp điều trị này. Lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu bao gồm lượng mà tạo ra sự thay đổi hoặc sự ổn định thích đáng về mặt lâm sàng, nếu thích hợp, của chỉ thị của bệnh hoặc tình trạng bệnh.

Cụm từ "được dùng" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ các hợp chất, nguyên liệu, chế phẩm và/hoặc các dạng liều mà, trong phạm vi của đánh giá y tế hợp lý, thích hợp để dùng tiếp xúc với mô của đối tượng người và đối tượng động vật mà không gây độc hại, kích ứng, phản ứng dị ứng quá mức hoặc không gây ra vấn đề hoặc biến chứng khác, tương xứng với tỷ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý.

Cụm từ "chất mang dược dụng" như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là nguyên liệu, thành phần hoặc chất dẫn thuốc dược dụng, như chất độn lỏng hoặc rắn, chất pha loãng, tá dược, chất trợ giúp trong quá trình sản xuất (*chẳng hạn*, chất làm trơn, bột talc magie, canxi hoặc kẽm stearat, hoặc axit steric), hoặc nguyên liệu bao nang dung môi, tham gia vào việc mang hoặc vận chuyển hợp chất theo sáng chế từ một bộ phận, hoặc phần của cơ thể, đến một bộ phận khác, hoặc một phần khác của cơ thể. Mỗi chất mang cần phải "có thể chấp nhận được" theo nghĩa tương thích với các thành phần khác trong chế phẩm và không có hại cho đối tượng được điều trị. Một số ví dụ về các nguyên liệu có thể đóng vai trò làm chất mang dược dụng bao gồm: (1) đường, như lactoza, glucoza và sucroza; (2) tinh bột, như tinh bột ngô và tinh bột khoai tây; (3) xenluloza, và các dẫn xuất của nó, như natri carboxymetyl xenluloza, etyl xenluloza và xenluloza axetat; (4) tragacanth dạng bột; (5) malt; (6) gelatin; (7) tác nhân làm trơn, như magie stearat, natri lauryl sulfat và bột talc; (8) tá dược, như bơ cacao và sáp dùng cho thuốc đạn; (9) dầu, như dầu lạc, dầu hạt bông, dầu hương dương, dầu vừng, dầu oliu, dầu ngô và dầu đậu nành; (10) glycol, như propylen glycol; (11) polyol, như glyxerin, sorbitol, manitol và polyetylen glycol; (12) este, như etyl oleat và etyl laurat; (13) aga; (14) chất đệm, như magie hydroxit và nhôm hydroxit; (15) axit alginic; (16) nước không chứa chất gây sốt; (17) muối đẳng trương; (18) dung dịch Ringer; (19) rượu etylic; (20) dung dịch đệm pH; (21) polyeste, polycacbonat và/hoặc polyanhydrit; (22) chất tạo khối như polypeptit và axit amin (23) hợp phần huyết thanh, như albumin huyết thanh, HDL và LDL; và (22) các chất tương thích không độc khác được dùng trong chế phẩm dược.

Thuật ngữ "mẫu" như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm tập hợp các chất lỏng, tế bào, hoặc mô tương tự được phân lập từ đối tượng, cũng như chất lỏng, tế bào, hoặc mô có trong đối tượng. Ví dụ về dịch sinh học bao gồm máu, huyết thanh và màng thanh dịch, huyết tương, dịch não tủy, dịch mắt, bạch huyết, nước tiểu, nước bọt, và các dịch tương tự. Các mẫu mô có thể bao gồm các mẫu từ mô, cơ quan, hoặc các vùng cục bộ. Ví dụ, các mẫu có thể có nguồn gốc từ các cơ quan cụ thể, các phần của các cơ quan, hoặc dịch hoặc tế bào thuộc các cơ quan này. Theo các phương án nhất định, mẫu có thể có nguồn gốc từ gan (*chẳng hạn*, toàn bộ gan hoặc các hân nhất định của gan hoặc các loại tế bào nhất định thuộc gan, *chẳng hạn* như, tế bào gan). "Mẫu có

nguồn gốc từ đối tượng” có thể dùng để chỉ máu được lấy từ đối tượng, hoặc huyết tương có nguồn gốc từ đó. Theo các phương án nhất định khi phát hiện mức PD-L1, “mẫu” tốt hơn là dùng để chỉ mô hoặc dịch thể từ đối tượng mà ở đó PD-L1 có thể được phát hiện trước khi dùng tác nhân theo sáng chế, *chẳng hạn*, sinh thiết gan từ đối tượng bị nhiễm viêm gan, sinh thiết khối u. Ở các đối tượng nhất định, *chẳng hạn*, các đối tượng khỏe mạnh, mức PD-L1 có thể không thể phát hiện được trong một số dịch thể, loại tế bào, và mô.

I. iARN theo sáng chế

Sáng chế đề xuất iARN ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1. Theo các phương án được ưu tiên, iARN bao gồm các phân tử axit ribonucleic sợi kép (ARN sợi kép) để ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 ở tế bào, như tế bào bên trong đối tượng, *chẳng hạn*, động vật có vú, như người mắc bệnh có liên quan đến PD-L1, *chẳng hạn*, lây nhiễm mạn tính. Tác nhân ARNi sợi kép bao gồm một sợi đối nghĩa có vùng hỗ trợ mà hỗ trợ cho ít nhất một phần của ARNm được tạo thành trong quá trình biểu hiện của gen PD-L1. Vùng hỗ trợ có chiều dài khoảng 30 nucleotit hoặc ít hơn (*chẳng hạn*, chiều dài khoảng 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, hoặc 18 nucleotit hoặc ít hơn). Bằng cách tiếp xúc với tế bào biểu hiện gen PD-L1, iARN ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 (*chẳng hạn*, gen PD-L1 ở người, động vật linh trưởng, động vật không thuộc động vật linh trưởng, hoặc chim) ít nhất khoảng 20%, tốt hơn là ức chế ít nhất 30%, như được đánh giá bởi, ví dụ, phương pháp PCR hoặc dựa trên ADN phân nhánh (bADN), hoặc bởi phương pháp dựa trên protein, như bằng cách phân tích miễn dịch huỳnh quang, có sử dụng, ví dụ, các kỹ thuật thấm tách western hoặc đếm tế bào trong dòng chảy. Theo các phương án được ưu tiên, sự ức chế biểu hiện được xác định bởi phương pháp qPCR được nêu trong phần ví dụ, *chẳng hạn*, ở nồng độ sợi kép là 10 nM. Mức giảm có thể được so sánh với, ví dụ, mẫu đối chứng thích hợp có thật trước đây hoặc mẫu đối chứng quần thể gom lại.

ARN sợi kép bao gồm hai sợi ARN hỗ trợ và lai hóa để tạo thành cấu trúc sợi kép trong các điều kiện mà trong đó ARN sợi kép này sẽ được sử dụng. Một sợi của ARN sợi kép (sợi đối nghĩa) bao gồm vùng hỗ trợ mà nó hỗ trợ về cơ bản, và nói chung hoàn toàn hỗ trợ, cho trình tự đích. Trình tự đích có thể có nguồn gốc từ trình tự của

ARNm được tạo thành trong quá trình biểu hiện của gen PD-L1. Sợi còn lại (sợi có nghĩa) bao gồm vùng hỗ trợ cho sợi đối nghĩa, sao cho hai sợi này lai hóa và tạo thành một cấu trúc sợi kép khi được kết hợp trong các điều kiện thích hợp. Như được mô tả ở các nơi khác trong bản mô tả này và như đã biết đến trước đây, trình tự hỗ trợ của ARN sợi kép cũng có thể được hạn chế ở các vùng tự hỗ trợ của một phân tử axit nucleic đơn lẻ, trái ngược với việc thuộc các oligonucleotit riêng biệt.

Nhìn chung, cấu trúc sợi kép có chiều dài khoảng 15 đến 30 cặp bazơ, *chẳng hạn*, có chiều dài 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, hoặc 21-22 cặp bazơ. Các khoảng và các chiều dài giữa các khoảng và các chiều dài nêu trên cũng được dự tính là một phần của sáng chế.

Tương tự, vùng hỗ trợ cho trình tự đích có chiều dài khoảng 15 đến 30 nucleotit, *chẳng hạn*, có chiều dài 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, hoặc 21-22 nucleotit. Các khoảng và các chiều dài giữa các khoảng và các chiều dài nêu trên cũng được dự tính là một phần của sáng chế.

Theo một số phương án, ARN sợi kép có chiều dài khoảng 15 đến 23 nucleotit, hoặc chiều dài khoảng 25 đến 30 nucleotit. Nhìn chung, ARN sợi kép đủ dài để đóng vai trò làm cơ chất cho enzym Dicer. Ví dụ, đã biết trong lĩnh vực rằng ARN sợi kép có chiều dài dài hơn khoảng 21-23 nucleotit có thể đóng vai trò làm cơ chất cho Dicer. Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận thấy rằng, vùng ARN được hướng đích để phân cắt sẽ thường là một phần của phân tử ARN lớn hơn, thường là phân tử ARNm. Nếu thích hợp, một “phần” của đích ARNm là trình tự liền kề của đích ARNm có độ

dài đủ để cho phép nó trở thành cơ chất để phân cắt trực tiếp bằng ARNi (nghĩa là, phân cắt qua con đường RISC).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cũng sẽ nhận ra rằng vùng sợi kép là phần chức năng chính của ARN sợi kép, *chẳng hạn*, vùng sợi kép gồm khoảng 9 đến khoảng 36 cặp bazơ, *chẳng hạn*, 10-36, 11-36, 12-36, 13-36, 14-36, 15-36, 9-35, 10-35, 11-35, 12-35, 13-35, 14-35, 15-35, 9-34, 10-34, 11-34, 12-34, 13-34, 14-34, 15-34, 9-33, 10-33, 11-33, 12-33, 13-33, 14-33, 15-33, 9-32, 10-32, 11-32, 12-32, 13-32, 14-32, 15-32, 9-31, 10-31, 11-31, 12-31, 13-32, 14-31, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, hoặc 21-22 cặp bazơ. Vì vậy, theo một phương án, trong phạm vi mà nó bị xử lý thành sợi kép chức năng, gồm *chẳng hạn*, 15-30 cặp bazơ, mà hướng đích ARN mong muốn để phân cắt, phân tử ARN hoặc phức hợp gồm các phân tử ARN có một vùng sợi kép lớn hơn 30 cặp bazơ là ARN sợi kép. Vì vậy, chuyên gia trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng theo một phương án, miARN là ARN sợi kép. Theo một phương án khác, ARN sợi kép không phải là miARN thường xuất hiện trong tự nhiên. Theo một phương án khác, tác nhân iARN hữu hiệu để hướng đích sự biểu hiện gen PD-L1 không được tạo ra trong tế bào đích bằng cách phân cắt ARN sợi kép lớn hơn.

ARN sợi kép như được mô tả trong bản mô tả này còn có thể bao gồm một hoặc nhiều nucleotit sợi đơn nhô ra *chẳng hạn*, 1-4, 2-4, 1-3, 2-3, 1, 2, 3, hoặc 4 nucleotit. ARN sợi kép có ít nhất một nucleotit nhô ra có thể có đặc tính ức chế tốt hơn so với các bản sao đầu cùn của chúng. Phần nucleotit nhô ra có thể bao gồm hoặc chỉ bao gồm một nucleotit/chất tương tự nucleosit, bao gồm deoxynucleotit/nucleosit. Phần nhô ra có thể nằm trên sợi có nghĩa, sợi đối nghĩa, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Ngoài ra, nucleotit của phần nhô ra có thể có mặt ở đầu 5', đầu 3', hoặc cả hai đầu của sợi đối nghĩa hoặc sợi có nghĩa của ARN sợi kép.

ARN sợi kép có thể được tổng hợp bằng các phương pháp tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực như được mô tả kỹ hơn dưới đây, *chẳng hạn*, bằng cách sử dụng các chất

tổng hợp ADN tự động, như các chất tổng hợp sẵn có trên thị trường từ, ví dụ, Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

Hợp chất ARN sợi kép theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách sử dụng quy trình hai bước. Trước tiên, các sợi riêng biệt của phân tử ARN sợi kép được điều chế riêng rẽ. Sau đó, các sợi thành phần được bắt cặp. Các sợi riêng biệt của hợp chất siARN có thể được điều chế bằng cách sử dụng quá trình tổng hợp hữu cơ pha dung dịch hoặc pha rắn hoặc cả hai. Quá trình tổng hợp hữu cơ có lợi ở chỗ các sợi oligonucleotit chứa các nucleotit không có trong tự nhiên hoặc được cải biến có thể được điều chế một cách dễ dàng. Tương tự, oligonucleotit sợi đơn theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách sử dụng quá trình tổng hợp hữu cơ pha dung dịch hoặc pha rắn hoặc cả hai.

Theo một khía cạnh, ARN sợi kép theo sáng chế bao gồm ít nhất hai trình tự nucleotit, trình tự có nghĩa và trình tự đối nghĩa. Sợi có nghĩa được chọn từ nhóm gồm các trình tự được đưa ra trong bảng 3 và 5, và sợi đối nghĩa tương ứng của sợi có nghĩa được chọn từ nhóm gồm các trình tự ở bảng 3 và 5. Theo khía cạnh này, một trong hai trình tự này hỗ trợ cho trình tự còn lại trong hai trình tự, với một trong các trình tự hỗ trợ về cơ bản cho trình tự của ARNm được tạo ra trong quá trình biểu hiện của gen PD-L1. Như vậy, theo khía cạnh này, ARN sợi kép sẽ bao gồm hai oligonucleotit, mà ở đó một oligonucleotit được mô tả là sợi có nghĩa trong bảng 3 hoặc 5, và oligonucleotit thứ hai được mô tả là sợi đối nghĩa tương ứng của sợi có nghĩa trong bảng 3 hoặc 5. Theo các phương án nhất định, các trình tự về cơ bản hỗ trợ của ARN sợi kép là các trình tự được bao gồm trên các oligonucleotit riêng biệt. Theo các phương án khác, các trình tự về cơ bản hỗ trợ của ARN sợi kép là các trình tự được bao gồm trên một oligonucleotit đơn lẻ.

Cần hiểu rằng, mặc dù các trình tự trong bảng 3 không được mô tả như các trình tự cải biến hoặc tiếp hợp, ARN của iARN theo sáng chế *chẳng hạn*, ARN sợi kép theo sáng chế, có thể bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong bảng 3, hoặc các trình tự trong bảng 5 mà được cải biến, hoặc các trình tự trong bảng 5 mà được tiếp hợp. Nói cách khác, sáng chế bao hàm ARN sợi kép ở bảng 3 và 5 mà chưa được cải

biến, chưa được tiếp hợp, được cải biến, hoặc được tiếp hợp, như được mô tả trong bản mô tả này.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận thức rõ được rằng ARN sợi kép có cấu trúc sợi kép gồm từ khoảng 20 đến 23 cặp bazơ, *chẳng hạn*, 21, cặp bazơ được biểu dương do nó đặc biệt hữu hiệu trong việc gây ra ARN can thiệp (Elbashir *et al.*, *EMBO* 2001, 20:6877-6888). Tuy nhiên, những người khác đã nhận thấy rằng cấu trúc sợi kép ARN ngắn hơn hoặc dài hơn cũng có thể là hữu hiệu (Chu and Rana (2007) *RNA* 14:1714-1719; Kim *et al.* (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). Theo các phương án được mô tả trên đây, do bản chất của trình tự oligonucleotit được nêu trong bảng bất kỳ trong số các bảng 3 và 5, dsARN được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm ít nhất một sợi có chiều dài tối thiểu 21 nucleotit. Có thể dự đoán một cách hợp lý rằng các sợi kép ngắn hơn có một trong các trình tự nêu trong bảng 3 và 5 chỉ không có một vài nucleotit trên một hoặc hai đầu cũng có thể hữu hiệu so với ARN sợi kép được mô tả ở trên. Vì vậy, ARN sợi kép có trình tự gồm ít nhất 15, 16, 17, 18, 19, 20 nucleotit liên kế hoặc nhiều hơn có nguồn gốc từ một trong các trình tự ở bảng 3 và 5, và khác nhau ở khả năng ức chế sự biểu hiện gen PD-L1 của chúng không lớn hơn khoảng 5, 10, 15, 20, 25, hoặc 30 % khả năng ức chế của ARN sợi kép chứa trình tự đầy đủ, được dự tính thuộc phạm vi của sáng chế này.

Ngoài ra, các ARN được đưa ra trong bảng 3 và 5 nhận biết các vị trí trên sản phẩm phiên mã PD-L1 mà dễ bị phân cắt qua trung gian RISC. Được hiểu theo cách thông thường, sáng chế còn đề xuất các iARN hướng đích một trong số các vị trí này. Như được sử dụng trong bản mô tả này, iARN được cho là hướng đích đến một vị trí cụ thể của sản phẩm phiên mã ARN nếu iARN này thúc đẩy sự phân cắt của sản phẩm phiên mã ở bất cứ nơi nào trong vị trí cụ thể này. iARN như vậy sẽ thường bao gồm ít nhất khoảng 15 nucleotit liên kế từ một trong số các trình tự được đưa ra trong bảng 3 và 5 liên kết với các trình tự nucleotit khác được lấy từ vùng liên kế với trình tự được chọn trong gen PD-L1.

Trong khi trình tự đích thường có chiều dài khoảng 15-30 nucleotit, có sự dao động lớn trong mức độ phù hợp của các trình tự cụ thể thuộc khoảng này đối với việc phân cắt trực tiếp ARN bất kỳ được nêu ra. Các gói phần mềm khác nhau và các hướng

dẫn đưa ra trong bản mô tả này đưa ra hướng dẫn để nhận biết các trình tự đích tối ưu đối với mục tiêu gen bất kỳ được đưa ra, nhưng phương pháp dựa trên kinh nghiệm cũng có thể được sử dụng trong đó “cửa sổ” hoặc “mặt nạ” với kích thước cho trước (ví dụ không giới hạn là 21 nucleotit) được đặt trên trình tự ARN đích này theo nghĩa đen hoặc nghĩa bóng (bao gồm, *chẳng hạn*, trong silico) để xác định các trình tự thuộc khoảng này mà có thể đóng vai trò làm trình tự đích. Bằng cách dịch chuyển trình tự “cửa sổ” này tăng dần từng nucleotit ngược chiều hoặc xuôi chiều vị trí trình tự đích ban đầu, trình tự đích tiềm năng tiếp theo có thể được xác định, trừ khi một bộ hoàn thiện các trình tự có thể có được nhận biết đối với kích thước đích bất kỳ đã nêu được lựa chọn. Quy trình này, kết hợp với tổng hợp hệ thống và thử nghiệm trình tự được nhận biết (bằng cách sử dụng các thử nghiệm như được mô tả trong bản mô tả này hoặc như được biết đến trong lĩnh vực hoặc được nêu trong bản mô tả này) để nhận biết các trình tự mà thực hiện tối ưu có thể nhận biết trình tự ARN mà khi hướng đích với tác nhân iARN, gây ra sự ức chế biểu hiện gen đích tốt nhất. Vì vậy, trong khi các trình tự được nhận dạng, ví dụ, trong bảng 3 và 5 là trình tự đích hữu hiệu, dự tính rằng việc tối ưu hóa tiếp hiệu lực ức chế có thể đạt được bằng cách “di chuyển dọc theo cửa sổ” từng nucleotit một ngược chiều hoặc xuôi chiều trình tự đã nêu để nhận dạng các trình tự có đặc tính ức chế bằng hoặc tốt hơn.

Ngoài ra, dự tính rằng đối với trình tự bất kỳ được nhận dạng, *chẳng hạn*, trong bảng 3 và 5, việc tối ưu hóa tiếp theo có thể đạt được một cách có hệ thống bằng cách bổ sung hoặc loại bỏ các nucleotit để tạo ra các trình tự dài hơn hoặc ngắn hơn và thử nghiệm các trình tự được tạo ra này bằng cách di chuyển cửa sổ ARN đích với kích cỡ dài hơn hoặc ngắn hơn này lên hoặc xuống tính từ điểm đó. Mặt khác, việc kết hợp phương pháp này để tạo ra các đích thích hợp mới với việc thử nghiệm tính hữu hiệu của iARN dựa trên các trình tự đích này trong thử nghiệm ức chế như đã biết trước đây hoặc như được mô tả trong bản mô tả này có thể làm cải thiện hơn nữa hiệu quả ức chế. Thêm nữa, các trình tự tối ưu như vậy có thể được điều chỉnh bằng cách, *chẳng hạn*, đưa vào các nucleotit cải biến như được mô tả trong bản mô tả này hoặc như đã biết trước đây, bổ sung hoặc thay đổi phần nhô ra, hoặc các cải biến khác đã biết trong lĩnh vực hoặc được thảo luận ở đây để tối ưu hóa hơn nữa phân tử này (*chẳng hạn*, làm gia tăng độ ổn định hoặc chu kỳ bán rã tuần hoàn trong huyết thanh, làm tăng độ ổn

định nhiệt, gia tăng sự phân phối qua màng, hướng đích đến các vị trí cụ thể hoặc loại tế bào cụ thể, gia tăng sự tương tác với các enzym trong các con đường bất hoạt, làm tăng sự giải phóng từ endosom) để dùng làm chất ức chế biểu hiện.

iARN như được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa một hoặc nhiều cặp bazơ nitơ không hợp đôi với trình tự đích. Theo một phương án, iARN như được mô tả trong bản mô tả này chứa không nhiều hơn 3 cặp bazơ nitơ không hợp đôi. Khi sợi đối nghĩa của iARN chứa các cặp bazơ nitơ không hợp đôi với trình tự đích, tốt hơn là vùng không hợp đôi được đặt ở trung tâm của vùng bổ trợ. Khi sợi đối nghĩa của iARN chứa các cặp bazơ nitơ không hợp đôi với trình tự đích, tốt hơn là cặp bazơ nitơ không hợp đôi này được giới hạn ở 5 nucleotit cuối cùng tính từ đầu 5' hoặc 3' của vùng bổ trợ. Ví dụ, đối với tác nhân iARN gồm 23 nucleotit, sợi mà bổ trợ cho vùng gen PD-L1 thường không chứa các cặp bazơ nitơ không hợp đôi bất kỳ trong 13 nucleotit trung tâm. Các phương pháp được mô tả ở đây hoặc các phương pháp đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng để xác định xem liệu iARN chứa cặp bazơ nitơ không hợp đôi với trình tự đích có hữu hiệu để ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 hay không. Việc xem xét hiệu lực của iARN với các cặp bazơ nitơ không hợp đôi trong việc ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 là quan trọng, đặc biệt là khi vùng bổ trợ cụ thể trong gen PD-L1 được biết là có biến thể trình tự đa hình trong quần thể này.

II. iARN cải biến theo sáng chế

Theo các phương án nhất định, ARN của iARN theo sáng chế *chẳng hạn*, ARN sợi kép, không được cải biến, và không bao gồm, *chẳng hạn*, các cải biến hóa học hoặc các thể tiếp hợp đã biết trong lĩnh vực và được mô tả ở đây. Theo các phương án khác, ARN của iARN theo sáng chế, *chẳng hạn*, ARN sợi kép, được cải biến hóa học để gia tăng độ ổn định hoặc các đặc tính có lợi khác. Theo các phương án nhất định của sáng chế, về cơ bản tất cả các nucleotit của iARN theo sáng chế được cải biến. Theo các phương án khác theo sáng chế, tất cả các nucleotit của iARN hoặc về cơ bản tất cả các nucleotit của iARN được cải biến, *nghĩa là*, không nhiều hơn 5, 4, 3, 2, hoặc 1 nucleotit không được cải biến có mặt trong một sợi của iARN này.

Các axit nucleic được đưa ra trong sáng chế có thể được tổng hợp hoặc cải biến bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, như các phương pháp được mô tả

trong “Current protocols in nucleic acid chemistry,” Beaucage, S.L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Các cải biến bao gồm, ví dụ, các cải biến đầu cuối, *chẳng hạn*, các cải biến ở đầu 5’ (phosphoryl hóa, tiếp hợp, các liên kết nghịch đảo) hoặc các cải biến ở đầu 3’ (tiếp hợp, nucleotit ADN, liên kết nghịch đảo, v.v.); các cải biến bazơ, *chẳng hạn*, thay thế bằng các bazơ ổn định, các bazơ làm mất ổn định, hoặc các bazơ mà cặp bazơ với danh mục mở rộng của các thành phần tham gia, loại bỏ các bazơ (nucleotit mất một bazơ), hoặc các bazơ được tiếp hợp; các cải biến ở đường (*chẳng hạn*, ở vị trí 2’ hoặc vị trí 4’) hoặc thay thế đường; hoặc các cải biến ở bộ khung, bao gồm cải biến hoặc thay thế của liên kết phosphodiester. Các ví dụ cụ thể về các hợp chất iARN có thể sử dụng trong các phương án được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở ARN chứa bộ khung được cải biến hoặc chứa các liên kết không có trong tự nhiên ở bên trong phân tử nucleosit. ARN có bộ khung được cải biến bao gồm, trong số các ARN khác, các ARN mà không có nguyên tử phospho trong bộ khung. Trong bản mô tả này, và như đôi khi được đề cập đến trong lĩnh vực, ARN được cải biến mà không có nguyên tử phospho trong bộ khung trong phân tử nucleosit của chúng cũng có thể được xem là các oligonucleosit. Theo một số phương án, iARN được cải biến sẽ có một nguyên tử phospho trong bộ khung nucleosit bên trong của nó.

Bộ khung ARN được cải biến, ví dụ, phosphorothioat, phosphorothioat không đối xứng, phosphorodithioat, phosphotrieste, aminoalkylphosphotrieste, methyl và các alkyl phosphonat khác bao gồm 3'-alkylen phosphonat và phosphonat không đối xứng, phosphinat, phosphoramidat bao gồm 3'-amino phosphoramidat và aminoalkylphosphoramidat, thionophosphoramidat, thionoalkylphosphonat, thionoalkylphosphotrieste, và boranophosphat có các liên kết 3'-5' bình thường, các chất tương tự được liên kết ở 2'-5' của chúng, và các chất có tính phân cực nghịch đảo trong đó các cặp đơn vị nucleosit liên kế được liên kết 3'-5' với 5'-3' hoặc 2'-5' với 5'-2'. Các muối, muối hỗn hợp và các dạng axit tự do khác nhau cũng được bao hàm.

Các Patent Mỹ điển hình nêu quy trình điều chế các liên kết chứa phospho nêu trên bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các patent Mỹ số 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,195; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677;

5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,316; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050; 6,028,188; 6,124,445; 6,160,109; 6,169,170; 6,172,209; 6,239,265; 6,277,603; 6,326,199; 6,346,614; 6,444,423; 6,531,590; 6,534,639; 6,608,035; 6,683,167; 6,858,715; 6,867,294; 6,878,805; 7,015,315; 7,041,816; 7,273,933; 7,321,029; và patent Mỹ số RE39464, toàn bộ nội dung của mỗi trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Bộ khung ARN được cải biến mà không chứa nguyên tử phospho trong đó có các bộ khung mà được hình thành bởi các liên kết alkyl hoặc xycloalkyl mạch ngắn bên trong phân tử nucleosit, các liên kết chứa các nguyên tử khác loại và alkyl hoặc xycloalkyl kết hợp bên trong phân tử nucleosit, hoặc một hoặc nhiều liên kết mạch ngắn chứa nguyên tử khác loại hoặc dị vòng bên trong phân tử nucleosit. Các bộ khung này bao gồm các bộ khung có liên kết morpholino (được hình thành một phần từ phần đường của nucleosit); bộ khung siloxan; bộ khung sulfua, sulfoxit và sulfon; bộ khung formaxetyl và thioformaxetyl; bộ khung metylen formaxetyl và thioformaxetyl; bộ khung chứa alken; bộ khung sulfamat; bộ khung metylenimino và metylenhydrazino; bộ khung sulfonat và sulfonamit; bộ khung amit; và các bộ khung khác chứa các phần thành phần N, O, S, và CH₂ kết hợp.

Các Patent Mỹ điển hình nêu quy trình điều chế các oligonucleosit nêu trên bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các patent Mỹ số 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,64,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; và 5,677,439, toàn bộ nội dung của mỗi trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Các chất bắt chước ARN thích hợp được dự định để dùng trong iARN được nêu ở đây, trong đó cả đường và liên kết trong phân tử nucleosit, *nghĩa là*, bộ khung, của các đơn vị nucleotit được thay bằng các nhóm mới. Các đơn vị bazơ được giữ lại để lai hóa với hợp chất đích axit nucleic thích hợp. Hợp chất oligome như vậy trong đó chất bắt chước ARN mà đã được chỉ ra là có đặc tính lai hóa tuyệt vời được đề cập đến như là axit peptit nucleic (PNA). Trong các hợp chất PNA, bộ khung đường của ARN được

thay thế bằng bộ khung chứa amit, cụ thể là bộ khung aminoethylglyxin. Các nucleobazo được giữ lại và được liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với nguyên tử aza nitơ của phần amit của bộ khung. Các patent Mỹ điển hình mà nêu quy trình điều chế hợp chất PNA bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các patent Mỹ số 5,539,082; 5,714,331; và 5,719,262, toàn bộ nội dung của mỗi trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Các hợp chất PNA khác thích hợp để dùng trong iARN theo sáng chế được mô tả trong, ví dụ, trong tài liệu Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Một số phương án được đưa ra trong sáng chế bao gồm ARN với bộ khung phosphorothioat và oligonucleosit với bộ khung chứa nguyên tử khác loại, và cụ thể --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[được biết đến như là bộ khung metylen (metylimino) hoặc MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- và --N(CH₃)--CH₂--CH₂--[trong đó bộ khung phosphodiester nguyên thể được biểu thị dưới dạng --O--P--O--CH₂--] của patent Mỹ số 5,489,677 được viện dẫn ở trên, và bộ khung amit của patent Mỹ số 5,602,240 được viện dẫn ở trên. Theo một số phương án, ARN được đưa ra trong bản mô tả này có cấu trúc bộ khung morpholino của patent Mỹ số 5,034,506 được viện dẫn ở trên.

Các ARN cải biến cũng chứa một hoặc nhiều gốc đường được thế. Các iARN, chẳng hạn, ARN sợi kép, được đưa ra trong bản mô tả này có thể chứa một trong số các nhóm sau ở vị trí 2': OH; F; O-, S-, hoặc N-alkyl; O-, S-, hoặc N-alkenyl; O-, S- hoặc N-alkynyl; hoặc O-alkyl-O-alkyl, trong đó alkyl, alkenyl và alkynyl có thể là C₁ đến C₁₀ alkyl hoặc C₂ đến C₁₀ alkenyl và alkynyl được thế hoặc không được thế. Ví dụ về các cải biến thích hợp bao gồm O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, và O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, trong đó n và m bằng từ 1 đến khoảng 10. Theo các phương án khác, ARN sợi kép bao gồm một trong số các nhóm sau đây ở vị trí 2': C₁ đến C₁₀ alkyl thấp, alkyl thấp được thế, alkaryl, aralkyl, O-alkaryl hoặc O-aralkyl, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heteroxycloalkyl, heteroxycloalkaryl, aminoalkylamino, polyalkylamino, silyl được thế, nhóm phân cắt ARN, nhóm báo cáo, chất can thiệp, nhóm để cải thiện đặc tính dược động học của iARN, hoặc nhóm để cải thiện đặc tính dược lực học của iARN, và các nhóm thế khác có đặc tính tương tự. Theo một số

phương án, cải biến bao gồm 2'-metoxyetoxy (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, còn được biết đến như là 2'-O-(2-metoxetyl) hoặc 2'-MOE) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504) *nghĩa là*, nhóm alkoxy-alkoxy. Một ví dụ cải biến khác là 2'-dimethylaminoxyetoxy, *nghĩa là*, nhóm O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, còn được biết đến như là 2'-DMAOE, như được mô tả trong các ví dụ nêu trong bản mô tả dưới đây, và 2'-dimethylaminoetoxyetoxy (cũng được biết đến trong lĩnh vực như là 2'-O-dimethylaminoetoxyetyl hoặc 2'-DMAEOE), *nghĩa là*, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂. Ví dụ về các cải biến khác bao gồm: 5'-Me-2'-F nucleotit, 5'-Me-2'-OMe nucleotit, 5'-Me-2'-deoxynucleotit, (cả đồng phân R và S trong ba họ này); 2'-alkoxyalkyl; và 2'-NMA (N-metylaxetamit).

Các cải biến khác bao gồm 2'-metoxy (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxy (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) và 2'-flo (2'-F). Các cải biến tương tự cũng có thể được tạo ra ở các vị trí khác trên ARN của iARN, cụ thể là ở vị trí 3' của phân tử đường trên nucleotit đầu tận cùng 3' hoặc trên ARN sợi kép được liên kết 2'-5' và vị trí 5' của nucleotit ở đầu tận cùng 5'. iARN cũng có thể có các phân tử bất chức đường như các gốc xyclobutyl thay cho đường pentofuranosyl. Các patent Mỹ điển hình đưa ra quy trình điều chế các cấu trúc đường cải biến như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các patent Mỹ số 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; và 5,700,920, một số trong chúng thường có ứng dụng tức thời. Toàn bộ nội dung của mỗi trong số các tài liệu trên đây được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

iARN cũng có thể bao gồm các cải biến hoặc thay thế nucleobazơ (thường được đề cập đến trong lĩnh vực như là “bazơ”). Như được sử dụng trong bản mô tả này nucleobazơ “không được cải biến” hoặc “tự nhiên” bao gồm các bazơ purin adenin (A) và guanin (G), và bazơ pyrimidin thymin (T), xytosin (C), và uraxil (U). Nucleobazơ được cải biến bao gồm các nucleobazơ tự nhiên và tổng hợp khác như deoxy-thymin (dT), 5-metylxytosin (5-me-C), 5-hydroxymetyl xytosin, xantin, hypoxantin, 2-aminoadenin, 6-metyl và các dẫn xuất alkyl khác của adenin và guanin, 2-propyl và các dẫn xuất alkyl khác của adenin và guanin, 2-thiouraxil, 2-thiothymin và 2-thioxytosin, 5-halouraxil và xytosin, 5-propynyl uraxil và xytosin, 6-azo uraxil, xytosin và thymin,

5-uraxil (pseudouraxil), 4-thiouraxil, 8-halo, 8-amino, 8-thiol, 8-thioalkyl, 8-hydroxyl và các adenin và guanin được thế ở vị trí 8 khác, 5-halo, đặc biệt là 5-bromo, 5-triflometyl và các uraxil được thế ở vị trí 5 khác và xytosin, 7-metylguanin và 7-metyladenin, 8-azaguanin và 8-azaadenin, 7-deazaguanin và 7-daazaadenin và 3-deazaguanin và 3-deazaadenin. Các nucleobazơ khác bao gồm các nucleobazơ được bộc lộ trong Patent Mỹ số 3,687,808, các nucleobazơ được bộc lộ trong tài liệu Modified nucleosits in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; các nucleobazơ được bộc lộ trong tài liệu The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, các nucleobazơ được bộc lộ bởi Englisch *et al.*, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, và các nucleobazơ được bộc lộ bởi Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research và Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Một vài trong số các nucleobazơ này là đặc biệt hữu hiệu để gia tăng ái lực gắn kết của các hợp chất oligome được đưa ra trong sáng chế. Các nucleobazơ này bao gồm pyrimidin được thế ở vị trí 5, 6-azapyrimidin và N-2, N-6 và các purin được thế ở vị trí 0-6, bao gồm 2-aminopropyladenin, 5-propynyluraxil và 5-propynylxytosin. Đã nhận thấy rằng các phần tử thế 5-metylxytosin gia tăng tính ổn định chuỗi kép axit nucleic lên 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) và là các phần tử thế bazơ được nêu làm ví dụ, thậm chí đặc biệt hơn khi được kết hợp với các cải biến đường 2'-O-metoxetyl.

Các Patent Mỹ điển hình nêu quy trình điều chế một vài trong số các nucleobazơ được cải biến đã nêu ở trên cũng như các nucleobazơ được cải biến khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các patent Mỹ số 3,687,808, 4,845,205; 5,130,30; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; 5,750,692; 6,015,886; 6,147,200; 6,166,197; 6,222,025; 6,235,887; 6,380,368; 6,528,640; 6,639,062; 6,617,438; 7,045,610; 7,427,672; và 7,495,088 đã nêu ở trên, toàn bộ nội dung của mỗi trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

ARN của iARN cũng có thể được cải biến để bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic bị khóa (LNA). Axit nucleic bị khóa là nucleotit có một gốc riboza được cải biến trong đó gốc riboza này chứa một cầu nối phụ nối các nguyên tử cacbon 2' và 4'. Cấu trúc này "khóa" một cách hữu hiệu riboza trong quá trình sắp xếp cấu trúc 3'-endo. Đã nhận thấy rằng việc bổ sung axit nucleic bị khóa vào siARN làm gia tăng tính ổn định của siARN trong huyết thanh, và làm giảm các tác dụng không trúng đích (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193).

Theo một số phương án, iARN theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều monome là nucleotit UNA (axit nucleic không bị khóa). UNA là axit nucleic acyclic không bị khóa, trong đó liên kết bất kỳ trong số các liên kết của đường đã được loại bỏ, tạo thành gốc "đường" không bị khóa. Theo một ví dụ, UNA cũng bao hàm monome với các liên kết giữa C1'-C4' đã được loại bỏ (*nghĩa là liên kết cộng hóa trị cacbon-oxy-cacbon giữa các nguyên tử cacbon C1' và C4'*). Theo một ví dụ khác, liên kết C2'-C3' (*nghĩa là liên kết cacbon-cacbon cộng hóa trị giữa các nguyên tử cacbon C2' và C3'*) của đường đã được loại bỏ (xem *Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008) và Fluiter *et al.*, *Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039 được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn).

ARN của iARN cũng có thể được cải biến để bao gồm một hoặc nhiều gốc đường hai vòng. "Đường hai vòng" là vòng furanosyl được cải biến bằng cách tạo cầu nối giữa hai nguyên tử này. "Nucleosit hai vòng" ("BNA") là nucleosit có một gốc đường chứa một cầu nối nối hai nguyên tử cacbon của nhân đường, nhờ đó tạo thành hệ nhân hai vòng. Theo các phương án nhất định, cầu nối nối cacbon 4' và cacbon 2' của nhân đường. Vì vậy, theo một số phương án, tác nhân theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic bị khóa (LNA). Axit nucleic bị khóa là nucleotit có một gốc riboza được cải biến trong đó gốc riboza này chứa một cầu nối phụ nối các nguyên tử cacbon 2' và 4'. Nói cách khác, LNA là nucleotit chứa một gốc đường hai vòng chứa cầu nối 4'-CH₂-O-2'. Cấu trúc này "khóa" một cách hữu hiệu riboza trong quá trình sắp xếp cấu trúc 3'-endo. Đã nhận thấy rằng việc bổ sung axit nucleic bị khóa vào siARN làm gia tăng tính ổn định của siARN trong huyết thanh, và làm giảm các tác dụng không trúng đích (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447;

Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Ví dụ về nucleosit hai vòng để dùng trong polynucleotit theo sáng chế bao gồm nhưng không giới hạn ở nucleosit chứa một cầu nối giữa các nguyên tử vòng ribosyl 4' và 2'. Theo các phương án nhất định, các tác nhân polynucleotit đối nghĩa theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều nucleosit hai vòng chứa một cầu nối 4' đến 2'. Ví dụ về nucleosit hai vòng có chứa cầu nối 4' đến 2' bao gồm, nhưng không giới hạn ở, 4'-(CH₂)—O-2' (LNA); 4'-(CH₂)—S-2'; 4'-(CH₂)₂—O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)—O-2' (còn được đề cập đến như là “etyl không tự nhiên” hoặc “cEt”) và 4'-CH(CH₂OCH₃)—O-2' (và các chất tương tự nó; xem, *chẳng hạn*, patent Mỹ số 7,399,845); 4'-C(CH₃)(CH₃)—O-2' (và các chất tương tự nó; xem *chẳng hạn*, patent Mỹ số 8,278,283); 4'-CH₂—N(OCH₃)-2' (và các chất tương tự nó; xem *chẳng hạn*, patent Mỹ số 8,278,425); 4'-CH₂—O—N(CH₃)-2' (xem, *chẳng hạn*, Công bố patent Mỹ số 2004/0171570); 4'-CH₂—N(R)—O-2', trong đó R là H, C1-C12 alkyl, hoặc nhóm bảo vệ (xem, *chẳng hạn*, patent Mỹ số 7,427,672); 4'-CH₂—C(H)(CH₃)-2' (xem, *chẳng hạn*, Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); và 4'-CH₂—C(=CH₂)-2' (và các chất tương tự nó; xem, *chẳng hạn*, patent Mỹ số 8,278,426). Toàn bộ nội dung của mỗi trong số các tài liệu trên đây được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Các Patent Mỹ và Công bố patent Mỹ nêu quy trình điều chế các nucleotit chứa axit nucleic bị khóa bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các tài liệu sau: các patent Mỹ số 6,268,490; 6,525,191; 6,670,461; 6,770,748; 6,794,499; 6,998,484; 7,053,207; 7,034,133; 7,084,125; 7,399,845; 7,427,672; 7,569,686; 7,741,457; 8,022,193; 8,030,467; 8,278,425; 8,278,426; 8,278,283; US 2008/0039618; và US 2009/0012281, toàn bộ nội dung của mỗi trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Nucleosit hai vòng bất kỳ trong số các nucleosit hai vòng nêu trên có thể được điều chế để có một hoặc nhiều cấu hình đường ở dạng hóa học lập thể bao gồm ví dụ α -L-ribofuranoza và β -D-ribofuranoza (xem WO 99/14226).

ARN của iARN cũng có thể được cải biến để bao gồm một hoặc nhiều nucleotit etyl không tự nhiên. Như được sử dụng trong bản mô tả này "nucleotit etyl không tự

nhiên" hoặc "cEt" là axit nucleic bị khóa chứa một phân tử đường hai vòng chứa cầu nối 4'-CH(CH₃)-O-2'. Theo một phương án, etyl nucleotit không tự nhiên có cấu hình S được đề cập đến như là "S-cEt."

iARN theo sáng chế cũng có thể chứa một hoặc nhiều "nucleotit giới hạn một cách thích ứng" ("CRN"). CRN là các chất tương tự nucleotit với một liên kết nối giữa cacbon C2' và cacbon C4' của riboza hoặc cacbon C3 và cacbon C5' của riboza. CRN khóa nhân riboza thành cấu hình ổn định và làm gia tăng ái lực lai hóa với ARNm. Đoạn liên kết có chiều dài đủ để đưa oxy vào vị trí có độ ổn định và ái lực tối ưu dẫn đến nhân riboza ít bị gấp.

Các công bố điển hình đưa ra quy trình điều chế một số CRN nhất định trong số các CRN nêu trên bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Công bố patent Mỹ số 2013/0190383; và Công bố đơn PCT số WO 2013/036868, toàn bộ nội dung của mỗi trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, iARN theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều monome là nucleotit UNA (axit nucleic không bị khóa). UNA là axit nucleic acyclic không bị khóa, trong đó liên kết bất kỳ trong số các liên kết của đường đã được loại bỏ, tạo thành gốc "đường" không bị khóa. Theo một ví dụ, UNA cũng bao hàm monome với các liên kết giữa C1'-C4' đã được loại bỏ (*nghĩa là liên kết cộng hóa trị cacbon-oxy-cacbon giữa các nguyên tử cacbon C1' và C4'*). Theo một ví dụ khác, liên kết C2'-C3' (*nghĩa là liên kết cacbon-cacbon cộng hóa trị giữa các nguyên tử cacbon C2' và C3'*) của đường đã được loại bỏ (xem *Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008) và Fluiter *et al.*, *Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039 được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn).

Các tài liệu công bố Mỹ đưa ra quy trình điều chế UNA bao gồm, nhưng không giới hạn ở, patent Mỹ số 8,314,227; và Công bố Patent Mỹ số 2013/0096289; 2013/0011922; và 2011/0313020, toàn bộ nội dung của mỗi trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Các cải biến đối với các đầu của phân tử ARN có khả năng làm ổn định có thể bao gồm N-(axetylaminocaproyl)-4-hydroxyprolinol (Hyp-C6-NHAc), N-(caproyl-4-hydroxyprolinol (Hyp-C6), N-(axetyl-4-hydroxyprolinol (Hyp-NHAc), thymidin-2'-O-deoxythymidin (ete), N-(aminocaproyl)-4-hydroxyprolinol (Hyp-C6-amino), 2-

docosanoyl-uridin-3"-phosphat, bazơ nghịch đảo dT(idT) và các cải biến khác. Việc bộc lộ các cải biến này có thể được tìm thấy trong công bố đơn PCT số WO 2011/005861.

Các cải biến khác của nucleotit của iARN theo sáng chế bao gồm 5' phosphat hoặc giả 5' phosphat, *chẳng hạn*, phosphat hoặc giả phosphat ở đầu tận cùng 5' trên sợi đối nghĩa của iARN. Các cải biến giả phosphat thích hợp được bộc lộ trong, ví dụ Công bố patent Mỹ số 2012/0157511, toàn bộ nội dung của tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

A. iARN cải biến chứa các motif theo sáng chế

Theo các khía cạnh nhất định của sáng chế, tác nhân ARNi sợi kép theo sáng chế bao gồm các tác nhân với các cải biến hóa học như được bộc lộ, ví dụ, trong WO2013/075035, toàn bộ nội dung của mỗi trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. WO2013/075035 đưa các motif của ba cải biến giống hệt trên ba nucleotit liền kề vào sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép, đặc biệt là ở hoặc ở gần vị trí phân cắt. Theo một số phương án, sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép có thể được cải biến hoàn toàn theo cách khác. Việc đưa các motif này làm phá vỡ khuôn mẫu cải biến, nếu có, của sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa. Tác nhân ARNi sợi kép tùy ý có thể được tiếp hợp với phối tử dẫn xuất GalNAc, chẳng hạn trên sợi có nghĩa.

Cụ thể hơn, khi sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép được cải biến hoàn toàn để có một hoặc nhiều motif của ba cải biến giống hệt trên ba nucleotit liền kề ở hoặc ở gần vị trí phân cắt của ít nhất một sợi của tác nhân ARNi sợi kép, quan sát thấy hoạt tính làm bất hoạt gen của tác nhân ARNi sợi kép.

Vì vậy, sáng chế đề xuất tác nhân ARNi sợi kép có khả năng ức chế sự biểu hiện của gen đích (*nghĩa là*, gen PD-L1 gen) *in vivo*. Tác nhân ARNi bao gồm một sợi có nghĩa và một sợi đối nghĩa. Mỗi sợi của tác nhân ARNi có thể độc lập có chiều dài 12-30 nucleotit. Ví dụ, mỗi sợi có thể độc lập có chiều dài 14-30 nucleotit, có chiều dài 17-30 nucleotit, có chiều dài 25-30 nucleotit, có chiều dài 27-30 nucleotit, có chiều dài 17-23 nucleotit, có chiều dài 17-21 nucleotit, có chiều dài 17-19 nucleotit, có chiều dài 19-

25 nucleotit, có chiều dài 19-23 nucleotit, có chiều dài 19-21 nucleotit, có chiều dài 21-25 nucleotit, hoặc có chiều dài 21-23 nucleotit.

Sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa thường tạo thành sợi kép ARN sợi kép (“ARN sợi kép”), còn được đề cập đến như là “tác nhân ARNi sợi kép.” Vùng sợi kép của tác nhân ARNi sợi kép có thể có chiều dài 12-30 cặp nucleotit. Ví dụ, vùng sợi kép có thể có chiều dài 14-30 cặp nucleotit, có chiều dài 17-30 cặp nucleotit, có chiều dài 27-30 cặp nucleotit, có chiều dài 17 - 23 cặp nucleotit, có chiều dài 17-21 cặp nucleotit, có chiều dài 17-19 cặp nucleotit, có chiều dài 19-25 cặp nucleotit, có chiều dài 19-23 cặp nucleotit, có chiều dài 19- 21 cặp nucleotit, có chiều dài 21-25 cặp nucleotit, hoặc có chiều dài 21-23 cặp nucleotit. Theo một ví dụ khác, vùng sợi kép được chọn từ vùng có chiều dài 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, hoặc 30 nucleotit.

Theo các phương án nhất định, các sợi có nghĩa và đối nghĩa cũng có thể dài hơn. Ví dụ, theo các phương án nhất định, sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa độc lập có chiều dài 25-35 nucleotit. Theo các phương án nhất định, mỗi sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa độc lập có chiều dài 27-53 nucleotit, *chẳng hạn*, có chiều dài 27-49, 31-49, 33-49, 35-49, 37-49, và 39-49 nucleotit.

Theo các phương án nhất định, tác nhân ARNi sợi kép may chứa một hoặc nhiều vùng nhô ra hoặc nhóm gắn mũ ở đầu 3', 5', hoặc cả hai đầu của một hoặc cả hai sợi. Phần nhô ra này có thể độc lập có chiều dài 1-6 nucleotit, chẳng hạn có chiều dài 2-6 nucleotit, có chiều dài 1-5 nucleotit, có chiều dài 2-5 nucleotit, có chiều dài 1-4 nucleotit, có chiều dài 2-4 nucleotit, có chiều dài 1-3 nucleotit, có chiều dài 2-3 nucleotit, hoặc có chiều dài 1-2 nucleotit. Theo các phương án nhất định, vùng nhô ra có thể bao gồm vùng nhô ra kéo dài như được đề xuất ở trên. Phần nhô ra có thể là do một sợi dài hơn sợi kia, hoặc là do hai sợi có cùng chiều dài được đặt so le. Phần nhô ra có thể tạo thành cặp bazơ nitơ không hợp đôi với ARNm đích hoặc nó có thể hỗ trợ cho các trình tự gen được hướng đích hoặc có thể là một trình tự khác. Các sợi thứ nhất và thứ hai cũng có thể được nối, *chẳng hạn*, bằng các bazơ bổ sung để tạo thành dạng cặp tóc, hoặc bằng các liên kết phi bazơ khác.

Theo các phương án nhất định, mỗi nucleotit trong vùng nhô ra này của tác nhân ARNi sợi kép có thể độc lập là nucleotit cải biến hoặc không được cải biến bao gồm,

nhưng không giới hạn ở được cải biến ở gốc đường 2', như, 2'-F, 2'-O-methyl, thymidin (T), 2'-O-metoxyletyl-5-metyluridin (Teo), 2'-O-metoxyletyladenôsin (Aeo), 2'-O-metoxyletyl-5-metylxytidin (m5Ceo), và tổ hợp bất kỳ của chúng. Ví dụ, TT có thể là trình tự nhô ra ở một đầu của một sợi. Phần nhô ra có thể tạo thành cặp bazơ nitơ không hợp đôi với ARNm đích hoặc nó có thể hỗ trợ cho các trình tự gen được hướng đích hoặc có thể là một trình tự khác.

Các phần nhô ra 5'- hoặc 3'- ở sợi có nghĩa, sợi đối nghĩa, hoặc cả hai sợi của tác nhân ARNi sợi kép có thể được phosphoryl hóa. Theo một số phương án, các vùng nhô ra chứa hai nucleotit có một phosphorothioat giữa hai nucleotit này, trong đó hai nucleotit có thể giống nhau hoặc khác nhau. Theo một số phương án, phần nhô ra này có mặt ở đầu 3' của sợi có nghĩa, sợi đối nghĩa, hoặc cả hai sợi. Theo một số phương án, phần nhô ra ở đầu 3' có mặt trên sợi đối nghĩa. Theo một số phương án, phần nhô ra ở đầu 3' có mặt trên sợi có nghĩa.

Tác nhân ARNi sợi kép có thể chỉ chứa một phần nhô ra duy nhất, có thể cũng có hoạt tính can thiệp của ARNi, mà không ảnh hưởng đến tính bền nói chung của nó. Ví dụ, phần nhô ra thuộc sợi đơn có thể nằm ở đầu 3' của sợi có nghĩa hoặc, theo cách khác, ở đầu 3' của sợi đối nghĩa. ARNi cũng có thể có một đầu cùn, nằm ở đầu 5' của sợi đối nghĩa (hoặc đầu 3' của sợi có nghĩa) hoặc *ngược lại*. Thông thường, sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép có một nucleotit nhô ra ở đầu 3', và đầu 5' là đầu cùn. Mặc dù không mong muốn bị giới hạn bởi lý thuyết, đầu cùn không đối xứng ở đầu 5' của sợi đối nghĩa và phần nhô ra ở đầu 3' của sợi đối nghĩa khiến cho sợi dẫn đi vào quy trình RISC.

Theo các phương án nhất định, tác nhân ARNi sợi kép có đầu cùn có chiều dài 19 nucleotit ở cuối sợi kép, trong đó sợi có nghĩa chứa ít nhất một motif gồm ba cải biến 2'-F ở ba nucleotit liên tiếp ở các vị trí 7, 8, 9 từ đầu 5'. Sợi đối nghĩa chứa ít nhất một motif gồm ba cải biến 2'-O-metyl ở ba nucleotit liên tiếp ở các vị trí 11, 12, 13 từ đầu 5'.

Theo các phương án khác, tác nhân ARNi sợi kép có đầu cùn có chiều dài 20 nucleotit ở cuối sợi kép, trong đó sợi có nghĩa chứa ít nhất một motif gồm ba cải biến

2'-F ở ba nucleotit liền kề ở các vị trí 8, 9, 10 từ đầu 5'. Sợi đối nghĩa chứa ít nhất một motif gồm ba cải biến 2'-O-metyl ở ba nucleotit liền kề ở các vị trí 11, 12, 13 từ đầu 5'.

Theo các phương án khác nữa, tác nhân ARNi sợi kép có đầu cùn có chiều dài 21 nucleotit ở cuối sợi kép, trong đó sợi có nghĩa chứa ít nhất một motif gồm ba cải biến 2'-F ở ba nucleotit liền kề ở các vị trí 9, 10, 11 từ đầu 5'. Sợi đối nghĩa chứa ít nhất một motif gồm ba cải biến 2'-O-metyl ở ba nucleotit liền kề ở các vị trí 11, 12, 13 từ đầu 5'.

Theo các phương án nhất định, tác nhân ARNi sợi kép bao gồm sợi có nghĩa gồm 21 nucleotit và sợi đối nghĩa gồm 23 nucleotit, trong đó sợi có nghĩa chứa ít nhất một motif gồm ba cải biến 2'-F ở ba nucleotit liền kề ở các vị trí 9, 10, 11 từ đầu 5'; sợi đối nghĩa chứa ít nhất một motif gồm ba cải biến 2'-O-metyl ở ba nucleotit liền kề ở các vị trí 11, 12, 13 từ đầu 5', trong đó một đầu của tác nhân ARNi là cùn, trong khi đầu kia bao gồm đoạn nhô ra gồm 2 nucleotit. Tốt hơn là, đoạn nhô ra gồm 2 nucleotit nằm ở đầu 3' của sợi đối nghĩa.

Khi đoạn nhô ra gồm 2 nucleotit này nằm ở đầu 3' của sợi đối nghĩa, có thể có hai liên kết liên nucleotit phosphorothioat giữa ba nucleotit ở đầu tận cùng, trong đó hai trong số ba nucleotit này là các nucleotit nhô ra, và nucleotit thứ ba là nucleotit cặp đôi kế tiếp nucleotit nhô ra này. Theo một phương án, tác nhân ARNi còn có hai liên kết liên nucleotit phosphorothioat giữa ba nucleotit đầu tận cùng ở cả đầu 5' của sợi có nghĩa và ở đầu 5' của sợi đối nghĩa. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleotit trong sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép, bao gồm các nucleotit là một phần của các motif là các nucleotit cải biến. Theo các phương án nhất định mỗi góc độc lập được cải biến với 2'-O-metyl hoặc 3'-flo, *chẳng hạn*, trong một motif khác. Tùy ý, tác nhân ARNi sợi kép còn bao gồm phối tử (tốt hơn là GalNAc₃).

Theo các phương án nhất định, tác nhân ARNi sợi kép bao gồm một sợi có nghĩa và một sợi đối nghĩa, trong đó sợi có nghĩa có chiều dài 25-30 gốc nucleotit, trong đó bắt đầu từ nucleotit ở đầu tận cùng 5' (vị trí 1), các vị trí từ 1 đến 23 của sợi thứ nhất chứa ít nhất 8 ribonucleotit; sợi đối nghĩa có chiều dài 36-66 gốc nucleotit và, bắt đầu từ nucleotit đầu tận cùng 3', bao gồm ít nhất 8 ribonucleotit ở các vị trí được cặp đôi với các vị trí 1- 23 của sợi có nghĩa để tạo thành sợi kép; trong đó ít nhất nucleotit đầu tận

cùng 3' của sợi đối nghĩa không cặp đôi với sợi có nghĩa, và có tới 6 nucleotit liền kề ở đầu tận cùng 3' không được cặp đôi với sợi có nghĩa, nhờ đó tạo thành phần nhô ra gồm 1-6 nucleotit ở đầu 3' của sợi đơn; trong đó đầu tận cùng 5' của sợi đối nghĩa bao gồm từ 10-30 nucleotit liền kề mà không được cặp đôi với sợi có nghĩa, nhờ đó tạo thành phần nhô ra gồm 10-30 nucleotit ở đầu 5' của sợi đơn; trong đó ít nhất các nucleotit ở đầu tận cùng 5' và đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa được cặp đôi bazơ với các nucleotit của sợi đối nghĩa khi các sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa được sắp thẳng hàng để tối ưu hóa tính hỗ trợ, nhờ đó tạo thành vùng về cơ bản là sợi kép giữa các sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa; và sợi đối nghĩa hỗ trợ một cách thích đáng cho ARN đích dọc theo ít nhất 19 ribonucleotit của chiều dài sợi đối nghĩa để làm giảm sự biểu hiện gen đích khi axit nucleic sợi kép được đưa vào tế bào của động vật có vú; và trong đó sợi có nghĩa chứa ít nhất một motif gồm ba cải biến 2'-F trên ba nucleotit liền kề, trong đó ít nhất một trong số các motif xuất hiện ở hoặc ở gần vị trí phân cắt. Sợi đối nghĩa chứa ít nhất một motif gồm ba cải biến 2'-O-metyl ở ba nucleotit liền kề ở hoặc ở gần vị trí phân cắt.

Theo các phương án nhất định, tác nhân ARNi sợi kép bao gồm sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa, trong đó tác nhân ARNi sợi kép bao gồm sợi thứ nhất có chiều dài ít nhất là 25 và nhiều nhất là 29 nucleotit và sợi thứ hai có chiều dài nhiều nhất là 30 nucleotit với ít nhất một motif gồm ba cải biến 2'-O-metyl ở ba nucleotit liền kề ở các vị trí 11, 12, 13 từ đầu 5'; trong đó đầu 3' của sợi thứ nhất và đầu 5' của sợi thứ hai tạo thành đầu cùn và sợi thứ hai dài hơn 1-4 nucleotit ở đầu 3' của nó so với sợi thứ nhất, trong đó vùng sợi kép có chiều dài ít nhất 25 nucleotit, và sợi thứ hai hỗ trợ thích đáng cho ARNm đích dọc theo ít nhất 19 nucleotit của chiều dài sợi thứ hai để làm giảm sự biểu hiện gen đích khi tác nhân ARNi được đưa vào tế bào của động vật có vú, và trong đó sự phân cắt tác nhân ARNi sợi kép nhờ Dicer tốt hơn là tạo ra siARN chứa đầu 3' của sợi thứ hai, nhờ đó làm giảm sự biểu hiện của gen đích ở động vật có vú. Tùy ý, tác nhân ARNi sợi kép còn bao gồm phối tử.

Theo các phương án nhất định, sợi có nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép chứa ít nhất một motif gồm ba cải biến giống hệt trên ba nucleotit liền kề, trong đó một trong số các motif này xuất hiện ở vị trí phân cắt trên sợi có nghĩa.

Theo các phương án nhất định, sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép cũng có thể chứa ít nhất một motif gồm ba cải biến giống hệt trên ba nucleotit liên kề, trong đó một trong số các motif xuất hiện ở hoặc ở gần vị trí phân cắt trên sợi đối nghĩa.

Đối với tác nhân ARNi sợi kép chứa vùng sợi kép có chiều dài 17-23 nucleotit, vị trí phân cắt của sợi đối nghĩa thường nằm xung quanh các vị trí 10, 11, và 12 từ đầu -5'. Vì vậy, các motif gồm ba cải biến giống hệt có thể xuất hiện ở các vị trí 9, 10, 11; các vị trí 10, 11, 12; các vị trí 11, 12, 13; các vị trí 12, 13, 14; hoặc các vị trí 13, 14, 15 của sợi đối nghĩa, tính bắt đầu từ nucleotit thứ nhất từ đầu 5' -của sợi đối nghĩa, hoặc, tính bắt đầu từ nucleotit cặp đôi đầu tiên trong vùng sợi kép từ đầu 5' của sợi đối nghĩa. Vị trí phân cắt trong sợi đối nghĩa cũng có thể thay đổi theo chiều dài của vùng sợi kép của tác nhân ARNi sợi kép từ đầu 5'.

Sợi có nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép có thể chứa ít nhất một motif gồm ba cải biến giống hệt ở ba nucleotit liên kề ở vị trí phân cắt của sợi này; và sợi đối nghĩa có thể có ít nhất một motif gồm ba cải biến giống hệt ở ba nucleotit liên kề ở hoặc ở gần vị trí phân cắt của sợi này. Khi sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa tạo thành sợi kép dsARN, sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa có thể được xếp thẳng hàng sao cho một motif gồm ba nucleotit trên sợi có nghĩa và một motif gồm ba nucleotit trên sợi đối nghĩa có ít nhất một nucleotit chồng lên nhau, *nghĩa là*, ít nhất một trong ba nucleotit của motif trên sợi có nghĩa tạo thành một cặp bazơ với ít nhất một trong ba nucleotit của motif trên sợi đối nghĩa. Theo cách khác, ít nhất hai nucleotit có thể chồng lên nhau, hoặc cả ba nucleotit có thể chồng lên nhau.

Theo một số phương án, sợi có nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép có thể chứa nhiều hơn một motif gồm ba cải biến giống hệt ở ba nucleotit liên kề. Motif thứ nhất có thể xuất hiện ở hoặc ở gần vị trí phân cắt của sợi này và các motif còn lại có thể là cải biến biên. Thuật ngữ “cải biến biên” trong bản mô tả này dùng để chỉ motif xuất hiện ở một vị trí khác của sợi mà cách biệt với motif ở hoặc ở gần vị trí phân cắt của cùng sợi này. Cải biến biên hoặc liên kề với motif thứ nhất hoặc được cách biệt bởi ít nhất một hoặc nhiều nucleotit. Khi các motif nằm ngay cạnh nhau thì đặc tính hóa học của các motif này là khác nhau, và khi các motif nằm cách biệt bởi một hoặc nhiều nucleotit thì đặc tính hóa học có thể giống nhau hoặc khác nhau. Có thể có một hai hoặc nhiều cải

biến biên. Chẳng hạn, khi có mặt hai cải biến biên, mỗi cải biến biên có thể xuất hiện ở một đầu tương ứng với motif thứ nhất mà ở hoặc ở gần vị trí phân cắt hoặc ở phía bên kia của motif dẫn.

Tương tự sợi có nghĩa, sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép có thể chứa nhiều hơn một motif gồm ba cải biến giống hệt trên ba nucleotit liền kề, với ít nhất một trong số các motif xuất hiện ở hoặc ở gần vị trí phân cắt của sợi. Sợi đối nghĩa này cũng có thể chứa một hoặc nhiều cải biến biên sắp thẳng hàng tương tự với các cải biến biên mà có thể có mặt trên sợi có nghĩa.

Theo một số phương án, cải biến biên trên sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép thường không bao gồm một hoặc hai nucleotit đầu tiên ở đầu tận cùng ở đầu 3', đầu 5', hoặc cả hai đầu của sợi.

Theo các phương án khác, cải biến biên trên sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép thường không bao gồm một hoặc hai nucleotit cặp đôi đầu tiên trong vùng sợi kép ở đầu 3', đầu 5', hoặc cả hai đầu của sợi.

Khi mỗi sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép chứa ít nhất một cải biến biên, các cải biến biên có thể thuộc cùng một đầu của vùng sợi kép, và có một, hai, hoặc ba nucleotit chồng lên nhau.

Khi mỗi sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của tác nhân dsARNi chứa ít nhất hai cải biến biên, sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa có thể được sắp thẳng hàng sao cho hai cải biến mỗi cải biến từ một sợi nằm trên một đầu của vùng sợi kép, có một, hai hoặc ba nucleotit chồng lên nhau; hai cải biến mỗi cải biến từ một sợi nằm trên đầu còn lại của vùng sợi kép, có một, hai hoặc ba nucleotit chồng lên nhau; hai cải biến trên một sợi nằm trên mỗi phía của motif dẫn, có một, hai hoặc ba nucleotit chồng lên nhau trong vùng sợi kép.

Theo một số phương án, mỗi nucleotit trên sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép, bao gồm các nucleotit là một phần của các motif, có thể được cải biến. Mỗi nucleotit có thể được cải biến với cải biến giống hoặc khác nhau, có thể bao gồm một hoặc nhiều sự biến đổi của một hoặc cả hai oxy không liên kết phosphat hoặc sự biến đổi của một hoặc nhiều oxy liên kết phosphat; sự biến đổi cấu tạo của đường riboza, chẳng hạn, của 2'-hydroxyl trên đường riboza; sự thay thế hàng loạt gốc

phosphat bằng các liên kết “dephospho”; sự cải biến hoặc thay thế của một bazơ xuất hiện trong tự nhiên; và sự biến đổi hoặc cải biến của bộ khung riboza-phosphat.

Khi các axit nucleic là các polyme gồm các dưới đơn vị, nhiều cải biến xảy ra ở vị trí mà được lặp lại trong axit nucleic, *chẳng hạn*, cải biến của bazơ, hoặc gốc phosphat, hoặc O không liên kết thuộc gốc phosphat. Trong một số trường hợp, sự cải biến sẽ xảy ra ở tất cả các vị trí đưa ra trong axit nucleic nhưng trong nhiều trường hợp nó sẽ không xảy ra. Để làm ví dụ, sự cải biến có thể chỉ xảy ra ở vị trí đầu tận cùng 3' hoặc 5', có thể chỉ xảy ra ở vùng đầu tận cùng, *chẳng hạn*, ở vị trí trên nucleotit đầu tận cùng hoặc ở 2, 3, 4, 5, hoặc 10 nucleotit cuối của sợi. Sự cải biến có thể xảy ra ở vùng sợi kép, vùng sợi đơn, hoặc ở cả hai vùng. Sự cải biến có thể chỉ xảy ra ở vùng sợi kép của tác nhân ARNi sợi kép hoặc có thể chỉ xảy ra ở vùng sợi đơn của tác nhân ARNi sợi kép. Ví dụ, cải biến phosphorothioat ở vị trí O không liên kết có thể chỉ xảy ra ở một hoặc cả hai đầu, có thể chỉ xảy ra trong vùng đầu tận cùng, *chẳng hạn*, ở một vị trí trên một nucleotit đầu tận cùng, hoặc ở 2, 3, 4, 5, hoặc 10 nucleotit cuối của sợi, hoặc có thể xảy ra ở các vùng sợi kép và vùng sợi đơn, đặc biệt là ở các đầu. Đầu hoặc các đầu 5' có thể được phosphoryl hóa.

Có thể, *chẳng hạn*, tăng cường độ ổn định, để bao gồm các bazơ cụ thể trong phần nhô ra, hoặc để bao gồm các nucleotit cải biến hoặc các nhóm thay thế nucleotit, trong các phần nhô ra thuộc sợi đơn, *chẳng hạn*, trong phần nhô ra ở đầu 5' hoặc 3', hoặc cả hai. Ví dụ, có thể mong muốn bao gồm các nucleotit purin trong các phần nhô ra. Theo một số phương án, tất cả hoặc một số bazơ trong phần nhô ra ở đầu 3' hoặc 5' có thể được cải biến, *chẳng hạn*, bằng cải biến được mô tả ở đây. Các cải biến có thể bao gồm, *chẳng hạn*, sử dụng các cải biến ở vị trí 2' của đường riboza với các cải biến đã biết trong lĩnh vực, *chẳng hạn*, sử dụng deoxyribonucleotit, 2'-deoxy-2'-flo (2'-F) hoặc 2'-O-metyl được cải biến thay cho đường riboza của nucleobazơ, và các cải biến trong nhóm phosphat, *chẳng hạn*, các cải biến phosphorothioat. Các phần nhô ra không cần phải tương đồng với trình tự đích.

Theo một số phương án, mỗi gốc của sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa được cải biến độc lập với LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-metoxyetyl, 2'-O-metyl, 2'-O-allyl, 2'-C-allyl, 2'-deoxy, 2'-hydroxyl, hoặc 2'-flo. Các sợi có thể chứa nhiều hơn một

cải biến. Theo một phương án, mỗi gốc của sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa độc lập được cải biến với 2'- O-metyl hoặc 2'-flo.

Ít nhất hai cải biến khác nhau thường có mặt trên sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa. Hai cải biến như vậy có thể là các cải biến 2'- O-metyl hoặc 2'-flo, hoặc các cải biến khác.

Theo các phương án nhất định, N_a hoặc N_b bao gồm các cải biến của một khuôn thay thế. Thuật ngữ “motif thay thế” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ motif mang một hoặc nhiều cải biến, mỗi cải biến xảy ra ở các nucleotit thay thế trên một sợi. Nucleotit thay thế có thể dùng để chỉ một nucleotit trên mỗi nucleotit khác hoặc một nucleotit trên mỗi ba nucleotit, hoặc một khuôn tương tự. Ví dụ, nếu mỗi A, B và C là một loại cải biến đối với nucleotit, motif thay thế có thể là “ABABABABABAB...,” “AABBAABBAABB...,” “AABAABAABAAB...,” “AAABAAABAAB...,” “AAABBBAAABBB...,” hoặc “ABCABCABCABC...,” v.v.

Loại cải biến được chứa trong motif thay thế có thể giống nhau hoặc khác nhau. Ví dụ, nếu mỗi A, B, C, D là một loại cải biến trên nucleotit, khuôn thay thế, *nghĩa là*, các cải biến trên mỗi nucleotit khác, có thể là giống nhau, nhưng mỗi sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa có thể được chọn từ một vài cải biến có thể có trong motif thay thế này như “ABABAB...,” “ACACAC...” “BDBDBD...” hoặc “CDCDCD...,” v.v.

Theo một số phương án, tác nhân ARNi sợi kép theo sáng chế bao gồm khuôn cải biến đối với motif thay thế trên sợi có nghĩa tương ứng với khuôn cải biến đối với motif thay thế trên sợi đối nghĩa được dịch chuyển. Sự dịch chuyển có thể tới mức sao cho nhóm nucleotit cải biến của sợi có nghĩa tương ứng với nhóm nucleotit cải biến khác của sợi đối nghĩa và *ngược lại*. Ví dụ, sợi có nghĩa khi được cặp đôi với sợi đối nghĩa trong sợi kép dsARN, motif thay thế trong sợi có nghĩa có thể bắt đầu với “ABABAB” từ đầu 5’ đến đầu 3’ của sợi này và motif thay thế trong sợi đối nghĩa có thể bắt đầu với “BABABA” từ đầu 5’ đến đầu 3’ của sợi này trong vùng sợi kép. Theo một ví dụ khác, motif thay thế trong sợi có nghĩa có thể bắt đầu với “AABBAABB” từ đầu 5’ đến đầu 3’ của sợi này và motif thay thế trong sợi đối nghĩa có thể bắt đầu với “BBAABBAA” từ đầu 5’ đến đầu 3’ của sợi này trong vùng sợi kép, sao cho có sự dịch chuyển một phần hoặc hoàn toàn các khuôn cải biến giữa sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa.

Theo một số phương án, tác nhân ARNi sợi kép chứa khuôn gồm motif thay thế chứa cải biến 2'-O-metyl và cải biến 2'-F trên sợi có nghĩa ban đầu có sự dịch chuyển tương ứng với khuôn gồm motif thay thế chứa cải biến 2'-O-metyl và cải biến 2'-F trên sợi đối nghĩa ban đầu, *nghĩa là*, nucleotit cải biến 2'-O-metyl trên sợi có nghĩa cặp đôi bazơ với nucleotit cải biến 2'-F trên sợi đối nghĩa và ngược lại. Vị trí 1 của sợi có nghĩa có thể bắt đầu với cải biến 2'-F, và vị trí 1 của sợi đối nghĩa có thể bắt đầu với cải biến 2'-O-metyl.

Việc đưa một hoặc nhiều motif gồm ba cải biến giống hệt ở ba nucleotit liên kề vào sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa làm phá vỡ khuôn cải biến ban đầu trên sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa. Việc phá vỡ khuôn cải biến của sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa bằng cách đưa một hoặc nhiều motif gồm ba cải biến giống hệt ở ba nucleotit liên kề vào sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa có thể làm tăng hoạt tính làm bất hoạt gen đối với gen đích.

Theo một số phương án, khi motif gồm ba cải biến giống hệt ở ba nucleotit liên kề được đưa vào sợi bất kỳ, sự cải biến của nucleotit kế tiếp motif này là cải biến khác với cải biến của motif này. Ví dụ, phần trình tự chứa motif là "...N_aYYYN_b..." trong đó "Y" là cải biến của motif gồm ba cải biến giống hệt trên ba nucleotit liên kề, và "N_a" và "N_b" là cải biến đối với nucleotit kế tiếp với motif "YYY" khác với cải biến của Y, và trong đó N_a và N_b có thể là các cải biến giống nhau hoặc khác nhau. Theo cách khác, N_a hoặc N_b có thể có mặt hoặc không có mặt khi có mặt cải biến biên.

iARN có thể còn bao gồm ít nhất một liên kết liên nucleotit phosphorothioat hoặc methylphosphonat. Cải biến liên kết liên nucleotit phosphorothioat hoặc methylphosphonat có thể xảy ra ở nucleotit bất kỳ thuộc sợi có nghĩa, sợi đối nghĩa, hoặc cả hai sợi ở vị trí bất kỳ của sợi này. Chẳng hạn, cải biến liên kết liên nucleotit có thể xảy ra ở mỗi nucleotit trên sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa; mỗi cải biến liên kết liên nucleotit này có thể xảy ra ở phần thay thế trên sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa; hoặc sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa có thể chứa cả các cải biến liên kết liên nucleotit trong khuôn thay thế. Khuôn thay thế của cải biến liên kết liên nucleotit trên sợi có nghĩa có thể giống hoặc khác với sợi đối nghĩa, và khuôn thay thế của cải biến liên kết liên nucleotit trên sợi có nghĩa có thể có độ dịch chuyển tương ứng với khuôn thay thế của

cải biến liên kết liên nucleotit trên sợi đối nghĩa. Theo một phương án, tác nhân ARNi sợi kép bao gồm 6-8 liên kết liên nucleotit phosphorothioat. Theo một số phương án, sợi đối nghĩa bao gồm hai liên kết liên nucleotit phosphorothioat ở đầu 5' và hai liên kết liên nucleotit phosphorothioat ở đầu 3', và sợi có nghĩa bao gồm ít nhất hai liên kết liên nucleotit phosphorothioat ở đầu 5' hoặc đầu 3'.

Theo một số phương án, tác nhân ARNi sợi kép bao gồm cải biến liên kết liên nucleotit phosphorothioat hoặc metylphosphonat trong vùng nhô ra. Ví dụ, vùng nhô ra có thể chứa hai nucleotit có liên kết phosphorothioat hoặc metylphosphonat liên phân tử nucleotit giữa hai nucleotit. Các cải biến liên kết liên nucleotit cũng có thể được tạo ra để liên kết nucleotit nhô ra với nucleotit được cặp đôi ở đầu tận cùng trong vùng sợi kép. Ví dụ, ít nhất 2, 3, 4, hoặc toàn bộ nucleotit nhô ra có thể được liên kết qua liên kết liên nucleotit phosphorothioat hoặc metylphosphonat, và tùy ý, có thể có các đoạn liên kết liên nucleotit phosphorothioat hoặc metylphosphonat khác liên kết nucleotit nhô ra với nucleotit cặp đôi mà nằm bên cạnh nucleotit nhô ra này. Chẳng hạn, có thể có ít nhất hai liên kết liên nucleotit phosphorothioat giữa ba nucleotit đầu tận cùng, trong đó hai trong số ba nucleotit này là các nucleotit nhô ra, và nucleotit thứ ba là nucleotit cặp đôi nằm bên cạnh nucleotit nhô ra này. Ba nucleotit ở đầu tận cùng này có thể nằm ở đầu 3' của sợi đối nghĩa, đầu 3' của sợi có nghĩa, đầu 5' của sợi đối nghĩa, hoặc đầu 5' của sợi đối nghĩa.

Theo một số phương án, phần nhô ra gồm 2 nucleotit ở đầu 3' của sợi đối nghĩa, và có hai liên kết liên nucleotit phosphorothioat giữa ba nucleotit ở đầu tận cùng này, trong đó hai trong số ba nucleotit này là các nucleotit nhô ra, và nucleotit thứ ba là nucleotit cặp đôi nằm bên cạnh nucleotit nhô ra này. Tùy ý, tác nhân ARNi sợi kép có thể còn có hai liên kết liên nucleotit phosphorothioat giữa ba nucleotit ở đầu tận cùng ở cả đầu 5' của sợi có nghĩa và đầu 5' của sợi đối nghĩa.

Theo một phương án, tác nhân ARNi sợi kép bao gồm các bazơ nitơ không hợp đôi với đích, nằm trong sợi kép, hoặc tổ hợp của chúng. Sự không hợp đôi có thể xảy ra trong vùng nhô ra hoặc vùng sợi kép. Cặp bazơ có thể được xếp hạng dựa trên xu hướng thúc đẩy sự phân ly hoặc nấu chảy của chúng (*chẳng hạn*, dựa trên năng lượng tự do của sự kết hợp hoặc phân ly của một cặp cụ thể, phương pháp đơn giản nhất là

kiểm tra các cặp dựa trên sự cặp đôi riêng rẽ, mặc dù các phương pháp phân tích tương tự hoặc cùng loại tiếp theo cũng có thể được sử dụng). Đối với việc thúc đẩy phân ly: A:U được ưu tiên hơn so với G:C; G:U được ưu tiên hơn so với G:C; và I:C được ưu tiên hơn so với G:C (I=inosin). Các cặp bazơ nitơ không hợp đôi, *chẳng hạn*, các cặp đôi không chính tắc hoặc các cặp đôi chính tắc khác (như được mô tả ở nơi khác trong bản mô tả này) được ưu tiên hơn các cặp đôi chính tắc (A:T, A:U, G:C); và các cặp đôi mà bao gồm một bazơ không phổ biến được ưu tiên hơn so với các cặp bazơ chính tắc.

Theo các phương án nhất định, tác nhân ARNi sợi kép bao gồm ít nhất một trong số 1, 2, 3, 4, hoặc 5 cặp bazơ đầu tiên trong vùng sợi kép tính từ đầu 5' của sợi đối nghĩa độc lập được chọn từ nhóm gồm: A:U, G:U, I:C, và các cặp không hợp đôi, *chẳng hạn*, các cặp đôi không chính tắc hoặc các cặp đôi chính tắc khác hoặc các cặp đôi mà bao gồm một bazơ không phổ biến, để thúc đẩy sự phân ly của sợi đối nghĩa ở đầu 5' của sợi kép.

Theo các phương án nhất định, nucleotit ở vị trí 1 trong vùng sợi kép từ đầu 5' trong sợi đối nghĩa được chọn từ A, dA, dU, U, và dT. Theo cách khác, ít nhất một trong số 1, 2, hoặc 3 cặp bazơ đầu tiên trong vùng sợi kép từ đầu 5' của sợi đối nghĩa là cặp bazơ AU. Ví dụ, cặp bazơ đầu tiên trong vùng sợi kép từ đầu 5' của sợi đối nghĩa là cặp bazơ AU.

Theo các phương án khác, nucleotit ở đầu 3' của sợi có nghĩa là deoxy-thymin (dT) hoặc nucleotit ở đầu 3' của sợi đối nghĩa là deoxy-thymin (dT). Ví dụ, có một trình tự ngắn gồm các nucleotit deoxy-thymin, ví dụ, hai nucleotit dT ở đầu 3' của sợi có nghĩa, sợi đối nghĩa, hoặc cả hai sợi.

Theo các phương án nhất định, trình tự sợi có nghĩa có thể được biểu thị bởi công thức (I):

$$5' n_p-N_a-(X X X)_i-N_b-Y Y Y-N_b-(Z Z Z)_j-N_a-n_q 3' \quad (I)$$

trong đó:

i và j độc lập với nhau bằng 0 hoặc 1;

p và q độc lập với nhau bằng 0-6;

mỗi N_a độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-25 nucleotit cải biến, mỗi trình tự bao gồm ít nhất hai nucleotit cải biến khác nhau;

mỗi N_b độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-10 nucleotit cải biến;

mỗi n_p và n_q độc lập là một nucleotit nhô ra;

trong đó N_b và Y không có cùng cải biến; và

mỗi XXX , YYY , và ZZZ độc lập là một motif gồm ba cải biến giống nhau ở ba nucleotit liền kề. Tốt hơn là YYY đều là các nucleotit cải biến 2'-F.

Theo một số phương án, N_a hoặc N_b bao gồm các cải biến của khuôn thay thế.

Theo một số phương án, motif YYY xuất hiện ở hoặc ở gần vị trí phân cắt của sợi có nghĩa. Ví dụ, khi tác nhân ARNi sợi kép có vùng sợi kép có chiều dài 17-23 nucleotit, motif YYY có thể xuất hiện ở hoặc ở vùng lân cận của vị trí phân cắt (*chẳng hạn*: có thể xuất hiện ở các vị trí 6, 7, 8; 7, 8, 9; 8, 9, 10; 9, 10, 11; 10, 11, 12; hoặc 11, 12, 13) của sợi có nghĩa, tính bắt đầu từ nucleotit đầu tiên, từ đầu -5'; hoặc tùy ý, tính bắt đầu từ nucleotit cặp đôi thứ nhất trong vùng sợi kép, từ đầu 5'.

Theo một phương án, i bằng 1 và j bằng 0, hoặc i bằng 0 và j bằng 1, hoặc cả i và j bằng 1. Vì vậy, sợi có nghĩa có thể được biểu thị bởi các công thức sau đây:

5' n_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3' (Ib);

5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q 3' (Ic); hoặc

5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3' (Id).

Khi sợi có nghĩa được biểu thị bởi công thức (Ib), N_b là trình tự oligonucleotit chứa 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2, hoặc 0 nucleotit cải biến. Mỗi N_a độc lập có thể là trình tự oligonucleotit chứa 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

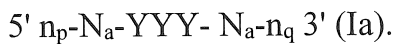
Khi sợi có nghĩa được biểu thị bởi công thức (Ic), N_b là trình tự oligonucleotit chứa 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2, hoặc 0 nucleotit cải biến. Mỗi N_a có thể độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

Khi sợi có nghĩa được biểu thị bởi công thức (Id), mỗi N_b độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2, hoặc 0 nucleotit cải biến. Tốt hơn là, N_b

bằng 0, 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6. Mỗi N_a có thể độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

Mỗi X, Y và Z có thể giống nhau hoặc khác nhau.

Theo các phương án khác, i bằng 0 và j bằng 0, và sợi có nghĩa có thể được biểu thị bởi công thức:



Khi sợi có nghĩa được biểu thị bởi công thức (Ia), mỗi N_a độc lập có thể là trình tự oligonucleotit chứa 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

Theo một phương án, trình tự sợi đối nghĩa của ARNi có thể được biểu thị bởi công thức (II):



trong đó:

k và l độc lập với nhau là 0 hoặc 1;

p' và q' độc lập với nhau là 0-6;

mỗi N_a' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-25 nucleotit cải biến, mỗi trình tự bao gồm ít nhất hai nucleotit cải biến khác nhau;

mỗi N_b' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-10 nucleotit cải biến;

mỗi n_p' và n_q' độc lập là một nucleotit nhô ra;

trong đó N_b' và Y' không có cùng cải biến; và

mỗi $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$, và $Z'Z'Z'$ độc lập là một motif gồm ba cải biến giống nhau ở ba nucleotit liền kề.

Theo một số phương án, N_a' hoặc N_b' chứa các cải biến của khuôn thay thế.

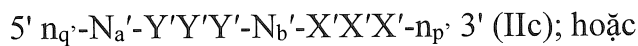
Motif $Y'Y'Y'$ xuất hiện ở hoặc ở gần vị trí phân cắt của sợi đối nghĩa. Ví dụ, khi tác nhân ARNi sợi kép có vùng sợi kép có chiều dài 17-23 nucleotit, motif $Y'Y'Y'$ có thể xuất hiện ở các vị trí 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; hoặc 13, 14, 15 của sợi đối nghĩa, tính bắt đầu từ nucleotit đầu tiên từ đầu -5'; hoặc tùy ý, tính bắt đầu

từ nucleotit cặp đôi đầu tiên trong vùng sợi kép, từ đầu 5'. Tốt hơn là, motif Y'Y'Y' xuất hiện ở các vị trí 11, 12, 13.

Theo các phương án nhất định, motif Y'Y'Y' đều là các nucleotit cải biến 2'-OMe.

Theo các phương án nhất định, k bằng 1 và l bằng 0, hoặc k bằng 0 và l bằng 1, hoặc cả k và l bằng 1.

Vì vậy, sợi đối nghĩa có thể được biểu thị bởi công thức sau đây:

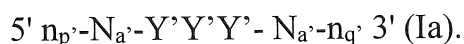


Khi sợi đối nghĩa được biểu thị bởi công thức (IIb), N_b' là trình tự oligonucleotit chứa 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2, hoặc 0 nucleotit cải biến. Mỗi N_a' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

Khi sợi đối nghĩa được biểu thị bởi công thức (IIc), N_b' là trình tự oligonucleotit chứa 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2, hoặc 0 nucleotit cải biến. Mỗi N_a' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

Khi sợi đối nghĩa được biểu thị bởi công thức (IId), mỗi N_b' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2, hoặc 0 nucleotit cải biến. Mỗi N_a' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến. Tốt hơn là, N_b bằng 0, 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6.

Theo các phương án khác, k bằng 0 và l bằng 0 và sợi đối nghĩa có thể được biểu thị bởi công thức:



Khi sợi đối nghĩa được biểu thị bởi công thức (IIa), mỗi N_a' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

Mỗi X' , Y' và Z' có thể giống nhau hoặc khác nhau.

Mỗi nucleotit của sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa có thể được cải biến độc lập với LNA, CRN, UNA, cEt, HNA, CeNA, 2'-metoxyetyl, 2'-O-metyl, 2'-O-allyl, 2'-C-

allyl, 2'-hydroxyl, hoặc 2'-flo. Ví dụ, mỗi nucleotit của sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa được cải biến độc lập với 2'-O-methyl hoặc 2'-flo. Mỗi X, Y, Z, X', Y', và Z', cụ thể, có thể là cải biến 2'-O-methyl hoặc cải biến 2'-flo.

Theo một số phương án, sợi có nghĩa của tác nhân ARNi sợi kép có thể chứa motif YYY xuất hiện ở các vị trí 9, 10, và 11 của sợi này khi vùng sợi kép là 21 nt, tính bắt đầu từ nucleotit đầu tiên từ đầu -5', hoặc tùy ý, tính bắt đầu từ nucleotit cặp đôi đầu tiên trong vùng sợi kép, từ đầu 5'; và Y là cải biến 2'-F. Sợi có nghĩa có thể còn chứa motif XXX hoặc motif ZZZ làm các cải biến biên ở đầu đối diện của vùng sợi kép; và mỗi XXX và ZZZ độc lập là cải biến 2'-OMe hoặc cải biến 2'-F.

Theo một số phương án sợi đối nghĩa có thể chứa motif Y'Y'Y' xuất hiện ở các vị trí 11, 12, 13 của sợi này, tính bắt đầu từ nucleotit đầu tiên từ đầu -5', hoặc tùy ý, tính bắt đầu từ nucleotit cặp đôi đầu tiên trong vùng sợi kép, từ đầu 5'; và Y' là 2'-O-methyl cải biến. Sợi đối nghĩa có thể còn chứa motif X'X'X' hoặc các motif Z'Z'Z' làm các cải biến biên ở đầu đối diện của vùng sợi kép; và mỗi X'X'X' và Z'Z'Z' độc lập là cải biến 2'-OMe hoặc cải biến 2'-F.

Sợi có nghĩa được biểu thị bởi công thức bất kỳ trong số các công thức (Ia), (Ib), (Ic), và (Id) nêu trên tạo thành sợi kép với sợi đối nghĩa được biểu thị bởi công thức bất kỳ trong số các công thức (IIa), (IIb), (IIc), và (IId), tương ứng.

Vì vậy, tác nhân ARNi sợi kép đề dùng trong phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa, mỗi sợi có 14 đến 30 nucleotit, sợi kép iARN này được biểu thị bởi công thức (III):

có nghĩa: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

đối nghĩa: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$

(III)

trong đó:

i, j, k, và l độc lập với nhau bằng 0 hoặc 1;

p, p', q, và q' độc lập với nhau bằng 0-6;

mỗi N_a và N_a' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-25 nucleotit cải biến, mỗi trình tự bao gồm ít nhất hai nucleotit cải biến khác nhau;

mỗi N_b và N_b' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-10 nucleotit cải biến;

trong đó mỗi n_p' , n_p , n_q' , và n_q , có thể có mặt hoặc không có mặt, độc lập là nucleotit nhô ra; và

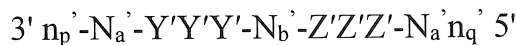
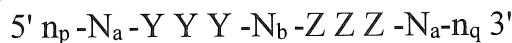
mỗi XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', và Z'Z'Z' độc lập là một motif gồm ba cải biến giống nhau ở ba nucleotit liền kề.

Theo một phương án, i bằng 0 và j bằng 0; hoặc i bằng 1 và j bằng 0; hoặc i bằng 0 và j bằng 1; hoặc cả i và j bằng 0; hoặc cả i và j bằng 1. Theo một phương án khác, k bằng 0 và l bằng 0; hoặc k bằng 1 và l bằng 0; k bằng 0 và l bằng 1; hoặc cả k và l bằng 0; hoặc cả k và l bằng 1.

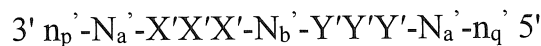
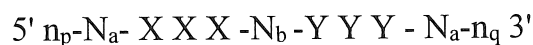
Ví dụ về tổ hợp sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa tạo thành sợi kép iARN bao gồm các công thức dưới đây:



(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIIId)

Khi tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (IIIa), mỗi N_a độc lập là

trình tự oligonucleotit chứa 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

Khi tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (IIIb), mỗi N_b độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 1-10, 1-7, 1-5, hoặc 1-4 nucleotit cải biến. Mỗi N_a độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

Khi tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (IIIc), mỗi N_b , N_b' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2, hoặc 0 nucleotit cải biến. Mỗi N_a độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

Khi tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (IIId), mỗi N_b , N_b' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2, hoặc 0 nucleotit cải biến. Mỗi N_a , N_a' độc lập là trình tự oligonucleotit chứa 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến. Mỗi N_a , N_a' , N_b , và N_b' độc lập bao gồm các cải biến của khuôn thay thế.

Mỗi X, Y, và Z trong các công thức (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), và (IIId) có thể giống nhau hoặc khác nhau.

Khi tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), và (IIId), ít nhất một trong số các nucleotit Y có thể tạo thành một cặp bazơ với một trong số các nucleotit Y'. Theo cách khác, ít nhất hai trong số các nucleotit Y tạo thành các cặp bazơ với các nucleotit Y' tương ứng; hoặc tất cả ba nucleotit Y đều tạo thành các cặp bazơ với các nucleotit Y' tương ứng.

Khi tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (IIIb) hoặc (IIId), ít nhất một trong số các nucleotit Z có thể tạo thành một cặp bazơ với một trong số các nucleotit Z'. Theo cách khác, ít nhất hai trong số các nucleotit Z tạo thành các cặp bazơ với các nucleotit Z' tương ứng; hoặc cả ba nucleotit Z tạo thành các cặp bazơ với nucleotit Z' tương ứng.

Khi tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (IIIc) hoặc (IIId), ít nhất một trong số các nucleotit X có thể tạo thành một cặp bazơ với một trong số các nucleotit X'. Theo cách khác, ít nhất hai trong số các nucleotit X tạo thành các cặp bazơ với các nucleotit X' tương ứng; hoặc cả ba nucleotit X đều tạo thành các cặp bazơ với các nucleotit X' tương ứng.

Theo các phương án nhất định, cải biến trên nucleotit Y khác với cải biến trên nucleotit Y', cải biến trên nucleotit Z khác với cải biến trên nucleotit Z', và/hoặc cải biến trên nucleotit X khác với cải biến trên nucleotit X'.

Theo các phương án nhất định, khi tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (IIIId), các cải biến N_a là các cải biến 2'-O-methyl hoặc 2'-flo. Theo các phương án khác, khi tác nhân ARNi được biểu thị bởi công thức (IIIId), các cải biến N_a là các cải biến 2'-O-methyl hoặc 2'-flo và $n_{p'} > 0$ và ít nhất một $n_{p'}$ được liên kết với một nucleotit liền kề thông qua liên kết phosphorothioat. Theo một phương án khác nữa, khi tác nhân ARNi được biểu thị bởi công thức (IIIId), các cải biến N_a là các cải biến 2'-O-methyl hoặc 2'-flo, $n_{p'} > 0$ và ít nhất một $n_{p'}$ được liên kết với nucleotit liền kề thông qua liên kết phosphorothioat, và sợi có nghĩa được tiếp hợp với một hoặc nhiều chất dẫn xuất GalNAc được gắn qua một đoạn liên kết mạch nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba (được mô tả dưới đây). Theo các phương án khác, khi tác nhân ARNi được biểu thị bởi công thức (IIIId), các cải biến N_a là các cải biến 2'-O-methyl hoặc 2'-flo, $n_{p'} > 0$ và ít nhất một $n_{p'}$ được liên kết với nucleotit liền kề thông qua liên kết phosphorothioat, sợi có nghĩa bao gồm ít nhất một liên kết phosphorothioat, và sợi có nghĩa được tiếp hợp với một hoặc nhiều chất dẫn xuất GalNAc được gắn qua một đoạn liên kết mạch nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba.

Theo một số phương án, khi tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi công thức (IIIa), các cải biến N_a là các cải biến 2'-O-methyl hoặc 2'-flo, $n_{p'} > 0$ và ít nhất một $n_{p'}$ được liên kết với nucleotit liền kề nhờ liên kết phosphorothioat, sợi có nghĩa bao gồm ít nhất một liên kết phosphorothioat, và sợi có nghĩa được tiếp hợp với một hoặc nhiều chất dẫn xuất GalNAc được gắn qua một đoạn liên kết mạch nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba.

Theo một số phương án, tác nhân ARNi sợi kép là multime chứa ít nhất hai sợi kép được biểu thị bởi công thức (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), và (IIIId), trong đó các sợi kép này được liên kết bởi một đoạn liên kết. Đoạn liên kết có thể là đoạn liên kết có thể phân cắt hoặc không thể phân cắt. Tùy ý, multime còn bao gồm phối tử. Mỗi sợi kép có thể hướng đích cùng một gen hoặc hai gen khác nhau; hoặc mỗi sợi kép có thể hướng đích cùng một gen ở hai vị trí đích khác nhau.

Theo một số phương án, tác nhân ARNi sợi kép là multime chứa ba, bốn, năm, sáu sợi kép hoặc nhiều hơn được biểu thị bởi công thức (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), và (IIId), trong đó các sợi kép được liên kết bởi một đoạn liên kết. Đoạn liên kết có thể là đoạn liên kết có thể phân cắt hoặc không thể phân cắt. Tùy ý, multime còn bao gồm phối tử. Mỗi sợi kép có thể hướng đích cùng một gen hoặc hai gen khác nhau; hoặc mỗi sợi kép có thể hướng đích cùng một gen ở hai vị trí đích khác nhau.

Theo một phương án, hai tác nhân ARNi sợi kép được biểu thị bởi ít nhất một trong số các công thức (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), và (IIId) được liên kết với nhau ở đầu 5', và một hoặc cả hai đầu 3', và tùy ý được tiếp hợp với phối tử. Mỗi tác nhân có thể hướng đích cùng một gen hoặc hai gen khác nhau; hoặc mỗi tác nhân có thể hướng đích cùng một gen ở hai vị trí đích khác nhau.

Nhiều công bố khác nhau mô tả iARN dạng multime có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế. Các công bố như vậy bao gồm patent Mỹ số 7,858,769, WO2007/091269, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887, và WO2011/031520 toàn bộ nội dung của mỗi trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Như được mô tả cụ thể hơn dưới đây, iARN chứa thể tiếp hợp của một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon với iARN có thể tối ưu hóa một hoặc nhiều đặc tính của iARN này. Trong nhiều trường hợp, gốc hydrat cacbon sẽ được gắn với dưới đơn vị cải biến của iARN. Ví dụ, đường riboza của một hoặc nhiều dưới đơn vị ribonucleotit của iARN có thể được thay bằng một gốc khác, *chẳng hạn*, chất mang không phải hydrat cacbon (tốt hơn là mạch vòng) mà phối tử hydrat cacbon được gắn vào đó. Dưới đơn vị ribonucleotit trong đó đường riboza của dưới đơn vị này đã được thay thế trong bản mô tả này được dùng để chỉ dưới đơn vị cải biến thay thế riboza (ribose replacement modification subunit - RRMS). Chất mang mạch vòng có thể là hệ nhân vòng cacbon, *nghĩa là*, tất cả các nguyên tử vòng là nguyên tử cacbon, hoặc hệ nhân dị vòng, *nghĩa là*, một hoặc nhiều nguyên tử vòng có thể là nguyên tử khác loại, *chẳng hạn*, nitơ, oxy, lưu huỳnh. Chất mang mạch vòng có thể là hệ nhân vòng đơn, hoặc có thể chứa hai vòng hoặc nhiều, *chẳng hạn* các vòng ngưng tụ. Chất mang mạch vòng có thể là hệ nhân bão hòa hoàn toàn, hoặc nó có thể chứa một hoặc nhiều liên kết đôi.

Phối tử có thể được gắn với polynucleotit *nhờ* một chất mang. Các chất mang bao gồm (i) ít nhất một “điểm gắn vào bộ khung”, tốt hơn là hai “điểm gắn vào bộ khung” và (ii) ít nhất một “điểm gắn vào đoạn nối”. “Điểm gắn vào bộ khung” trong bản mô tả này được dùng để chỉ nhóm chức, *chẳng hạn* nhóm hydroxyl, hoặc thông thường, liên kết sẵn có để, và thích hợp để kết hợp chất mang vào bộ khung, *chẳng hạn*, phosphat, hoặc phosphat được cải biến, *chẳng hạn*, bộ khung chứa lưu huỳnh của axit ribonucleic. Theo một số phương án “điểm gắn vào đoạn nối” (tethering attachment point - TAP) dùng để chỉ nguyên tử vòng cấu thành của chất mang mạch vòng, *chẳng hạn*, nguyên tử cacbon hoặc nguyên tử khác loại (khác với nguyên tử mà tạo ra điểm gắn vào bộ khung), mà liên kết gốc được chọn. Gốc này có thể là, *chẳng hạn*, hydrat cacbon, *chẳng hạn* monosacarit, disacarit, trisacarit, tetrasacarit, oligosacarit, hoặc polysacarit. Tùy ý, gốc được chọn được liên kết với chất mang mạch vòng bởi một đoạn nối xen giữa. Vì vậy, chất mang mạch vòng sẽ thường bao gồm một nhóm chức, *chẳng hạn*, nhóm amino, hoặc thông thường, tạo ra một liên kết, mà thích hợp để kết hợp hoặc nối một đơn vị cấu trúc hóa học khác, *chẳng hạn*, phối tử với vòng thành phần.

iARN có thể được tiếp hợp với phối tử *nhờ* chất mang, trong đó chất mang có thể là nhóm vòng hoặc nhóm không vòng; tốt hơn là, nhóm vòng này được chọn từ pyrrolidinyl, pyrazolinyl, pyrazolidinyl, imidazolinyl, imidazolidinyl, piperidinyl, piperazinyl, [1,3]dioxolan, oxazolidinyl, isoxazolidinyl, morpholinyl, thiazolidinyl, isothiazolidinyl, quinoxalinyl, pyridazinonyl, tetrahydrofuryl, và decalin; tốt hơn là, nhóm không vòng là bộ khung serinol hoặc bộ khung dietanolamin.

Theo các phương án nhất định, iARN là tác nhân được chọn từ các tác nhân được liệt kê trong bảng 3 và bảng 5. Theo một phương án, tác nhân iARN hướng đích các nucleotit 3221-3243 của SEQ ID NO:1. Theo một phương án, tác nhân ARNi là AD-67635 (hướng đích các nucleotit 3224-3243 của SEQ ID NO:1). Theo một phương án khác, tác nhân ARNi là AD-67637 (hướng đích các nucleotit 3223-3242 của SEQ ID NO:1). Các tác nhân này có thể chứa phối tử.

III. iARN được tiếp hợp với phối tử

Một cải biến khác của ARN của iARN theo sáng chế bao gồm cho iARN liên kết

hóa học với một hoặc nhiều phối tử, gốc hoặc thể tiếp hợp mà tăng cường hoạt tính, sự phân bố trong tế bào, hoặc sự hấp thụ trong tế bào của iARN *chẳng hạn*, vào tế bào. Các gốc như vậy bao gồm nhưng không giới hạn ở các gốc lipid như gốc cholesterol (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556), axit cholic (Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060). Theo các phương án nhất định, cải biến có thể bao gồm thioete, *chẳng hạn*, beryl-S-tritylthiol (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), thiocholesterol (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), mạch béo, *chẳng hạn*, các gốc dodecandiol hoặc undexyl (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49-54), phospholipit, *chẳng hạn*, di-hexadexyl-rac-glycerol hoặc trietyl-amoni 1,2-di-O-hexadexyl-rac-glyxero-3-phosphonat (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), mạch polyamin hoặc polyetylen glycol (Manoharan *et al.*, *nucleosits & nucleotit*, 1995, 14:969-973), hoặc axit adamantan axetic (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), gốc palmityl (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), gốc octadexylamin hoặc hexylamino-cacbonxyloxycholesterol (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

Theo các phương án nhất định, phối tử làm thay đổi sự phân bố, hướng đích hoặc thời gian tồn tại của tác nhân iARN mà nó được kết hợp vào. Theo các phương án được ưu tiên phối tử tạo ra ái lực gia tăng đối với đích lựa chọn, *chẳng hạn*, phân tử, tế bào hoặc loại, thành phần tế bào, *chẳng hạn*, thành phần tế bào hoặc cơ quan, mô, cơ quan hoặc vùng của cơ thể, *chẳng hạn như*, so với các loại không có phối tử này. Các phối tử được ưu tiên không tham gia vào việc cặp đôi sợi kép trong axit nucleic sợi kép.

Các phối tử có thể bao gồm chất xuất hiện trong tự nhiên, như protein (*chẳng hạn*, albumin huyết thanh người (human serum albumin - HSA), lipoprotein tỷ trọng thấp (low-density lipoprotein - LDL), hoặc globulin); hydrat cacbon (*chẳng hạn*, dextran, pullulan, chitin, chitosan, inulin, xyclodextrin, N-axetyl-galactosamin, hoặc axit hyaluronic); hoặc lipid. Phối tử cũng có thể là phân tử tái tổ hợp hoặc tổng hợp, như polyme tổng hợp, *chẳng hạn*, poly axit amin tổng hợp. Ví dụ về poly axit amin bao gồm poly axit amin là polylysine (PLL), poly axit L-aspartic, poly axit L-glutamic, copolyme

anhydrit axit styren-maleic, copolyme poly(L-lactide-co-glycolied), copolyme divinyl ete-maleic anhydrit, copolyme N-(2-hydroxypropyl)metacrylamit (HMPA), polyetylen glycol (PEG), rượu polyvinyl (PVA), polyuretan, poly(axit 2-etylacrylic), polyme N-isopropylacrylamit, hoặc polyphosphazin. Ví dụ về các polyamin bao gồm: polyetylenimin, polylysin (PLL), spermin, spermidin, polyamin, polyamin giả peptit, polyamin bất chức peptit, dendrime polyamine, arginin, amidin, protamin, cation lipid, cation porphyrin, muối bậc bốn của polyamin, hoặc peptit chuỗi xoắn alpha.

Các phối tử cũng có thể bao gồm các nhóm hướng đích, *chẳng hạn*, các tác nhân hướng đích tế bào hoặc mô, *chẳng hạn*, lectin, glycoprotein, lipid hoặc protein, *chẳng hạn*, kháng thể, gắn kết với một loại tế bào cụ thể như tế bào thận. Nhóm hướng đích có thể là thyrotropin, melanotropin, lectin, glycoprotein, protein bề mặt A, Mucin hydrat cacbon, lactoza đa trị, galactoza đa trị, N-axetyl-galactosamin hóa trị một hoặc đa trị, N-axetyl-gulucosamin mannoza đa trị, fucoza đa trị, poly aminoaxit được glycosyl hóa, galactoza đa trị, transferrin, bisphosphonat, polyglutamat, polyaspartat, lipid, cholesterol, steroid, axit mật, folat, vitamin B12, vitamin A, biotin, hoặc peptit RGD hoặc chất bất chức peptit RGD. Theo các phương án nhất định, phối tử là N-axetyl-galactosamin hóa trị một hoặc đa trị. Theo các phương án nhất định, phối tử là cholesterol.

Các ví dụ khác về các phối tử bao gồm thuốc nhuộm, các tác nhân can thiệp (*chẳng hạn* acridin), các chất liên kết ngang (*chẳng hạn* psoralen, mitomycin C), porphyrin (TPPC4, texaphyrin, Sapphyrin), các hydrocacbon thơm đa vòng (*chẳng hạn*, phenazin, dihydrophenazin), các endonucleaza nhân tạo (*chẳng hạn* EDTA), các phân tử ưa lipid, *chẳng hạn*, cholesterol, axit cholic, axit adamantan axetic, axit 1-pyren butyric, dihydrotestosteron, 1,3-Bis-O(hexadexyl)glyxerol, nhóm geranyloxyhexyl, hexadexylglyxerol, borneol, mentol, 1,3-propandiol, nhóm heptadexyl, axit palmitic, axit myristic, axit O3-(oleoyl)lithocholic, axit O3-(oleoyl)cholenic, dimetoxytrityl, hoặc phenoxazin) và các thể tiếp hợp peptit (*chẳng hạn*, antennapedia peptit, Tat peptit), các chất alkyl hóa, phosphat, amino, mercapto, PEG (*chẳng hạn*, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, polyamino, alkyl, alkyl được thế, các dấu chuẩn được đánh dấu phóng xạ, enzym, hapten (*chẳng hạn* biotin), các chất tạo điều kiện cho quá trình vận chuyển/hấp thụ (*chẳng hạn*, aspirin, vitamin E, axit folic), các ribonucleaza tổng hợp (*chẳng hạn*,

imidazol, bisimidazol, histamin, các cụm imidazol, thể tiếp hợp acridin-imidazol, phức hợp Eu^{3+} của các vòng lớn tetraaza), dinitrophenyl, HRP, hoặc AP.

Các phối tử có thể là protein, *chẳng hạn*, glycoprotein, hoặc peptit, *chẳng hạn*, các phân tử có ái lực đặc hiệu đối với đồng phối tử, hoặc các kháng thể *chẳng hạn*, kháng thể mà gắn kết với một loại tế bào đặc hiệu như tế bào gan. Các phối tử cũng có thể bao gồm hormon và các thụ thể hormon. Chúng cũng có thể bao gồm các loại không peptit, như lipit, lectin, hydrat cacbon, vitamin, các đồng yếu tố, lactoza đa trị, galactoza đa trị, N-acetyl-galactosamin, N-acetyl-gulucosamin mannoza đa trị, hoặc fucoza đa trị. Phối tử này có thể là, ví dụ, lipopolysacarit, chất hoạt hóa p38 MAP kinaza, hoặc chất hoạt hóa NF- κ B.

Phối tử này có thể là một chất, *chẳng hạn*, thuốc, mà có thể làm tăng độ hấp thu của tác nhân iARN vào tế bào, ví dụ, bằng cách phá vỡ bộ khung tế bào của tế bào, *chẳng hạn*, bằng cách phá vỡ cấu trúc vi ống, vi sợi hoặc các sợi trung gian của tế bào. Thuốc có thể là, ví dụ, taxon, vincristine, vinblastine, cytochalasin, nocodazole, japlakinolide, latrunculin A, phalloidin, swinholide A, indanocine, hoặc myoservin.

Theo một số phương án, phối tử gắn với iARN như được mô tả trong bản mô tả này đóng vai trò làm chất điều biến được động học (chất điều biến PK). Các chất điều biến PK bao gồm lipophiles, axit mật, steroid chất tương tự phospholipit, peptit, tác nhân gắn kết protein, PEG, vitamin v.v. Ví dụ về các chất điều biến PK bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cholesterol, axit béo, axit cholic, axit lithocholic, dialkylglyxerit, diaxylglyxerit, phospholipit, sphingolipit, naproxen, ibuprofen, vitamin E, biotin v.v. Cũng biết là oligonucleotit mà chứa một số đoạn liên kết phosphorothioat liên kết với protein huyết thanh, vì vậy các oligonucleotit ngắn, *chẳng hạn*, oligonucleotit gồm khoảng 5 bazơ, 10 bazơ, 15 bazơ, hoặc 20 bazơ, chứa nhiều đoạn liên kết phosphorothioat trong bộ khung cũng có thể dùng làm phối tử trong sáng chế này (*chẳng hạn* làm phối tử điều biến PK). Ngoài ra, các aptame gắn kết các hợp phần huyết thanh (*chẳng hạn* protein huyết thanh) cũng thích hợp để dùng làm phối tử điều biến PK trong các phương án được mô tả ở đây.

iARN được tiếp hợp với phối tử theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng oligonucleotit mang nhóm chức phản ứng lộ ra ngoài, như được dẫn xuất từ

việc gắn phân tử liên kết vào oligonucleotit (được mô tả dưới đây). Oligonucleotit phản ứng này có thể được phản ứng trực tiếp với các phối tử sẵn có trên thị trường, các phối tử được tổng hợp mang nhóm bảo vệ bất kỳ trong nhiều nhóm bảo vệ, hoặc phối tử có gốc liên kết được gắn vào nó.

Oligonucleotit được sử dụng trong thể tiếp hợp theo sáng chế có thể được tạo ra theo cách thuận tiện và thông thường nhờ kỹ thuật tổng hợp pha rắn đã biết. Thiết bị để tổng hợp như vậy được bán bởi một số nhà cung cấp bao gồm, ví dụ, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Các phương tiện khác bất kỳ để dùng cho quá trình tổng hợp như vậy đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng bổ sung hoặc thay thế. Cũng đã biết việc sử dụng các kỹ thuật tương tự để điều chế các oligonucleotit khác, như phosphorothioat và dẫn xuất được alkyl hóa.

Trong các iARN tiếp hợp phối tử và phân tử phối tử mang các nucleosit liên kết đặc hiệu trình tự theo sáng chế, oligonucleotit và oligonucleosit có thể có thể được lắp vào thiết bị tổng hợp ADN thích hợp bằng cách sử dụng các tiền chất nucleotit hoặc nucleosit tiêu chuẩn, hoặc các tiền chất tiếp hợp nucleotit hoặc nucleosit mà đã mang gốc liên kết, các tiền chất tiếp hợp phối tử-nucleotit hoặc nucleosit mà đã mang phân tử phối tử, hoặc các khối tạo dựng mang phối tử không phải nucleosit.

Khi sử dụng tiền chất tiếp hợp nucleotit đã mang gốc liên kết, quá trình tổng hợp các nucleosit liên kết đặc hiệu trình tự thường xảy ra hoàn toàn, và sau đó phân tử phối tử được phản ứng với gốc liên kết để tạo thành oligonucleotit tiếp hợp phối tử. Theo một số phương án, oligonucleotit hoặc nucleosit được liên kết theo sáng chế được tổng hợp bằng các thiết bị tổng hợp tự động có sử dụng phosphoramidit được tạo dẫn xuất từ thể tiếp hợp phối tử-nucleosit ngoài các phosphoramidit tiêu chuẩn và phosphoramidit không tiêu chuẩn có sẵn trên thị trường và thường được sử dụng trong tổng hợp oligonucleotit.

A. Thể tiếp hợp lipid

Theo các phương án nhất định, phối tử hoặc thể tiếp hợp này là lipid hoặc phân tử trên cơ sở lipid. Lipid hoặc phân tử trên cơ sở lipid như vậy tốt hơn là gắn kết với protein huyết thanh, *chẳng hạn*, albumin huyết thanh người (HSA). Phối tử gắn kết HSA cho phép phân phối thể tiếp hợp đến mô đích, *chẳng hạn*, mô đích không phải

thận của cơ thể. Ví dụ, mô đích có thể là gan, bao gồm tế bào nhu mô của gan. Các phân tử khác có thể gắn kết HSA cũng có thể được sử dụng làm phối tử. Ví dụ, có thể sử dụng naproxen hoặc aspirin. Phối tử lipit hoặc phối tử trên cơ sở lipit có thể (a) làm gia tăng tính kháng đối với sự phân giải thể tiếp hợp, (b) làm gia tăng sự hướng đích hoặc vận chuyển vào tế bào đích hoặc màng tế bào, hoặc (c) có thể được sử dụng để điều chỉnh việc gắn kết với huyết thanh protein, *chẳng hạn*, HSA.

Phối tử trên cơ sở lipit có thể được sử dụng để ức chế, *chẳng hạn*, điều chỉnh việc gắn kết giữa thể tiếp hợp với mô đích. Ví dụ, lipit hoặc phối tử trên cơ sở lipit gắn kết với HSA mạnh hơn sẽ có vẻ hướng đích thận kém hơn và do vậy có vẻ được thanh thải kém hơn khỏi cơ thể. Lipit hoặc phối tử trên cơ sở lipit gắn kết với HSA yếu hơn có thể được sử dụng để hướng thể tiếp hợp này đến thận.

Theo các phương án nhất định, phối tử trên cơ sở lipit gắn kết với HSA. Tốt hơn là, nó gắn kết HSA với ái lực đủ để thể tiếp hợp này sẽ được ưu tiên phân bố đến mô không phải thận. Tuy nhiên, tốt hơn là ái lực này không được quá mạnh tới mức việc gắn kết HSA-phối tử không thể đảo ngược được.

Theo các phương án khác, phối tử trên cơ sở lipit gắn kết HSA yếu hoặc không hề gắn kết, sao cho thể tiếp hợp sẽ được ưu tiên phân bố đến thận. Các gốc khác mà hướng đích đến tế bào thận cũng có thể được sử dụng thay cho, hoặc thêm vào, phối tử trên cơ sở lipit.

Theo một khía cạnh khác, phối tử này là một gốc, *chẳng hạn*, vitamin, mà được hấp thu bởi tế bào đích, *chẳng hạn*, tế bào tăng sinh. Các phối tử này là đặc biệt hữu hiệu để điều trị các rối loạn được đặc trưng bởi sự tăng sinh tế bào không mong muốn, *chẳng hạn*, thuộc loại ác tính hoặc không ác tính, *chẳng hạn*, tế bào ung thư. Ví dụ về các vitamin bao gồm vitamin A, E, và K. Các ví dụ khác về các vitamin bao gồm vitamin B, *chẳng hạn*, axit folic, B12, riboflavin, biotin, pyridoxal hoặc các vitamin hoặc chất dinh dưỡng khác được hấp thu bởi tế bào đích như tế bào gan. HSA và lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL) cũng được bao gồm.

B. Tác nhân thấm qua tế bào

Theo một khía cạnh khác, phối tử là tác nhân thấm qua tế bào, đặc biệt là tác nhân chuỗi xoắn thấm qua tế bào. Tốt hơn là, tác nhân này là lưỡng tính. Ví dụ về tác

nhân này là peptit như tat hoặc antennopedia. Khi tác nhân này là peptit, nó có thể được cải biến, bao gồm chất bắt chức peptidyl, invertome, các liên kết không peptit hoặc giả peptit, và sử dụng D-axit amin. Tác nhân chuỗi xoắn tốt hơn là tác nhân chuỗi xoắn alpha, tốt hơn là có pha ưa lipid và pha kỵ lipid.

Phôi tử có thể là peptit hoặc chất bắt chức peptit. Chất bắt chức peptit (trong bản mô tả này được đề cập đến như là chất bắt chức oligopeptit) là phân tử có khả năng gấp nếp thành cấu trúc ba chiều xác định tương tự như peptit tự nhiên. Việc gắn peptit và chất bắt chức peptit vào tác nhân iARN có thể ảnh hưởng đến phân bố được động học của iARN, như bằng cách gia tăng sự nhận biết và hấp thụ thuộc tế bào. Gốc peptit hoặc chất bắt chức peptit có thể có chiều dài 5-50 axit amin, *chẳng hạn*, chiều dài khoảng 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, hoặc 50 axit amin.

Peptit hoặc chất bắt chức peptit có thể là, ví dụ, peptit thấm qua tế bào, peptit cation, peptit lưỡng tính, hoặc peptit kỵ nước (*chẳng hạn*, chủ yếu bao gồm Tyr, Trp, hoặc Phe). Gốc peptit có thể là peptit dendrime, peptit không tự nhiên hoặc peptit liên kết ngang. Theo một phương án thay thế khác, gốc peptit có thể bao gồm trình tự chuyển đoạn màng (membrane translocation sequence - MTS) kỵ nước. Ví dụ về peptit chứa MTS kỵ nước là RFGF có trình tự axit amin AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 14). Chất tương tự RFGF (*chẳng hạn*, trình tự axit amin AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:15) chứa MTS kỵ nước cũng có thể là gốc hướng đích. Gốc peptit có thể là peptit “phân phối”, mà nó có thể mang các phân tử có độ phân cực lớn bao gồm peptit, oligonucleotit, và protein qua màng tế bào. Ví dụ, đã nhận thấy rằng các trình tự từ protein Tat của HIV (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO:16) và protein Drosophila Antennapedia (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:17) có khả năng hoạt động như các peptit phân phối. Peptit hoặc chất bắt chức peptit có thể được mã hóa bởi trình tự ngẫu nhiên của ADN, như peptit được nhận biết từ thư viện biểu hiện thể thực khuẩn, hoặc thư viện tổ hợp hợp chất một đính một (one-bead-one-compound - OBOC) (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991). Ví dụ về peptit hoặc chất bắt chức peptit được nối vào tác nhân ARN sợi kép nhờ một đơn vị monome kết hợp để hướng đích tế bào là peptit arginin-glyxin-axit aspartic (RGD), hoặc chất bắt chức RGD. Gốc peptit có thể có chiều dài thay đổi từ khoảng 5 axit amin đến khoảng 40 axit amin. Các gốc peptit có

thể có cải biến về mặt cấu trúc, như để làm tăng độ ổn định hoặc các đặc tính cấu tạo trực tiếp. Các cải biến cấu trúc bất kỳ được mô tả dưới đây có thể được sử dụng.

Peptit RGD để dùng trong chế phẩm và phương pháp theo sáng chế có thể là mạch thẳng hoặc mạch vòng, và có thể được cải biến, *chẳng hạn*, glycosyl hóa hoặc metyl hóa, để tạo điều kiện hướng đích đến các mô đặc hiệu. Các peptit và chất giả peptit chứa RGD có thể bao gồm D-axit amin, cũng như các chất bất chước RGD tổng hợp. Ngoài RGD, có thể sử dụng các gốc khác hướng đích phối tử integrin. Các thể tiếp hợp được ưu tiên của phối tử này hướng đích PECAM-1 hoặc VEGF.

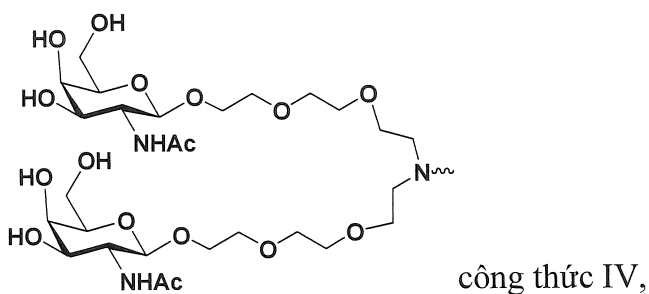
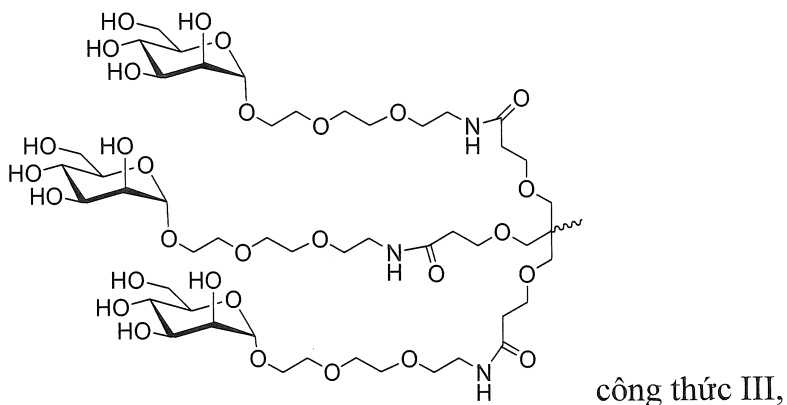
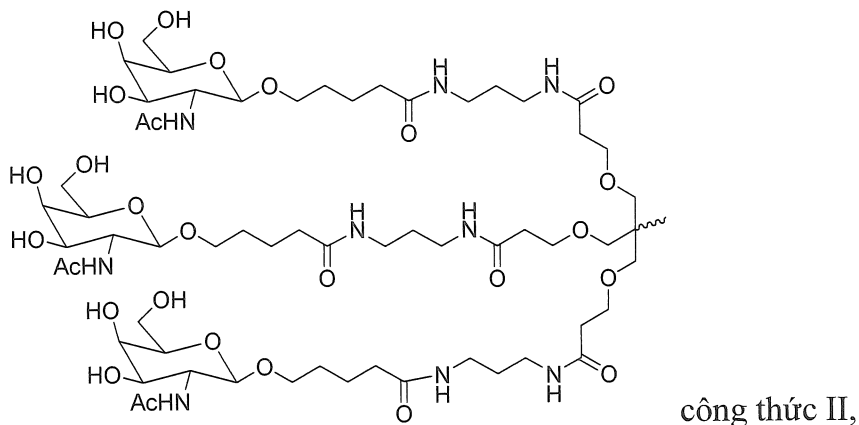
“Peptit thấm qua tế bào” có khả năng thấm qua tế bào, *chẳng hạn*, tế bào vi sinh vật, như tế bào vi khuẩn hoặc nấm mốc, hoặc tế bào của động vật có vú, như tế bào người. Peptit thấm qua tế bào vi sinh vật có thể là, ví dụ, peptit mạch thẳng chuỗi xoắn α (*chẳng hạn*, LL-37 hoặc Ceropin P1), peptit chứa liên kết disulfua (*chẳng hạn*, α -defensin, β -defensin hoặc bactenecin), hoặc peptit chỉ chứa một hoặc hai axit amin chiếm ưu thế (*chẳng hạn*, PR-39 hoặc indolicidin). Peptit thấm qua tế bào cũng có thể bao gồm tín hiệu định vị nhân (nuclear localization signal - NLS). Ví dụ, peptit thấm qua tế bào có thể là peptit lưỡng tính hai nhánh, như MPG, được tạo dẫn xuất từ miền peptit dung hợp của HIV-1 gp41 và NLS của kháng nguyên T lớn SV40 (Simeoni *et al.*, Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

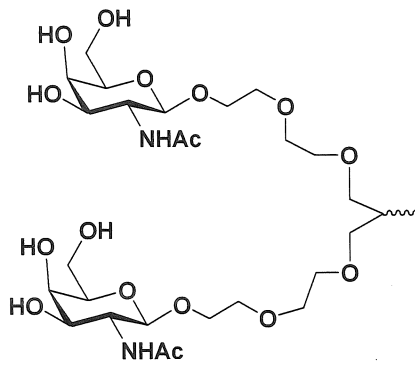
C. Thể tiếp hợp hydrat cacbon

Theo một số phương án của chế phẩm và phương pháp theo sáng chế, iARN còn chứa hydrat cacbon. iARN được tiếp hợp hydrat cacbon là có lợi để phân phối *in vivo* axit nucleic, cũng như chế phẩm thích hợp để dùng trong điều trị *in vivo*, như được mô tả trong bản mô tả này. Như được sử dụng trong bản mô tả này “hydrat cacbon” dùng để chỉ hợp chất tự bản thân là hydrat cacbon được tạo thành từ một hoặc nhiều đơn vị monosacarit có ít nhất 6 nguyên tử cacbon (có thể là mạch thẳng, mạch nhánh hoặc mạch vòng) với một nguyên tử oxy, nitơ hoặc lưu huỳnh được gắn với mỗi nguyên tử cacbon; hoặc hợp chất có một phần của nó là gốc hydrat cacbon được tạo thành từ một hoặc nhiều đơn vị monosacarit, mỗi đơn vị này có ít nhất sáu nguyên tử cacbon (có thể là mạch thẳng, mạch nhánh hoặc mạch vòng), với một nguyên tử oxy, nitơ hoặc lưu huỳnh gắn với mỗi nguyên tử cacbon. Hydrat cacbon điển hình bao gồm đường (mono-,

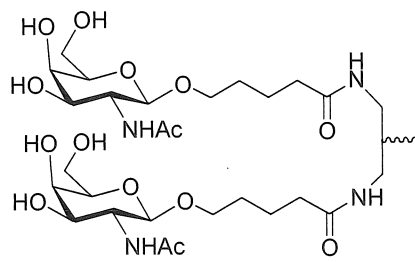
di-, tri-, và oligosacarit chứa từ khoảng 4, 5, 6, 7, 8, hoặc 9 đơn vị monosacarit), và polysacarit như tinh bột, glycogen, xenluloza và gồm polysacarit. Monosacarit cụ thể bao gồm HBV và các đường nêu trên (*chẳng hạn*, C5, C6, C7, hoặc C8); di- và trisacarit bao gồm các đường có hai hoặc ba đơn vị monosacarit (*chẳng hạn*, C5, C6, C7, hoặc C8).

Theo một phương án, thể tiếp hợp hydrat cacbon để dùng trong chế phẩm và phương pháp theo sáng chế là monosacarit. Theo một phương án khác, thể tiếp hợp hydrat cacbon để dùng trong chế phẩm và phương pháp theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm:

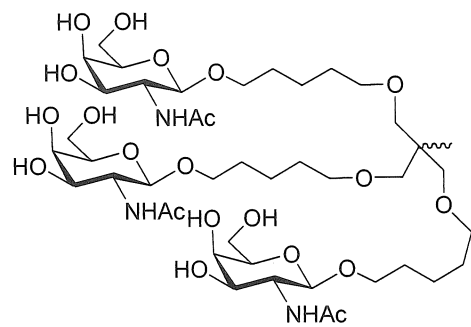




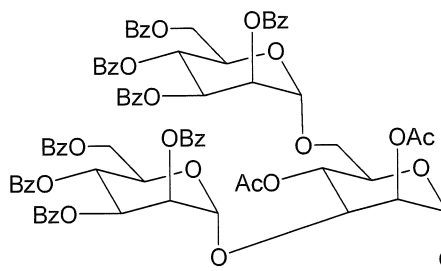
công thức V,



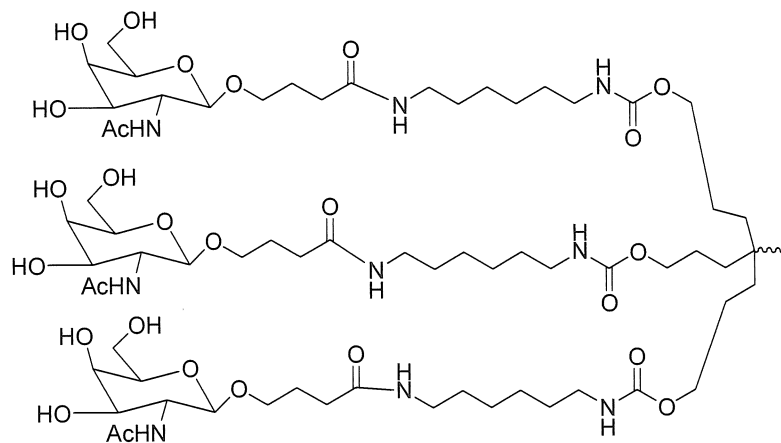
công thức VI,



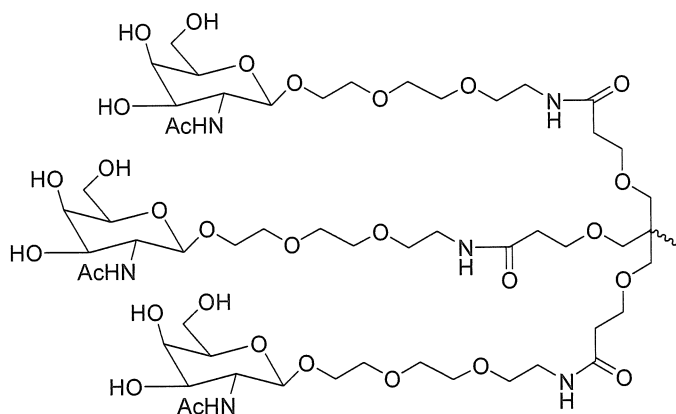
công thức VII,



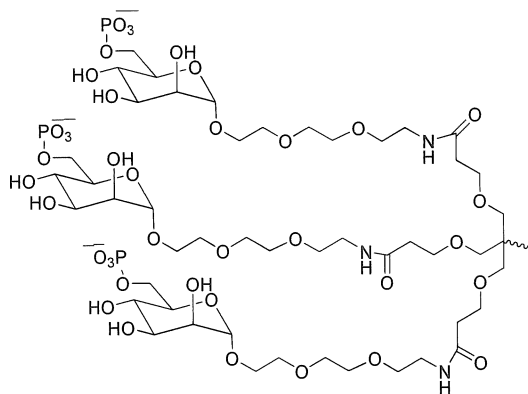
công thức VIII,



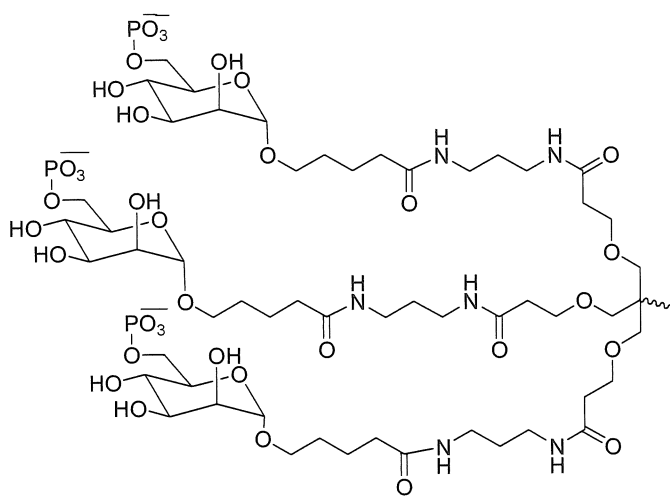
công thức IX,



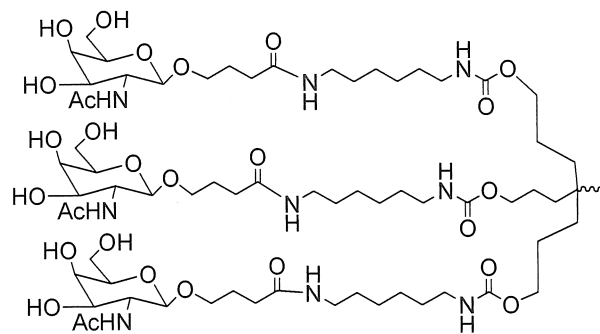
công thức X,



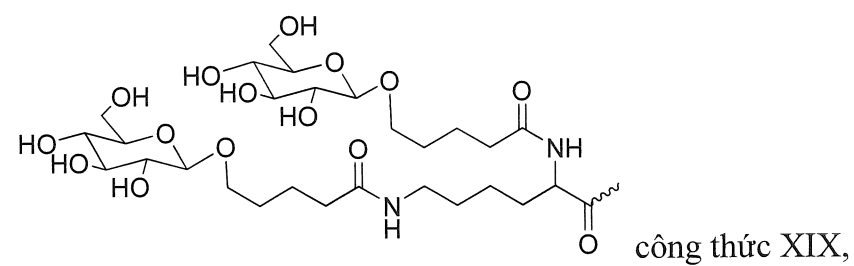
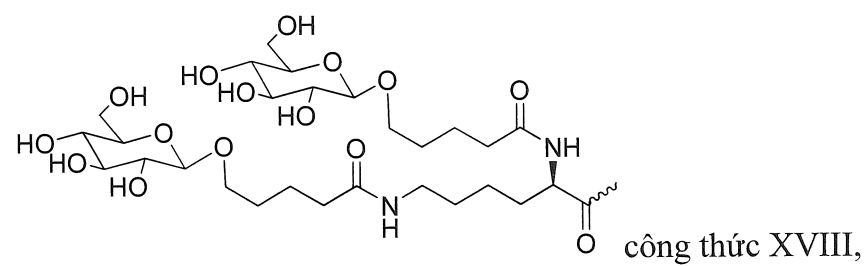
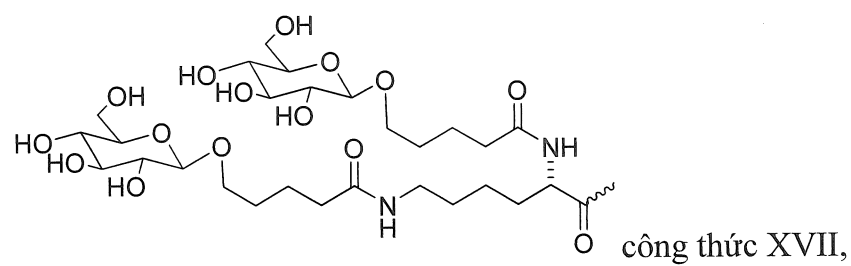
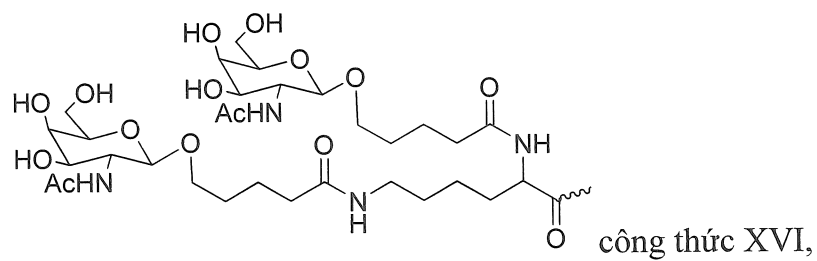
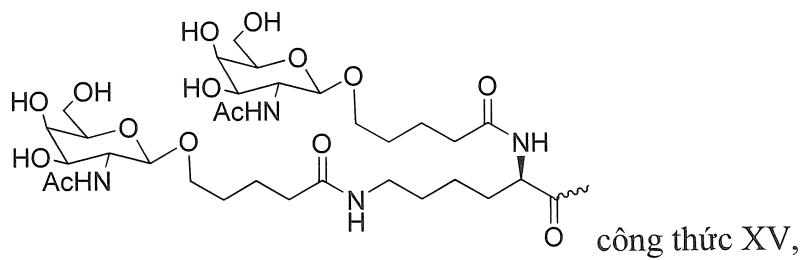
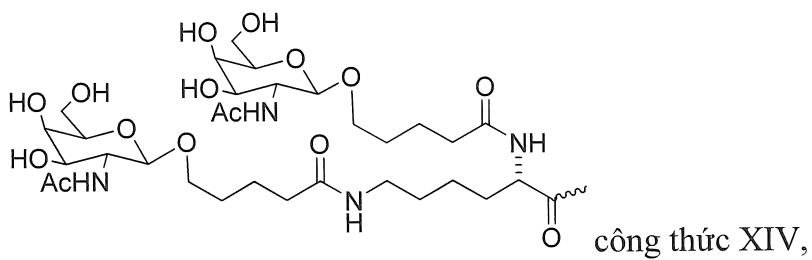
công thức XI,

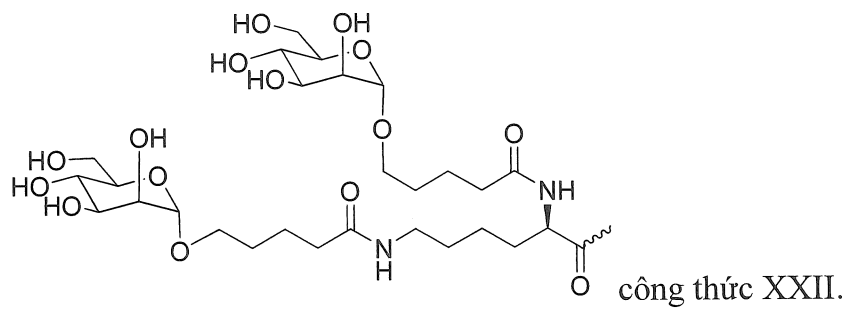
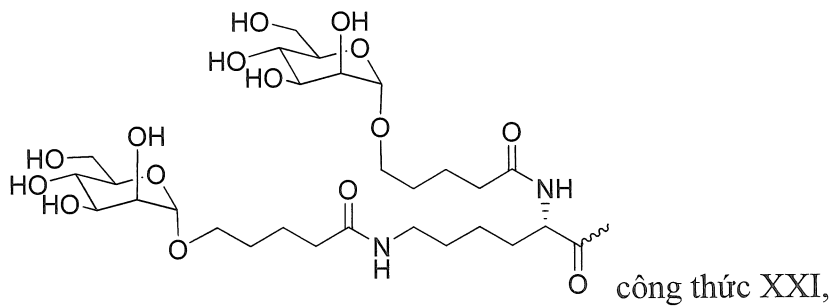
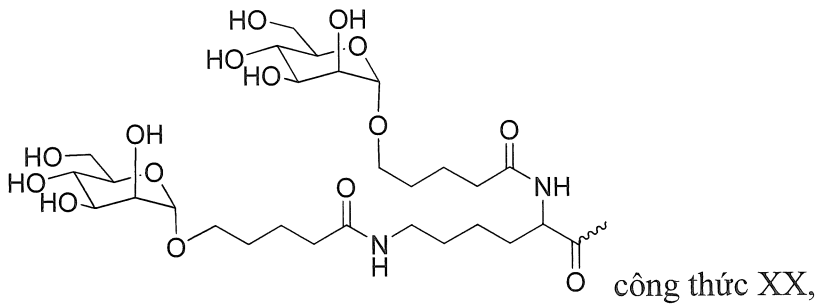


công thức XII,

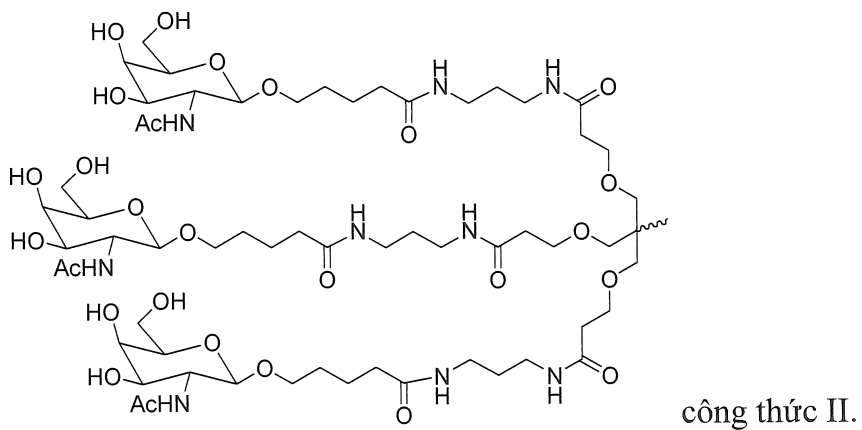


công thức XIII,

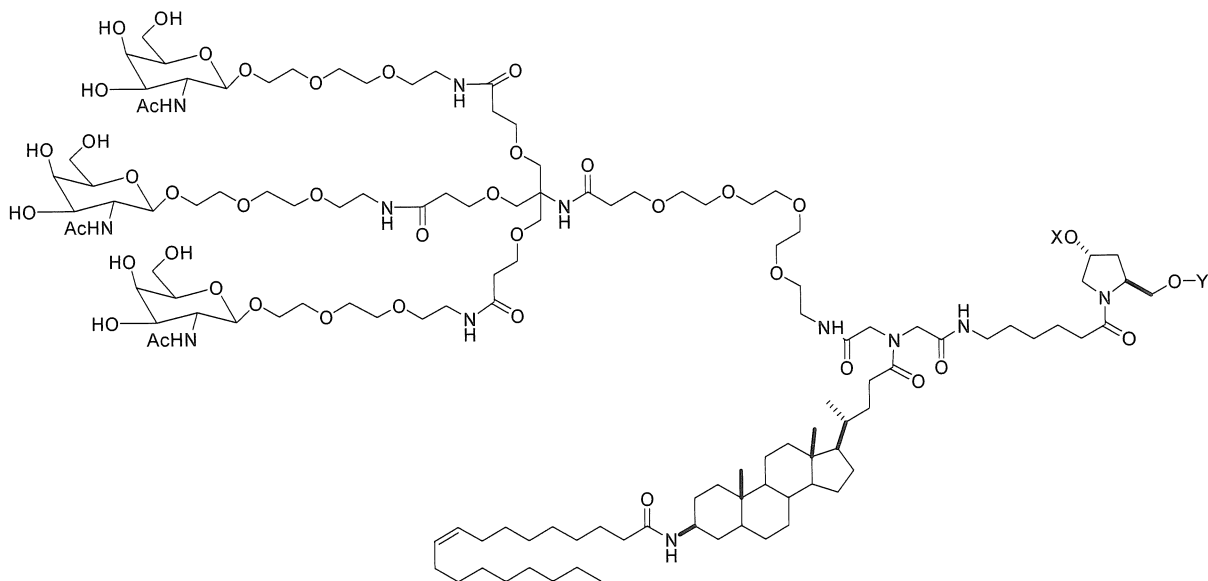




Theo một phương án, monosacarit là N-axetylgalactosamin, như



Thể tiếp hợp hydrat cacbon điển hình khác để dùng trong các phương án được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở,



(công thức XXIII),

khi một trong X hoặc Y là oligonucleotit, gốc còn lại là hydro.

Theo các phương án nhất định theo sáng chế, dẫn xuất GalNAc hoặc GalNAc được gắn với tác nhân iARN theo sáng chế qua đoạn liên kết hóa trị một. Theo một số phương án, dẫn xuất GalNAc hoặc GalNAc được gắn với tác nhân iARN theo sáng chế *qua* đoạn liên kết hóa trị hai. Theo một phương án khác nữa theo sáng chế, dẫn xuất GalNAc hoặc GalNAc được gắn với tác nhân iARN theo sáng chế *qua* đoạn liên kết hóa trị ba.

Theo một phương án, tác nhân ARNi sợi kép theo sáng chế bao gồm một dẫn xuất GalNAc hoặc GalNAc gắn với tác nhân iARN. Theo một phương án khác, tác nhân ARNi sợi kép theo sáng chế bao gồm nhiều (*chẳng hạn*, 2, 3, 4, 5, hoặc 6) dẫn xuất GalNAc hoặc GalNAc, mỗi dẫn xuất độc lập gắn với nhiều nucleotit của tác nhân ARNi sợi kép qua nhiều đoạn liên kết hóa trị một.

Theo một số phương án, ví dụ, khi hai sợi của tác nhân iARN theo sáng chế là một phần của một phân tử lớn hơn được nối bởi một chuỗi nucleotit liên tục giữa đầu 3' của một sợi và đầu 5' của sợi còn lại tương ứng tạo thành vòng cặp tóc chứa nhiều nucleotit chưa ghép đôi, mỗi nucleotit chưa ghép đôi trong vòng cặp tóc này có thể độc lập chứa một dẫn xuất GalNAc hoặc GalNAc được gắn *qua* đoạn liên kết hóa trị một. Vòng cặp tóc cũng có thể được tạo thành bởi phần nhô ra kéo dài trên một sợi của sợi kép.

Theo một số phương án, thể tiếp hợp hydrat cacbon còn chứa một hoặc nhiều phối tử khác như được mô tả trên đây, chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở, chất điều biến PK hoặc peptit thấm qua tế bào.

Các thể tiếp hợp hydrat cacbon khác thích hợp để dùng trong sáng chế bao gồm các thể tiếp hợp được mô tả trong Công bố đơn PCT số WO 2014/179620 và WO 2014/179627, toàn bộ nội dung của mỗi trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

D. Đoạn liên kết

Theo một số phương án, thể tiếp hợp hoặc phối tử được mô tả ở đây có thể được gắn với oligonucleotit của iARN bằng các đoạn liên kết khác nhau có thể là các đoạn liên kết phân cắt được hoặc không phân cắt được.

Thuật ngữ "đoạn liên kết" hoặc "nhóm liên kết" có nghĩa là gốc hữu cơ nối hai phần của hợp chất, *chẳng hạn*, gắn hai phần của một hợp chất theo cách cộng hóa trị. Các đoạn liên kết điển hình chứa một liên kết trực tiếp hoặc một nguyên tử như oxy hoặc lưu huỳnh, một đơn vị như NR₈, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH hoặc một chuỗi nguyên tử, chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở, alkyl được thế hoặc không được thế, alkenyl được thế hoặc không được thế, alkynyl được thế hoặc không được thế, arylalkyl, arylalkenyl, arylalkynyl, heteroarylalkyl, heteroarylalkenyl, heteroarylalkynyl, heteroxycylalkyl, heteroxycylalkenyl, heteroxycylalkynyl, aryl, heteroaryl, heteroxycyl, xycloalkyl, xycloalkenyl, alkylarylalkyl, alkylarylalkenyl, alkylarylalkynyl, alkenylarylalkyl, alkenylarylalkenyl, alkenylarylalkynyl, alkynylarylalkyl, alkynylarylalkenyl, alkynylarylalkynyl, alkylheteroarylalkyl, alkylheteroarylalkenyl, alkylheteroarylalkynyl, alkenylheteroarylalkenyl, alkenylheteroarylalkynyl, alkynylheteroarylalkyl, alkynylheteroarylalkenyl, alkynylheteroarylalkynyl, alkylheteroxycylalkyl, alkylheteroxycylalkenyl, alkylheteroxycylalkynyl, alkenylheteroxycylalkyl, alkenylheteroxycylalkenyl, alkenylheteroxycylalkynyl, alkynylheteroxycylalkyl, alkynylheteroxycylalkenyl, alkynylheteroxycylalkynyl, alkylaryl, alkenylaryl, alkynylaryl, alkylheteroaryl, alkenylheteroaryl, alkynylheteroaryl, một hoặc nhiều metylen có thể bị án ngữ hoặc kết thúc bởi O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), aryl được thế

hoặc không được thể, heteroaryl được thể hoặc không được thể, hoặc dị vòng được thể hoặc không được thể; trong đó R8 là hydro, axyl, gốc béo hoặc gốc béo được thể. Theo một phương án, đoạn liên kết nằm giữa khoảng 1-24 nguyên tử, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16, hoặc 8-16 nguyên tử.

Nhóm liên kết có thể phân cắt là nhóm đủ bền ở bên ngoài tế bào, nhưng ngay khi đi vào tế bào đích được phân cắt để giải phóng hai phần mà đoạn liên kết này liên kết chúng với nhau. Theo một phương án được ưu tiên, nhóm liên kết có thể phân cắt được được phân cắt nhanh hơn ít nhất khoảng 10 lần, 20, lần, 30 lần, 40 lần, 50 lần, 60 lần, 70 lần, 80 lần, 90 lần, hoặc 100 lần trong tế bào đích hoặc trong điều kiện tham chiếu thứ nhất (mà có thể, *chẳng hạn*, được lựa chọn để bắt chước hoặc miêu tả các điều kiện nội bào) trong máu của đối tượng, hoặc trong điều kiện tham chiếu thứ hai (mà có thể, *chẳng hạn*, được chọn để bắt chước hoặc miêu tả các điều kiện trong máu hoặc huyết thanh).

Nhóm liên kết có thể cắt được nhạy đối với các tác nhân phân cắt, *chẳng hạn*, pH, điện thế oxy hóa khử, hoặc sự có mặt của các phân tử phân giải. Nói chung, tác nhân phân cắt trong tế bào là phổ biến hơn hoặc được tìm thấy với lượng hoặc hoạt tính lớn hơn so với trong huyết thanh hoặc máu. Ví dụ về các tác nhân phân giải như vậy bao gồm: các chất oxy hóa khử chọn lọc đối với các cơ chất cụ thể hoặc không có tính đặc hiệu cơ chất, bao gồm, *chẳng hạn*, các enzym oxy hóa hoặc khử hoặc các chất khử như mercaptan, có mặt trong tế bào, có thể phân giải nhóm liên kết có thể phân cắt nhờ oxy hóa khử bằng cách khử; các esteraza; endosom hoặc các tác nhân có thể tạo ra môi trường axit, *chẳng hạn*, các tác nhân tạo ra độ pH bằng 5 hoặc thấp hơn; các enzym có thể thủy phân hoặc phân giải nhóm liên kết có thể phân cắt bằng axit bằng cách hoạt động như một axit nói chung, peptidaza (mà có thể đặc hiệu đối với cơ chất), và phosphataza.

Nhóm liên kết có thể phân cắt, như liên kết disulfua có thể nhạy đối với pH. Độ pH của huyết thanh người là 7,4, trong khi độ pH nội bào trung bình thấp hơn một chút, nằm trong khoảng từ khoảng 7,1-7,3. Endosom có độ pH axit hơn, nằm trong khoảng 5,5-6,0, và lysosom có độ pH axit hơn nữa ở khoảng 5,0. Một số đoạn liên kết sẽ có nhóm liên kết có thể phân cắt mà được phân cắt ở độ pH được ưu tiên, nhờ đó giải

phóng cation lipit từ phổi tử nằm trong tế bào, hoặc vào các gian mong muốn của tế bào.

Đoạn liên kết có thể bao gồm nhóm liên kết có thể phân cắt được mà có thể được phân cắt bằng một enzym cụ thể. Loại nhóm liên kết có thể phân cắt được được kết hợp vào đoạn liên kết có thể phụ thuộc vào tế bào được hướng đích. Ví dụ, phổi tử hướng đích gan có thể được liên kết với một cation lipit qua một đoạn liên kết chứa nhóm este. Tế bào gan giàu esteraza, và do vậy đoạn liên kết này sẽ được phân cắt trong tế bào gan hữu hiệu hơn trong các loại tế bào không giàu esteraza. Các loại tế bào khác giàu esteraza bao gồm các tế bào phổi, vỏ thận, và tinh hoàn.

Các đoạn liên kết chứa liên kết peptit có thể được sử dụng khi hướng đích các loại tế bào giàu peptidaza, như tế bào gan và tế bào màng hoạt dịch khớp.

Nhìn chung, sự thích hợp của một nhóm liên kết có thể phân cắt được đưa ra có thể được đánh giá bằng cách thử nghiệm khả năng của một tác nhân phân giải (hoặc điều kiện phân giải) để phân cắt nhóm liên kết được đưa ra. Cũng mong muốn thử nghiệm khả năng chống phân cắt của nhóm liên kết có thể phân cắt được nghiên cứu trong máu hoặc khi tiếp xúc với mô khác không phải mô đích. Vì vậy, có thể xác định được độ nhạy tương ứng đối với sự phân cắt giữa điều kiện thứ nhất và điều kiện thứ hai, trong đó điều kiện thứ nhất được lựa chọn để chỉ định sự phân cắt trong tế bào đích và điều kiện thứ hai được lựa chọn để chỉ định sự phân cắt trong các mô hoặc dịch sinh học khác, chẳng hạn, máu hoặc huyết thanh. Việc đánh giá có thể được thực hiện trong hệ thống không chứa tế bào, trong tế bào, trong dịch nuôi cấy tế bào, trong dịch nuôi cấy cơ quan hoặc mô, hoặc trong động vật nguyên vẹn. Cũng có thể thực hiện đánh giá ban đầu trong các điều kiện không chứa tế bào hoặc các điều kiện nuôi cấy và xác nhận bằng cách đánh giá tiếp trong động vật nguyên vẹn. Theo các phương án được ưu tiên, các hợp chất đề xuất hữu hiệu được phân cắt ở tế bào (hoặc trong các điều kiện *in vitro* được chọn để bắt chước các điều kiện nội bào) nhanh hơn ít nhất khoảng 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, hoặc 100 lần so với máu hoặc huyết thanh (hoặc trong các điều kiện *in vitro* được chọn để bắt chước các điều kiện ngoại bào).

i. Nhóm liên kết có thể phân cắt nhờ oxy hóa khử

Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có thể phân cắt là nhóm liên kết có thể phân cắt nhờ oxy hóa khử được phân cắt nhờ sự khử hoặc oxy hóa. Ví dụ về nhóm liên kết có thể phân cắt bằng cách khử là nhóm liên kết disulfua (-S-S-). Để xác định xem liệu nhóm liên kết có thể phân cắt được đề ra nào là “nhóm liên kết có thể phân cắt bằng cách khử” thích hợp hoặc ví dụ thích hợp để dùng với một gốc iARN cụ thể và tác nhân hướng đích cụ thể, có thể trông cậy vào các phương pháp được mô tả ở đây. Ví dụ, một nhóm liên kết được đề ra có thể được đánh giá bằng cách ủ với dithiothreitol (DTT), hoặc tác nhân khử khác bằng cách sử dụng các chất phản ứng đã biết trong lĩnh vực, bắt chước tốc độ phân cắt sẽ được thấy ở tế bào, *chẳng hạn*, tế bào đích. Nhóm liên kết được đề ra cũng có thể được đánh giá trong các điều kiện được chọn để bắt chước các điều kiện trong máu hoặc huyết thanh. Theo một phương án, các hợp chất được đề ra được phân cắt nhiều nhất là khoảng 10% trong máu. Theo các phương án khác, các hợp chất đề xuất hữu hiệu được phân giải ở tế bào (hoặc trong các điều kiện *in vitro* được chọn để bắt chước các điều kiện nội bào) nhanh hơn ít nhất khoảng 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, hoặc khoảng 100 lần so với máu (hoặc trong các điều kiện *in vitro* được chọn để bắt chước các điều kiện ngoại bào). Tốc độ phân cắt của các hợp chất đề xuất có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm động học enzym tiêu chuẩn trong các điều kiện được chọn để bắt chước môi trường nội bào và được so sánh với các điều kiện được chọn để bắt chước môi trường ngoại bào.

ii. Nhóm liên kết có thể phân cắt được trên cơ sở phosphat

Theo các phương án khác, đoạn liên kết có thể phân cắt được bao gồm một nhóm liên kết có thể phân cắt trên cơ sở phosphat. Nhóm liên kết có thể phân cắt được trên cơ sở phosphat được phân cắt bằng các tác nhân phân giải phân giải hoặc thủy phân nhóm phosphat này. Ví dụ về tác nhân phân cắt nhóm phosphat trong tế bào là các enzym như phosphatase trong tế bào. Ví dụ về các nhóm liên kết trên cơ sở phosphat là -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Các phương án được ưu tiên là -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, và -O-

P(S)(H)-S-. Một phương án được ưu tiên là -O-P(O)(OH)-O-. Các nhóm được đề xuất có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp tương tự như các phương pháp được nêu ở trên.

iii. Nhóm liên kết có thể phân cắt được bằng axit

Theo các phương án khác, đoạn liên kết có thể phân cắt được chứa một nhóm liên kết có thể phân cắt được bằng axit. Nhóm liên kết có thể phân cắt được bằng axit là nhóm liên kết được phân cắt trong các điều kiện axit. Theo các phương án được ưu tiên nhóm liên kết có thể phân cắt được bằng axit được phân cắt trong môi trường axit với độ pH bằng khoảng 6,5 hoặc thấp hơn (*chẳng hạn*, khoảng 6,0, 5,5, 5,0, hoặc thấp hơn), hoặc bằng các tác nhân như enzyme có thể đóng vai trò làm axit nói chung. Ở tế bào, các bào quan có độ pH thấp đặc hiệu, như endosom và lysosom có thể tạo ra môi trường phân cắt cho nhóm liên kết có thể phân cắt được bằng axit. Các ví dụ về nhóm liên kết có thể phân cắt được bằng axit bao gồm nhưng không giới hạn ở hydrazon, este, và este của các axit amin. Các nhóm có thể phân cắt được bằng axit có thể có công thức chung -C=NN-, C(O)O, hoặc -OC(O). Một phương án được ưu tiên là khi cacbon gắn với oxy của este (nhóm alkoxy) là nhóm aryl, nhóm alkyl được thế, hoặc nhóm alkyl bậc ba như dimethyl pentyl hoặc t-butyl. Các nhóm được đề xuất có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp tương tự như các phương pháp được nêu ở trên.

iv. Nhóm liên kết trên cơ sở este

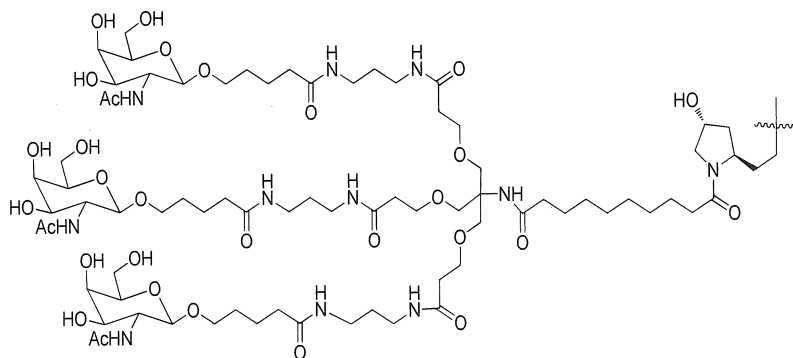
Theo các phương án khác, đoạn liên kết có thể phân cắt được bao gồm một nhóm liên kết có thể phân cắt được trên cơ sở este. Nhóm liên kết có thể phân cắt được trên cơ sở este được phân cắt bằng các enzyme như esteraza và amidaza trong tế bào. Ví dụ về các nhóm liên kết có thể phân cắt được trên cơ sở este bao gồm, nhưng không giới hạn ở, este của các nhóm alkylen, alkenylen và alkynylen. Nhóm liên kết có thể phân cắt được trên cơ sở este có công thức chung -C(O)O-, hoặc -OC(O)-. Các nhóm được đề xuất có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp tương tự như các phương pháp được nêu ở trên.

v. Nhóm phân cắt trên cơ sở peptit

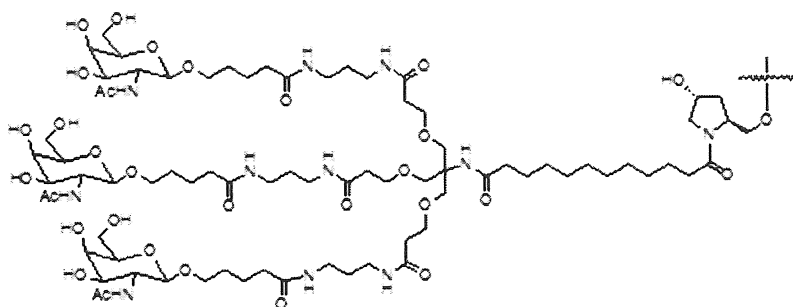
Theo một phương án khác nữa, đoạn liên kết có thể phân cắt được chứa một nhóm liên kết có thể phân cắt được trên cơ sở peptit. Nhóm liên kết có thể phân cắt

được trên cơ sở peptit được phân cắt bằng enzym như peptidaza và proteaza trong tế bào. Nhóm liên kết có thể phân cắt được trên cơ sở peptit là các liên kết peptit được tạo thành giữa các axit amin để tạo ra oligopeptit (*chẳng hạn*, dipeptit, tripeptit v.v.) và polypeptit. Nhóm có thể phân cắt được trên cơ sở peptit không bao gồm nhóm amit ($-C(O)NH-$). Nhóm amit này có thể được tạo thành giữa alkylen, alkenylen hoặc alkynelen bất kỳ. Liên kết peptit là một loại liên kết amit đặc biệt được tạo thành giữa các axit amin để tạo ra peptit và protein. Nhóm có thể phân cắt được trên cơ sở peptit thường giới hạn ở liên kết peptit (*nghĩa là*, liên kết amit) được tạo thành giữa các axit amin để tạo ra peptit và protein và không bao gồm toàn bộ nhóm chức amit. Nhóm liên kết có thể phân cắt được trên cơ sở peptit có công thức chung $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$ (SEQ ID NO: __), trong đó RA và RB là các nhóm R gồm hai axit amin liên kề. Các nhóm được đề xuất có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp tương tự như các phương pháp được nêu ở trên.

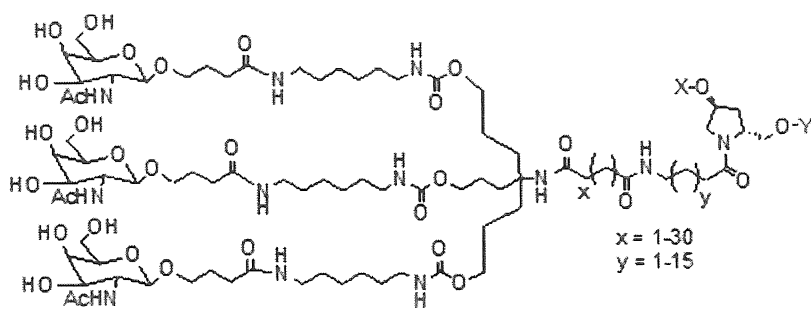
Theo một số phương án, iARN theo sáng chế được tiếp hợp với hydrat cacbon qua một đoạn liên kết. Ví dụ không giới hạn về thể tiếp hợp hydrat cacbon iARN với các đoạn liên kết của chế phẩm và phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở,



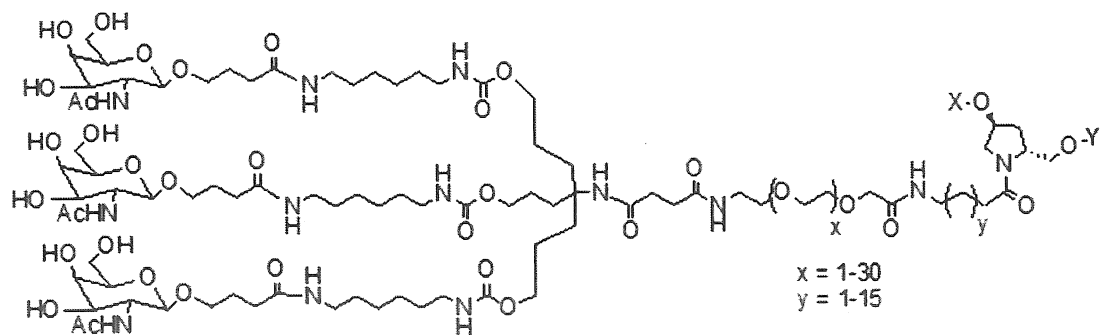
(công thức XXIV),



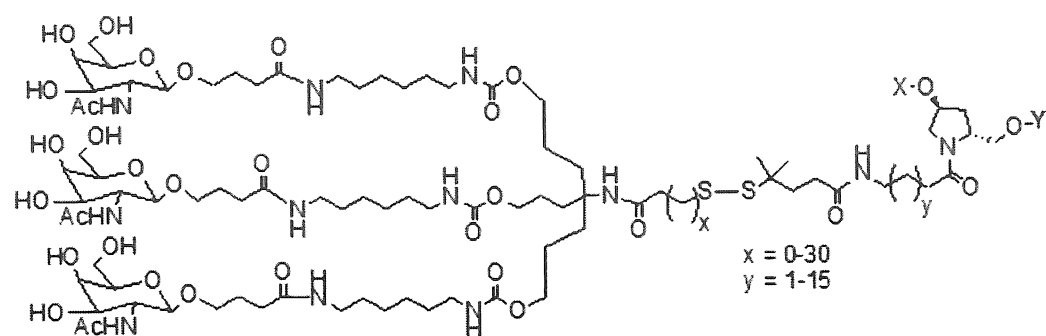
(công thức XXV),



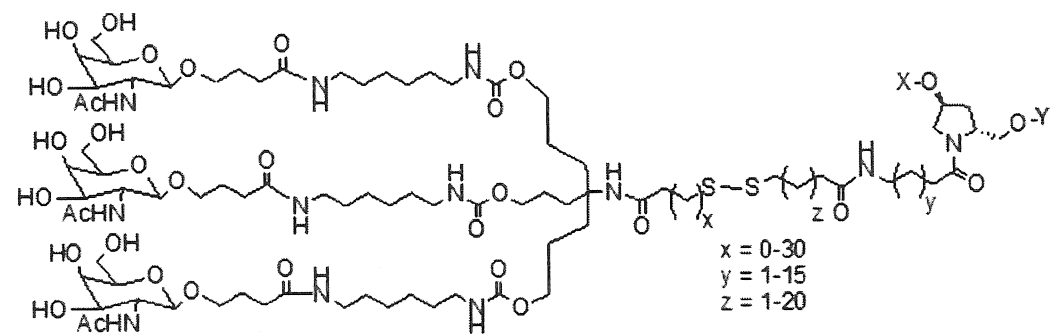
(công thức XXVI),



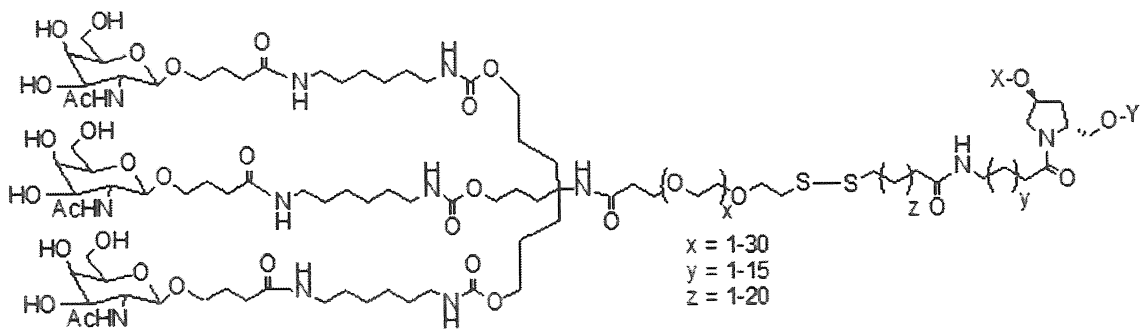
(công thức XXVII),



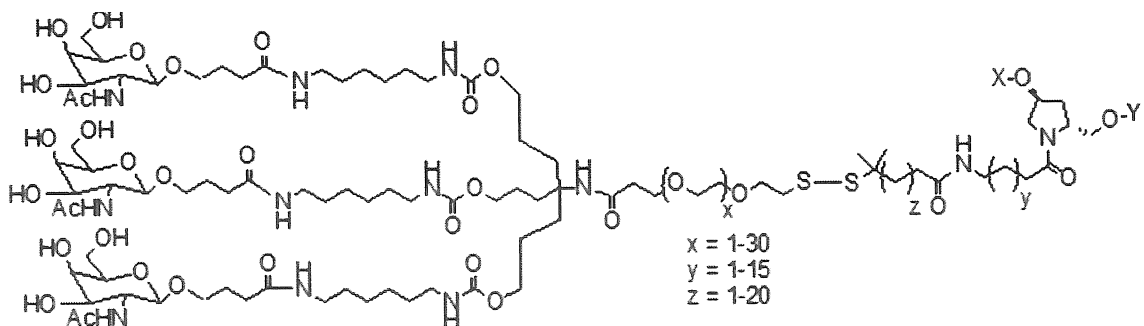
(công thức XXVIII),



(công thức XXIX),



(công thức XXX), và



(công thức XXXI),

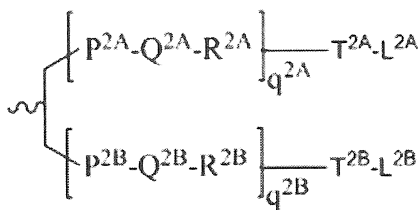
khi một trong X hoặc Y là oligonucleotit, gốc còn lại là hydro.

Theo các phương án nhất định của chế phẩm và phương pháp theo sáng chế, phối tử là một hoặc nhiều dẫn xuất “GalNAc” (N-acetylgalactosamin) được gắn qua một đoạn liên kết mạch nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba.

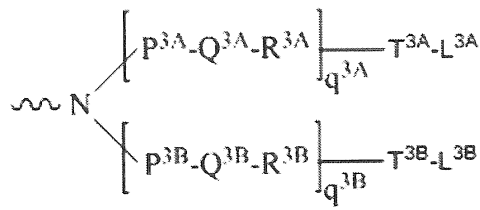
Theo các phương án nhất định, ARN sợi kép theo sáng chế được tiếp hợp với đoạn liên kết mạch nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba được chọn từ nhóm gồm các cấu trúc được chỉ ra trong công thức bất kỳ trong số các công thức (XXXII) – (XXXV):

công thức XXXII

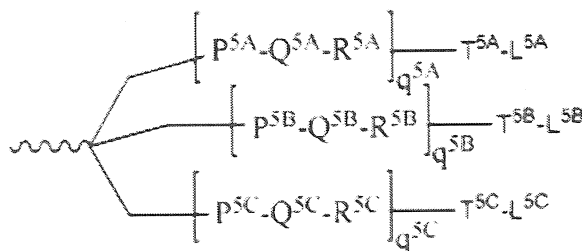
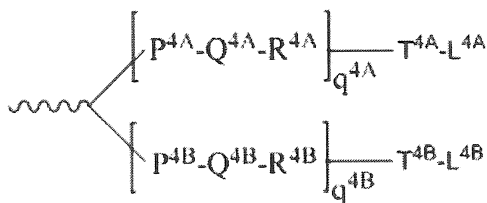
công thức XXXIII



(IV)



mula (V)



formula (VI)

c

;

công thức XXXIV

công thức XXXV

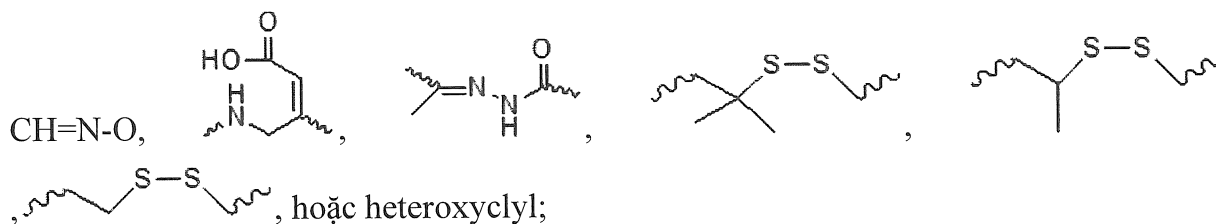
trong đó:

q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} và q^{5C} mỗi lần xuất hiện độc lập bằng 0-20 và trong đó đơn vị lặp lại có thể giống nhau hoặc khác nhau;

P^{2A} , P^{2B} , P^{3A} , P^{3B} , P^{4A} , P^{4B} , P^{5A} , P^{5B} , P^{5C} , T^{2A} , T^{2B} , T^{3A} , T^{3B} , T^{4A} , T^{4B} , T^{4A} , T^{5B} , T^{5C} mỗi lần xuất hiện độc lập là vắng mặt, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH, hoặc CH₂O;

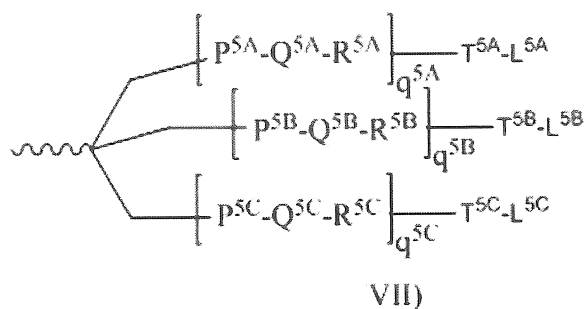
Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , Q^{5C} mỗi lần xuất hiện độc lập là vắng mặt, alkylen, alkylen được thế trong đó một hoặc nhiều metylen có thể bị án ngữ hoặc được kết thúc bằng một hoặc nhiều O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C, hoặc C(O);

R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} mỗi lần xuất hiện độc lập là vắng mặt, NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO,



L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} , và L^{5C} là phối tử; *nghĩa là* mỗi lần xuất hiện độc lập là monosacarit (như GalNAc), disacarit, trisacarit, tetrasacarit, oligosacarit, hoặc polysacarit; và R^a là H hoặc mạch bên axit amin. Các dẫn xuất GalNAc tiếp hợp hóa trị ba là đặc biệt hữu hiệu để dùng với tác nhân ARNi để ức chế sự biểu hiện của gen đích, như các dẫn xuất có công thức (XXXV):

công thức XXXV



trong đó L^{5A} , L^{5B} và L^{5C} là monosacarit, như dẫn xuất GalNAc.

Ví dụ về dẫn xuất GalNAc tiếp hợp với các nhóm liên kết mạch nhánh hóa trị hai và hóa trị ba bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các cấu trúc được nêu ở trên như các công thức II, VII, XI, X, và XIII.

Các Patent Mỹ điển hình đưa ra quy trình điều chế thể tiếp hợp ARN bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các patent Mỹ số 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928; 5,688,941; 6,294,664; 6,320,017;

6,576,752; 6,783,931; 6,900,297; 7,037,646; và 8,106,022, toàn bộ nội dung của mỗi trong số các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Tất cả các vị trí trong hợp chất được nêu không nhất thiết phải được cải biến giống nhau, và thực tế là nhiều hơn một trong các cải biến nêu trên có thể được kết hợp vào một hợp chất duy nhất hoặc thậm chí là vào một nucleosit duy nhất trong iARN. Sáng chế cũng bao gồm các hợp chất iARN là các hợp chất khảm.

Các hợp chất iARN “khảm” hoặc “thể khảm” trong sáng chế này là các hợp chất iARN, tốt hơn là tác nhân ARNi sợi kép, chứa hai hoặc nhiều hơn hai vùng khu biệt hóa học, mỗi vùng được tạo thành từ ít nhất một đơn vị monome, *nghĩa là*, nucleotit trong trường hợp hợp chất ARN sợi kép. Các iARN này thường chứa ít nhất một vùng trong đó ARN được cải biến để có được sự hấp thu ở tế bào gia tăng, hoặc ái lực gắn kết đối với axit nucleic gia tăng nhờ tính kháng gia tăng của iARN này đối với sự phân giải bởi nucleaza. Một vùng khác của iARN này có thể đóng vai trò làm cơ chất cho các enzym có khả năng phân cắt các thể lai ARN:ADN hoặc ARN:ARN. Để làm ví dụ, RNaza H là endonucleaza tế bào phân cắt sợi ARN của sợi kép ARN:ADN. Vì vậy, sự hoạt hóa RNaza H dẫn đến sự phân cắt ARN đích, nhờ đó gia tăng mạnh mẽ hiệu lực của iARN trong việc ức chế sự biểu hiện gen. Kết quả là, có thể thường thu được các kết quả có thể so sánh được với các iARNA ngắn hơn khi ARN sợi kép dạng khảm được sử dụng, so với ARN sợi kép phosphorothioat deoxy lai hóa với cùng vùng đích. Việc phân cắt đích ARN có thể thường được phát hiện bởi phương pháp điện di trên gel và, nếu cần, các kỹ thuật lai axit nucleic liên quan đã biết trong lĩnh vực.

Trong một số trường hợp, ARN của iARN có thể được cải biến bởi nhóm không phải phối tử. Một số phân tử không phải phối tử đã được tiếp hợp với iARN để tăng cường hoạt tính, sự phân bố trong tế bào hoặc sự hấp thu trong tế bào của iARN, và các quy trình để thực hiện tiếp hợp như vậy là sẵn có trong các tài liệu khoa học. Các gốc không phải phối tử như vậy bao gồm các gốc lipid, như cholesterol (Kubo, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553) có thể được sử dụng trong tác nhân theo sáng chế. Các gốc không phải phối tử bao gồm các gốc lipid, axit cholic (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), thioete, *chẳng hạn*, hexyl-S-tritylthiol (Manoharan *et al.*,

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), thiocholesterol (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), mạch béo, chẳng hạn, các gốc dodecandiol hoặc undexyl (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49), phospholipit, chẳng hạn, di-hexadexyl-rac-glyxerol hoặc trietylamoni 1,2-di-O-hexadexyl-rac-glyxero-3-H-phosphonat (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), chuỗi polyamin hoặc polyetylen glycol (Manoharan *et al.*, *nucleosits & nucleotit*, 1995, 14:969), hoặc axit adamantan axetic (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), gốc palmityl (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), hoặc gốc octadexylamin hoặc hexylamino-cacbonyl-oxycholesterol (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Các patent Mỹ tiêu biểu đề xuất quy trình điều chế các thể tiếp hợp ARN như vậy được liệt kê trên đây. Các quy trình tiếp hợp điển hình bao gồm việc tổng hợp ARN mang liên kết amino ở một hoặc nhiều vị trí của trình tự. Nhóm amino này sau đó được phản ứng với phân tử được tiếp hợp bằng cách sử dụng các chất phản ứng cặp đôi hoặc hoạt hóa thích hợp. Phản ứng tiếp hợp có thể được thực hiện với ARN vẫn còn liên kết với chất mang rắn hoặc sau khi tách ARN, trong pha dung dịch. Việc tinh chế thể tiếp hợp ARN bằng HPLC thường tạo ra thể tiếp hợp tinh khiết.

IV. Phân phối ARNi theo sáng chế

Phân phối ARNi theo sáng chế đến tế bào chẳng hạn, tế bào bên trong đối tượng, như đối tượng người (chẳng hạn, đối tượng cần dùng, như đối tượng mắc bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh có liên quan đến sự biểu hiện gen PD-L1) có thể đạt được bằng một số cách khác nhau. Ví dụ, việc phân phối có thể được thực hiện bằng cách cho tế bào tiếp xúc với ARNi theo sáng chế in vitro hoặc in vivo. Việc phân phối in vivo cũng có thể được thực hiện trực tiếp bằng cách cho đối tượng sử dụng chế phẩm chứa ARNi, chẳng hạn, ARN sợi kép. Cách khác, sự phân phối in vivo có thể được thực hiện gián tiếp bằng cách sử dụng một hoặc nhiều vector mã hóa và định hướng sự biểu hiện của ARNi. Các cách này được bàn luận thêm dưới đây.

Nói chung, phương pháp phân phối bất kỳ phân tử axit nucleic (in vitro hoặc in vivo) có thể được làm thích ứng để sử dụng với ARNi theo sáng chế (xem, chẳng hạn,

Akhtar S. and Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144 và WO94/02595, mà được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung của chúng). Để phân phối in vivo, các yếu tố xem xét để phân phối phân tử ARNi bao gồm, ví dụ, độ ổn định sinh học của phân tử được phân phối, sự ngăn chặn các tác dụng không đặc hiệu, và sự tích tụ phân tử được phân phối trong mô đích. Các tác dụng không đặc hiệu của ARNi có thể được tối thiểu hóa bằng cách dùng cục bộ, ví dụ, bằng cách tiêm trực tiếp hoặc cấy vào mô hoặc dùng tại chỗ dạng bào chế. Việc dùng cục bộ vào vị trí điều trị làm tối đa hóa nồng độ cục bộ của tác nhân, hạn chế sự tiếp xúc của tác nhân với mô toàn thân mà có thể bị gây hại bởi tác nhân hoặc có thể phân hủy tác nhân này, và cho phép dùng tổng liều lượng của phân tử ARNi thấp hơn. Một số nghiên cứu đã thể hiện sự giảm thấp thành công các sản phẩm gen khi tác nhân ARNi sợi kép được dùng cục bộ. Ví dụ, sự phân phối trong mắt của ARN sợi kép VEGF bằng cách tiêm trong thủy tinh thể ở các con khỉ cynomolgus (Tolentino, MJ, et al (2004) Retina 24:132-138) và sự tiêm dưới võng mạc ở chuột nhắt (Reich, SJ., et al (2003) Mol. Vis. 9:210-216) đều được thể hiện là làm ngăn chặn sự tân sinh mạch ở mô hình thử nghiệm thoái hóa điểm vàng do tuổi tác. Ngoài ra, sự tiêm ARN sợi kép trực tiếp trong khối u ở chuột nhắt làm giảm thể tích khối u (Pille, J., et al (2005) Mol. Ther. 11:267-274) và có thể kéo dài sự sống của chuột có khối u (Kim, WJ., et al (2006) Mol. Ther. 14:343-350; Li, S., et al (2007) Mol. Ther. 15:515-523). Sự can thiệp ARN cũng đã thể hiện thành công với sự phân phối cục bộ tới CNS bằng cách tiêm trực tiếp (Dorn, G., et al. (2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan, PH., et al (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H., et al (2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, GT., et al (2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker, ER., et al (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al (2005) J. Neurophysiol. 93:594-602) và tới phổi bằng sự dùng trong mũi (Howard, KA., et al (2006) Mol. Ther. 14:476-484; Zhang, X., et al (2004) J. Biol. Chem. 279:10677-10684; Bitko, V., et al (2005) Nat. Med. 11:50-55). Để dùng ARNi trên toàn thân để điều trị bệnh, ARN có thể được cải biến hoặc được phân phối bằng cách khác sử dụng hệ phân phối thuốc; cả hai phương pháp này đều có tác dụng ngăn chặn sự phân hủy nhanh chóng của ARN sợi kép bởi endo- và exo-nucleaza in vivo. Sự cải biến ARN hoặc chất mang được lý cũng có thể cho phép hướng đích ARNi đến mô đích và tránh được các tác dụng không trúng đích không mong muốn. Các phân tử ARNi có thể

được cải biến bằng sự tiếp hợp hóa học với các nhóm ưa béo như cholesterol để tăng cường sự hấp thu tế bào và ngăn chặn sự phân hủy. Ví dụ, ARNi được định hướng chống lại ApoB được liên hợp với gốc cholesterol ưa béo được tiêm toàn thân vào chuột và dẫn đến sự giảm thấp mRNA apoB cả trong gan và hồng tràng (Soutschek, J., et al (2004) *Nature* 432:173-178). Sự tiếp hợp của ARNi với aptamer đã thể hiện là làm ức chế sự tăng trưởng khối u và dần xếp sự thoái triển khối u ở mô hình chuột nhắt bị bệnh ung thư tuyến tiền liệt (McNamara, JO, et al (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). Theo phương án khác, ARNi có thể được phân phối bằng cách sử dụng các hệ phân phối thuốc như hạt nano, dendrime, polyme, liposom, hoặc hệ phân phối cation. Các hệ phân phối cation điện tích dương tạo điều kiện thuận lợi cho sự gắn kết của phân tử ARNi (điện tích âm) và còn tăng cường các tương tác tại màng tế bào điện tích âm để cho phép tế bào hấp thu hiệu quả ARNi. Các lipid, dendrime, hoặc polyme có tính cation có thể được gắn kết với ARNi, hoặc được cảm ứng để tạo thành nang nhỏ hoặc mixen (xem chẳng hạn, Kim SH, et al (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116) mà bao bọc ARNi. Sự tạo thành các nang nhỏ hoặc các mixen còn ngăn chặn sự phân hủy của ARNi khi được dùng toàn thân. Phương pháp để sản xuất và sử dụng các phức hợp ARNi-cation là nằm trong khả năng của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này (xem chẳng hạn, Sorensen, DR, et al (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN, et al (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS et al (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, toàn bộ nội dung của các bài viết này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn). Một số ví dụ không giới hạn về các hệ phân phối thuốc hữu dụng để phân phối ARNi trên toàn thân bao gồm DOTAP (Sorensen, DR., et al (2003), *supra*; Verma, UN, et al (2003), *supra*), Oligofectamine, "solid nucleic acid lipid particles" (Zimmermann, TS, et al (2006) *Nature* 441:111-114), cardiolipin (Chien, PY, et al (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A, et al (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), polyetylenimin (Bonnet ME, et al (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), Arg-Gly-Asp (RGD) peptit (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487), và polyamidoamin (Tomalia, DA, et al (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., et al (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). Theo một số phương án, ARNi tạo thành phức hợp với cyclodextrin để dùng toàn thân. Các phương pháp sử dụng và các dược phẩm chứa ARNi và cyclodextrin có thể tìm được

trong patent Mỹ số 7.427.605, toàn bộ nội dung của patent này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

A. Vectơ được mã hóa bằng các ARNi theo sáng chế

ARNi hướng đích gen PD-L1 có thể được biểu hiện từ các đơn vị phiên mã được chèn vào các vectơ ADN hoặc ARN (xem, chẳng hạn, Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A, et al., công bố đơn quốc tế số WO 00/22113, Conrad, công bố đơn quốc tế số WO 00/22114, và Conrad, patent Mỹ số No. 6.054.299). Sự biểu hiện có thể là tạm thời (theo thứ tự từ vài giờ đến vài tuần) hoặc kéo dài (từ vài tuần đến vài tháng hoặc lâu hơn), tùy thuộc vào cấu trúc cụ thể được sử dụng và mô đích hoặc loại tế bào đích. Các gen chuyển này có thể được đưa vào dưới dạng cấu trúc tuyến tính, plasmit vòng, hoặc vectơ virus, mà có thể là vectơ tích hợp hoặc không tích hợp. Gen chuyển cũng có thể được tạo cấu trúc để cho phép nó được kế tục như là plasmit ngoài nhiễm sắc thể (Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292).

Một sợi hoặc các sợi của ARNi có thể được phiên mã từ promoter trên vectơ biểu hiện. Nếu hai sợi riêng rẽ được biểu hiện để tạo ra, ví dụ, ARN sợi kép thì hai vectơ biểu hiện riêng rẽ này có thể được đưa đồng thời (chẳng hạn, bằng cách chuyển nhiễm hoặc gây nhiễm) vào tế bào đích. Cách khác, mỗi sợi riêng lẻ của ARN sợi kép có thể được phiên mã bằng các promoter, cả hai promoter này đều nằm trên cùng một plasmit biểu hiện. Theo một phương án, ARN sợi kép được biểu hiện dưới dạng các polynucleotit lặp nghịch đảo được nối bằng trình tự polynucleotit liên kết sao cho ARN sợi kép có cấu trúc thân và vòng.

Các vectơ biểu hiện ARNi thường là các plasmit ADN hoặc các vectơ virus. Các vectơ biểu hiện có thể tương thích với các tế bào nhân chuẩn, tốt hơn là các tế bào mà tương thích với các tế bào động vật có xương sống, có thể được sử dụng để sản xuất các cấu trúc tái tổ hợp để biểu hiện ARNi như được mô tả ở đây. Các vectơ biểu hiện tế bào nhân chuẩn đã được biết rõ trong lĩnh vực này và có sẵn từ một số nguồn cung thương mại. Điển hình là, các vectơ này được cung cấp chứa các vị trí giới hạn thuận tiện để chèn phân đoạn axit nucleic mong muốn. Sự phân phối các vectơ biểu hiện ARNi có thể là trên toàn thân, như bằng cách dùng trong tĩnh mạch hoặc trong cơ, bằng cách

dùng cho các tế bào đích được cấy bên ngoài từ bệnh nhân sau đó đưa trở lại vào bệnh nhân, hoặc bằng biện pháp bất kỳ khác mà cho phép đưa vào tế bào đích mong muốn.

Các hệ vector virus mà có thể được sử dụng với các phương pháp và các chế phẩm được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (a) các vector adenovirus; (b) các vector retrovirus, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các vector lentiviral, virus bạch cầu chuột moloney, v.v.; (c) các vector virus kết hợp adeno; (d) các vector virus herpes simplex; (e) các vector SV 40; (f) các vector polyoma virus; (g) các vector papilloma virus; (h) các vector picornavirus; (i) các vector pox virus như orthopox, chẳng hạn, các vector vaccinia virus hoặc avipox, chẳng hạn vector virus đậu chim hoặc vector virus đậu gà; và (j) adenovirus phụ thuộc trợ giúp hoặc adenovirus nhút nhát. Các virus khiếm khuyết về khả năng sao chép cũng có thể có lợi. Các vector khác nhau sẽ hoặc sẽ không được kết hợp vào hệ gen của tế bào. Các cấu trúc có thể gồm các trình tự virus để chuyển nhiễm, nếu muốn. Cách khác, cấu trúc có thể được kết hợp vào các vector có khả năng sao chép episom, chẳng hạn các vector EPV và EBV. Các cấu trúc để biểu hiện tái tổ hợp ARNi thường sẽ yêu cầu các yếu tố điều hòa, chẳng hạn, các promoter, các chất tăng cường, v.v., để đảm bảo sự biểu hiện của ARNi trong các tế bào đích. Các khía cạnh khác để xem xét đối với các vector và các cấu trúc đã được biết trong lĩnh vực này.

V. Các dược phẩm theo sáng chế

Sáng chế cũng bao gồm các dược phẩm và các chế phẩm phối chế mà chứa ARNi theo sáng chế. Theo một phương án, sáng chế đề xuất các dược phẩm chứa ARNi, như được mô tả ở đây, và chất mang dược dụng. Các dược phẩm chứa ARNi là hữu dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn kết hợp với sự biểu hiện hoặc hoạt tính của gen PD-L1. Các dược phẩm này được phối chế dựa vào phương pháp phân phối. Một ví dụ là các dược phẩm mà được phối chế để dùng toàn thân thông qua sự phân phối ngoài đường tiêu hóa, chẳng hạn, bằng cách phân phối dưới da (SC) hoặc trong tĩnh mạch (IV). Các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng với liều lượng đủ để ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng với liều lượng đủ để ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1. Nói chung, liều thích hợp của ARNi theo sáng chế sẽ nằm

trong khoảng từ khoảng 0,001 đến khoảng 200,0 milligram trên kilogram thể trọng của người nhận trên ngày, thông thường trong khoảng từ khoảng 1 đến 50 mg trên kilogram thể trọng trên ngày. Điển hình là, liều lượng thích hợp của ARNi theo sáng chế sẽ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 mg/kg đến khoảng 5,0 mg/kg, chẳng hạn, khoảng 0,3 mg/kg đến khoảng 3,0 mg/kg. Chế độ dùng liều lặp lại có thể gồm việc dùng lượng có tác dụng điều trị của ARNi trên cơ sở đều đặn, như dùng cách ngày hoặc một lần mỗi năm. Theo các phương án nhất định, ARNi được dùng khoảng một lần mỗi tháng đến khoảng một lần mỗi quý (tức là, khoảng một lần mỗi ba tháng).

Sau chế độ điều trị đầu tiên, các khóa điều trị được thực hiện với tần suất ít hơn. Ví dụ, sau khi dùng hàng tuần hoặc mỗi hai tuần trong ba tháng, việc dùng có thể được lặp lại một lần mỗi tháng, trong sáu tháng, hoặc một năm; hoặc lâu hơn.

Dược phẩm có thể được dùng một lần mỗi ngày, hoặc ARNi có thể được dùng dưới dạng hai, ba, hoặc nhiều phân liều ở các khoảng thời gian thích hợp suốt cả ngày hoặc thậm chí sử dụng cách truyền hoặc phân phối liên tục thông qua chế phẩm phối chế giải phóng có kiểm soát. Trong trường hợp đó, ARNi được chứa trong mỗi phân liều phải nhỏ hơn tương ứng để đạt được tổng liều lượng mỗi ngày. Đơn vị liều lượng cũng có thể được kết hợp để phân phối trong vài ngày, chẳng hạn, sử dụng chế phẩm phối chế giải phóng chậm thông thường mà tạo ra sự giải phóng chậm ARNi trong khoảng thời gian vài ngày. Các chế phẩm phối chế giải phóng chậm đã được biết rõ trong lĩnh vực này và đặc biệt hữu dụng để phân phối các tác nhân ở vị trí cụ thể, như có thể được sử dụng với các tác nhân theo sáng chế. Theo phương án này, đơn vị liều lượng chứa nhiều liều lượng hàng ngày tương ứng.

Theo các phương án khác, liều đơn dược phẩm có thể kéo dài, sao cho các liều tiếp theo được dùng ở khoảng thời gian không nhiều hơn 3, 4, hoặc 5 ngày, hoặc ở khoảng thời gian không nhiều hơn 1, 2, 3, hoặc 4 tuần. Theo một số phương án của sáng chế, liều đơn của dược phẩm theo sáng chế được dùng một lần mỗi tuần. Theo các phương án khác của sáng chế, liều đơn của dược phẩm theo sáng chế được dùng hai lần mỗi tháng. Theo các phương án nhất định, ARNi được dùng khoảng một lần mỗi tháng đến khoảng một lần mỗi quý (tức là, khoảng một lần mỗi ba tháng).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng các yếu tố nhất định có thể ảnh hưởng đến liều lượng và thời gian cần thiết để điều trị một cách hữu hiệu đối tượng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, độ nặng của bệnh hoặc rối loạn, các điều trị trước đó, tình trạng sức khỏe chung hoặc tuổi tác của đối tượng, và sự có mặt của các bệnh khác. Hơn nữa, việc điều trị đối tượng bằng lượng hữu hiệu trong điều trị của dược phẩm có thể bao gồm việc điều trị đơn hoặc chuỗi các điều trị. Các đánh giá liều lượng hữu hiệu và thời gian bán thải in vivo đối với các ARNi riêng rẽ được bao hàm bởi sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường hoặc trên cơ sở thử nghiệm in vivo sử dụng mô hình động vật thích hợp, như được biết trong lĩnh vực này.

Ví dụ, các mô hình động vật bị nhiễm viêm gan B được biết trong lĩnh vực này bao gồm các mô hình tinh tinh, chuột chũi, và chuột nhắt chuyển gen bị mắc HBV (Wieland, 2015. Cold Spring Harb. Perspect. Med., 5:a021469, 2015; Tennant and Gerin, 2001. ILAR Journal, 42:89-102; và Moriyama et al., 1990. Science, 248:361-364). Mô hình tinh tinh cũng có thể được sử dụng làm mô hình nhiễm viêm gan D. Một số lượng lớn các mô hình ung thư bao gồm các khối u ghép khác loại hoặc được cảm ứng hóa học đã được biết trong lĩnh vực này.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng theo nhiều cách tùy thuộc vào liệu việc điều trị cục bộ hay toàn thân là mong muốn và tùy thuộc vào vùng cần điều trị. Việc dùng có thể là cục bộ (chẳng hạn, bằng tấm dán qua da), qua phổi, chẳng hạn, bằng cách hít hoặc bơm bột hoặc khí dung, bao gồm bằng ống phun; trong khí quản, trong mũi, qua biểu bì và qua da, qua miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Việc dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dùng trong tĩnh mạch, trong động mạch, dưới da, trong phúc mạc, hoặc tiêm hoặc truyền trong cơ; dưới da, chẳng hạn, thông qua thiết bị được cấy; hoặc trong sọ, chẳng hạn, bằng cách dùng trong nhu mô, trong não thất hoặc trong tủy sống.

ARNi có thể được phân phối theo cách để hướng đích mô cụ thể (chẳng hạn, các tế bào gan).

Các dược phẩm và các chế phẩm phối chế để dùng cục bộ hoặc dùng qua da có thể bao gồm các thuốc dán qua da, thuốc mỡ, thuốc xức, kem, gel, thuốc nhỏ giọt, thuốc

đạn, thuốc phun, thuốc dạng lỏng và thuốc bột. Các chất mang dược lý thông thường, các chất nền dạng nước, dạng bột hoặc dạng dầu, các chất làm đặc và các chất tương tự có thể là cần thiết hoặc mong muốn. Bao cao su, găng tay được phủ và các loại tương tự cũng có thể là hữu dụng. Các chế phẩm phối chế cục bộ thích hợp bao gồm các chế phẩm trong đó các ARNi theo sáng chế được trộn với tác nhân phân phối cục bộ như các lipid, các liposom, các axit béo, các este axit béo, các steroid, các chất tạo chelat và các chất hoạt động bề mặt. Các lipid và các liposom thích hợp bao gồm loại trung tính (chẳng hạn, dioleoylphosphatidyl DOPE etanolamin, dimyristoylphosphatidyl cholin DMPC, distearoylphosphatidyl cholin) âm tính (chẳng hạn, dimyristoylphosphatidyl glyxerol DMPG) và có tính cation (chẳng hạn, dioleoyltetrametylaminoethyl DOTAP và dioleoylphosphatidyl etanolamin DOTMA). Các ARNi theo sáng chế có thể được bao nang trong các liposom hoặc có thể tạo thành các phức hợp với nó, cụ thể là thành các liposom có tính cation. Cách khác, các ARNi có thể được tạo phức với các lipid, cụ thể là các lipid có tính cation. Các axit béo và các este thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit arachidonic, axit oleic, axit eicosanoic, axit lauric, axit caprylic, axit capric, axit myristic, axit palmitic, axit stearic, axit linoleic, axit linolenic, dicaprat, tricaprat, monoolein, dilaurin, glyxeryl 1-monocaprat, 1-dodexylazaxycloheptan-2-on, axylcarnitin, axylcholin, hoặc C₁₋₂₀ alkyl este (chẳng hạn, isopropylmyristat IPM), monoglyxerit, diglyxerit hoặc muối được dùng của chúng). Các chế phẩm phối chế cục bộ được mô tả chi tiết trong patent Mỹ số 6.747.014, patent này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

A. Chế phẩm phối chế ARNi chứa các tổ hợp phân tử của màng

ARNi để sử dụng trong các chế phẩm và các phương pháp theo sáng chế có thể được phối chế để phân phối trong tổ hợp phân tử của màng, chẳng hạn, liposom hoặc mixen. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “liposom” được dùng để chỉ nang nhỏ gồm các lipid lưỡng tính được bố trí trong ít nhất một lớp kép, chẳng hạn, một lớp kép hoặc nhiều lớp kép. Các liposom bao gồm các nang nhỏ đơn lá và các nang nhỏ đa lá mà có màng được tạo thành từ vật chất ưa béo và phần chứa nước bên trong. Phần chứa nước này chứa ARNi. Vật chất ưa béo này phân tách phần chứa nước bên trong với phần chứa nước bên ngoài, mà thường không chứa thành phần ARNi, mặc dù trong một số ví dụ, nó có thể chứa. Các liposom là hữu dụng để vận chuyển và phân phối các thành

phần hoạt tính đến vị trí tác dụng. Vì màng liposom là tương tự về mặt cấu trúc với các màng sinh học nên khi các liposom được áp dụng cho mô, lớp kép liposom dung hợp với lớp kép của các màng tế bào. Khi sự hợp nhất giữa liposom và tế bào tiến triển, các thành phần chứa nước bên trong mà chứa ARNi được phân phối vào tế bào tại đó ARNi có thể gắn kết một cách đặc hiệu với ARN đích và có thể dàn xếp sự can thiệp ARN. Trong một số trường hợp, các liposom cũng được hướng đích một cách đặc hiệu, chẳng hạn, để hướng ARNi đến các loại tế bào nhất định.

Liposom chứa tác nhân ARNi có thể được điều chế bằng nhiều phương pháp. Theo một ví dụ, thành phần lipid của liposom được hòa tan trong chất tẩy sao cho các mixen được tạo thành với thành phần lipid. Ví dụ, thành phần lipid có thể là thể liên hợp lipid hoặc lipid cation lưỡng tính. Chất tẩy có thể có nồng độ mixen tới hạn cao và có thể là không ion. Các chất tẩy ví dụ bao gồm cholat, CHAPS, octylglucosit, deoxycholat, và lauroyl sarcosin. Dạng điều chế tác nhân ARNi sau đó được bổ sung vào các mixen mà chứa thành phần lipid. Các nhóm cation trên lipid tương tác với tác nhân ARNi và ngưng tụ xung quanh tác nhân ARNi để tạo thành liposom. Sau khi ngưng tụ, chất tẩy được loại bỏ, chẳng hạn, bằng cách thẩm tách, để tạo thành dạng điều chế liposom của tác nhân ARNi.

Nếu cần, hợp chất mang mà hỗ trợ quá trình ngưng tụ có thể được bổ sung trong phản ứng ngưng tụ, chẳng hạn, bằng cách bổ sung có kiểm soát. Ví dụ, hợp chất mang có thể là polyme ngoài axit nucleic (chẳng hạn, spermin hoặc spermidin). Độ pH cũng có thể được điều chỉnh để tạo điều kiện thuận lợi cho sự ngưng tụ.

Các phương pháp sản xuất chất dẫn phân phối polynucleotit ổn định, mà kết hợp phức hợp polynucleotit/lipid có tính cation làm các thành phần cấu trúc của chất dẫn phân phối, được mô tả thêm trong, chẳng hạn, WO 96/37194, toàn bộ nội dung của công bố đơn này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Sự tạo thành liposom cũng có thể gồm một hoặc nhiều khía cạnh của phương pháp ví dụ được mô tả trong Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987; Patent Mỹ số 4.897.355; Patent Mỹ số 5.171.678; Bangham, et al. M. Mol. Biol. 23:238, 1965; Olson, et al. Biochim. Biophys. Acta 557:9, 1979; Szoka, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4194, 1978; Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984; Kim, et al. Biochim.

Biophys. Acta 728:339, 1983; và Fukunaga, et al. Endocrinol. 115:757, 1984. Các kỹ thuật thường được sử dụng để điều chế các khối kết tụ lipit có kích cỡ thích hợp để sử dụng làm chất dẫn phân phối bao gồm kỹ thuật siêu âm và kết đông-xả đông cộng với đun (xem, chẳng hạn, Mayer, et al. Biochim. Biophys. Acta 858:161, 1986). Kỹ thuật vi tăng sôi có thể được sử dụng khi các khối kết tụ nhỏ thích hợp (50 đến 200 nm) và tương đối đồng đều là mong muốn (Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984). Các phương pháp này dễ dàng được làm cho phù hợp để đóng gói các dạng điều chế tác nhân ARNi vào trong các liposom.

Các liposom thuộc hai lớp rộng. Các liposom có tính cation là các liposom có điện tích dương mà tương tác với các phân tử axit nucleic có điện tích âm để tạo thành phức hợp ổn định. Phức hợp axit nucleic điện tích dương/liposom gắn kết với bề mặt tế bào có điện tích âm và được nội nhập trong endosom. Do độ pH có tính axit trong endosom, các liposom bị phá vỡ, giải phóng các thành phần của chúng vào tế bào chất (Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985).

Các liposom mà nhạy với độ pH hoặc có điện tích âm, bẫy các axit nucleic thay vì tạo phức hợp với nó. Vì cả axit nucleic và lipit đều có điện tích tương tự nhau, lực đẩy thay vì sự tạo thành phức hợp diễn ra. Tuy nhiên, một số axit nucleic bị bẫy trong phần bên trong chứa nước của các liposom này. Các liposom nhạy với độ pH đã được sử dụng để phân phối các axit nucleic mã hóa gen thymidin kinaza đến các đơn lớp tế bào trong môi trường. Biểu hiện của gen ngoại sinh được phát hiện trong các tế bào đích (Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274).

Một loại chế phẩm liposom chính bao gồm các phospholipit ngoài phosphatidylcholin thu được từ tự nhiên. Các chế phẩm liposom trung tính, có thể được tạo thành từ dimyristoyl phosphatidylcholin (DMPC) hoặc dipalmitoyl phosphatidylcholin (DPPC). Các chế phẩm liposom có tính anion thường được tạo thành từ dimyristoyl phosphatidylglycerol, trong khi các liposom gây dung hợp có tính anion được tạo thành chủ yếu từ dioleoyl phosphatidyletanolamin (DOPE). Loại chế phẩm liposom khác được tạo thành từ phosphatidylcholin (PC) như, ví dụ, PC đậu nành, và PC trứng. Loại khác được tạo thành từ hỗn hợp của hai hoặc nhiều phospholipit, phosphatidylcholin, và cholesterol.

Các ví dụ về các phương pháp khác để đưa liposom vào các tế bào in vitro và in vivo bao gồm các phương pháp trong các patent Mỹ số 5.283.185 và 5.171.678; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Felgner, J. Biol. Chem. 269:2550, 1994; Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307, 1993; Nabel, Human Gene Ther. 3:649, 1992; Gershon, Biochem. 32:7143, 1993; và Strauss EMBO J. 11:417, 1992.

Các hệ liposom không ion cũng đã được thử nghiệm để xác định tính hữu dụng của chúng trong việc phân phối thuốc đến da, cụ thể là các hệ chứa chất hoạt động bề mặt không ion và cholesterol. Các chế phẩm phối chế liposom không ion gồm Novasome™ I (glyxeryl dilaurat/cholesterol/polyoxyetylen-10-stearyl ete) và Novasome™ II (glyxeryl distearat/cholesterol/polyoxyetylen-10-stearyl ete) được sử dụng để phân phối cyclosporin-A đến lớp hạ bì của da chuột nhắt. Kết quả chỉ ra rằng các hệ liposom không ion này là hữu hiệu trong việc tạo điều kiện thuận lợi cho việc lắng đọng cyclosporin A vào các lớp khác của da (Hu et al. S.T.P.Pharma. Sci., 1994, 4(6) 466).

Các liposom cũng gồm các liposom “được ổn định hóa về mặt không gian”, thuật ngữ mà như được sử dụng ở đây để chỉ các liposom chứa một hoặc nhiều lipid chuyên dụng mà khi được kết hợp vào các liposom sẽ dẫn đến tuổi thọ tuần hoàn tăng cường so với các liposom thiếu các lipid chuyên dụng này. Ví dụ về các liposom được ổn định hóa về mặt không gian là các liposom trong đó một phần của phần lipid tạo thành nang nhỏ của liposom (A) chứa một hoặc nhiều glycolipit, như monosialogangliosit GM₁, hoặc (B) được dẫn xuất từ một hoặc nhiều polyme ưa nước, như gốc polyetylen glycol (PEG). Trong khi không mong muốn bị giới hạn ở giả thuyết cụ thể bất kỳ, trong lĩnh vực này, được cho là ít nhất đối với các liposom được ổn định hóa về mặt không gian chứa các gangliosit, sphingomyelin, hoặc lipid dẫn xuất từ PEG, thời gian bán thải tuần hoàn tăng cường của các liposom được ổn định hóa về mặt không gian này là thu được từ sự giảm hấp thu vào các tế bào của hệ lưới nội mô (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Các liposom khác nhau chứa một hoặc nhiều glycolipit là đã biết trong lĩnh vực này. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) đã báo cáo khả năng của monosialogangliosit GM₁, galactocerebrosit sulfat và phosphatidylinositol trong

việc cải thiện thời gian bán thải trong máu của các liposom. Các phát hiện này được giải thích chi tiết bởi Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). Patent Mỹ số 4.837.028 và WO 88/04924, đều của Allen et al., đã bộc lộ các liposom chứa (1) sphingomyelin và (2) gangliosit GM_1 hoặc galactocerebrosit sulfat este. Patent Mỹ số 5.543.152 (Webb et al.) bộc lộ các liposom chứa sphingomyelin. Các liposom chứa 1,2-sn-dimyristoylphosphatidylcholin được bộc lộ trong WO 97/13499 (Lim et al.).

Theo một số phương án, các liposom có tính cation được sử dụng. Các liposom có tính cation có ưu điểm là có thể dung hợp vào màng tế bào. Các liposom không có tính cation, mặc dù không thể dung hợp hiệu quả với màng huyết tương, lại được hấp thu bởi đại thực bào in vivo và có thể được sử dụng để phân phối các tác nhân ARNi đến đại thực bào.

Các ưu điểm khác của các liposom bao gồm: các liposom thu được từ các phospholipit tự nhiên là tương thích về mặt sinh học và có thể phân hủy sinh học; các liposom có thể kết hợp với rất nhiều nước và thuốc hòa tan trong lipid; các liposom có thể bảo vệ các ARNi được bao nang trong các khoang bên trong của chúng khỏi sự chuyển hóa và phân hủy (Rosoff, trong "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, tập 1, trang 245). Các vấn đề quan trọng trong điều chế các chế phẩm phối chế liposom là điện tích bề mặt lipid, kích cỡ nang nhỏ, và thể tích nước của các liposom.

Lipid có tính cation tổng hợp điện tích dương, N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetylamonium clorua (DOTMA) có thể được sử dụng để tạo thành các liposom nhỏ mà tương tác tự phát với axit nucleic để tạo thành các phức hợp lipid-axit nucleic mà có khả năng dung hợp với các lipid điện tích âm của màng tế bào của tế bào trong môi trường nuôi cấy mô, dẫn đến sự phân phối tác nhân ARNi (xem, chẳng hạn, Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 và patent Mỹ số 4.897.355 về phần mô tả DOTMA và sử dụng nó với ADN).

Chất tương tự DOTMA, 1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimetylamonium)propan (DOTAP) có thể được sử dụng kết hợp với phospholipit để tạo thành các nang nhỏ tạo phức hợp ADN. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) là tác nhân

hữu hiệu để phân phối các axit nucleic có tính anion cao vào các tế bào môi trường nuôi cấy mô sống, tác nhân này chứa các liposom DOTMA điện tích dương mà tương tác tự phát với polynucleotit điện tích âm để tạo thành các phức hợp. Khi các liposom điện tích dương đủ được sử dụng, điện tích thực trên các phức hợp thụ được cũng là dương. Các phức hợp điện tích dương được điều chế theo cách này được gắn tự phát với các bề mặt tế bào điện tích âm, dung hợp với màng huyết tương, và phân phối một cách hữu hiệu các axit nucleic chức năng vào, ví dụ, các tế bào nuôi cấy mô. Lipit có tính cation khác có bán trên thị trường, 1,2-bis(oleoyloxy)-3,3-(trimethylamoni)propan (“DOTAP”) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) khác với DOTMA ở chỗ các gốc oleoyl được liên kết bởi este, thay vì các liên kết ete.

Các hợp chất lipit có tính cation được báo cáo khác gồm các hợp chất mà đã được liên hợp với nhiều gốc bao gồm, ví dụ, carboxyspermin mà đã được liên hợp với một hoặc hai loại lipit và bao gồm các hợp chất như 5-carboxyspermylglyxin dioctaoleoylamit (“DOGS”) (Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin) và dipalmitoylphosphatidyletanolamin 5-carboxyspermyl-amit (“DPPE”) (xem, chẳng hạn, patent Mỹ số 5.171.678).

Thế liên hợp lipit có tính cation khác bao gồm dẫn xuất của lipit với cholesterol (“DC-Chol”) mà đã được phối chế vào các liposom kết hợp với DOPE (xem, Gao, X. và Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991). Lipopolylysin, được tạo ra bằng cách liên hợp polylysin với DOPE, đã được báo cáo là hữu hiệu để chuyển nhiễm với sự có mặt của huyết thanh (Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991). Đối với các dòng tế bào nhất định, các liposom này chứa các lipit có tính cation được liên hợp, được nêu là thể hiện độc tính thấp và cung cấp sự chuyển nhiễm hiệu quả hơn so với các chế phẩm chứa DOTMA. Các sản phẩm lipit có tính cation có bán trên thị trường khác gồm DMRIE và DMRIE-HP (Vical, La Jolla, California) và Lipofectamin (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Các lipit có tính cation khác thích hợp để phân phối oligonucleotit được mô tả trong WO 98/39359 và WO 96/37194.

Các chế phẩm phối chế liposom đặc biệt thích hợp để dùng cục bộ, các liposom thể hiện một số ưu điểm so với các chế phẩm phối chế khác. Các ưu điểm này bao gồm

giảm tác dụng phụ liên quan đến sự hấp thu toàn thân cao đối với thuốc được dùng, tăng sự tích tụ thuốc được dùng tại đích mong muốn, và khả năng dùng tác nhân ARNi vào da. Trong một số ứng dụng, các liposom được dùng để phân phối tác nhân ARNi đến các tế bào biểu bì và còn tăng cường sự xuyên thấm tác nhân ARNi vào mô da, chẳng hạn, vào da. Ví dụ, các liposom có thể được áp dụng cục bộ. Sự phân phối cục bộ các chế phẩm phối chế thuốc như các liposom đến da đã được ghi lại (xem, chẳng hạn, Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2, 405-410 và du Plessis et al., *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. và Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988; Itani, T. et al. *Gene* 56:267-276, 1987; Nicolau, C. et al. *Meth. Enz.* 149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. và Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang, C. Y. và Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987).

Các hệ liposom không ion cũng đã được thử nghiệm để xác định tính hữu dụng của chúng trong việc phân phối thuốc đến da, cụ thể là các hệ chứa chất hoạt động bề mặt không ion và cholesterol. Các chế phẩm phối chế liposom không ion gồm Novasome™ I (glyxeryl dilaurat/cholesterol/polyoxyetylen-10-stearyl ete) và Novasome™ II (glyxeryl distearat/cholesterol/polyoxyetylen-10-stearyl ete) được sử dụng để phân phối thuốc đến lớp hạ bì của da chuột nhắt. Chế phẩm phối chế với tác nhân ARNi này là hữu dụng để điều trị rối loạn ngoài da.

Các liposom mà chứa ARNi có thể được tạo khả năng biến dạng cao. Tính biến dạng này có thể tạo điều kiện cho các liposom xuyên thấm qua lỗ mà nhỏ hơn bán kính trung bình của liposom. Ví dụ, transfersome (thể xuyên thấm) là một loại liposom biến dạng. Các transfersome có thể được tạo ra bằng cách bổ sung các chất kích hoạt gờ bề mặt, thường là các chất hoạt động bề mặt, vào các chế phẩm liposom chuẩn. Các transfersome mà chứa ARNi có thể được phân phối, ví dụ, dưới da bằng cách làm nhiễm để phân phối ARNi đến các tế bào sừng trong da. Để đi qua da nguyên vẹn của động vật có vú, các nang lipit nhỏ phải đi qua chuỗi các lỗ nhỏ, mỗi lỗ với đường kính nhỏ hơn 50 nm, dưới ảnh hưởng của gradien qua da thích hợp. Ngoài ra, do các tính chất của lipit, các transfersome này có thể tự tối ưu hóa (tương thích với hình dạng của các lỗ, chẳng hạn, ở da), tự hồi phục, và có thể thường xuyên đi đến đích của chúng mà không cần phân mảnh, và thường tự tải nạp.

Các chế phẩm phối chế khác theo sáng chế được mô tả trong WO/2008/042973.

Các transfersome là thuộc loại liposom khác, và là các khối kết tụ lipit có khả năng biến dạng cao mà là các ứng viên hấp dẫn để làm các nang phân phối thuốc. Các transfersome có thể được mô tả như là các giọt lipit mà có khả năng biến dạng rất cao khiến chúng có thể dễ dàng xuyên thấm qua các lỗ mà nhỏ hơn các giọt này. Các transfersome có thể thích ứng với môi trường mà chúng được sử dụng, chẳng hạn, chúng tự tối ưu hóa (tương thích với hình dạng của các lỗ ở da), tự hồi phục, và thường xuyên đi đến đích của chúng mà không cần phân mảnh, và thường tự tải nạp. Để tạo các transfersome, có thể bổ sung các chất kích hoạt gờ bề mặt, thường là các chất hoạt động bề mặt, vào chế phẩm liposom chuẩn. Các transfersome đã được sử dụng để phân phối albumin huyết thanh đến da. Sự phân phối qua trung gian transfersome của albumin huyết thanh đã được thể hiện là hữu hiệu như là sự tiêm dưới da dung dịch chứa albumin huyết thanh.

Các chất hoạt động bề mặt có ứng dụng rộng rãi trong các chế phẩm phối chế như các nhũ tương (bao gồm các vi nhũ tương) và các liposom. Cách thông thường nhất để phân loại và xếp hạng các tính chất của nhiều loại chất hoạt động bề mặt khác nhau, cả tự nhiên và tổng hợp, là bằng cách sử dụng chỉ số cân bằng ưa nước/ưa béo (hydrophile/lipophile balance - HLB). Bản chất của nhóm ưa nước (còn được biết như là "đầu") cung cấp các biện pháp hữu dụng nhất để phân hạng các chất hoạt động bề mặt khác nhau được sử dụng trong các chế phẩm phối chế (Rieger, trong "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Nếu phân tử chất hoạt động bề mặt không được ion hóa, nó được phân loại là chất hoạt động bề mặt không ion. Các chất hoạt động bề mặt không ion có ứng dụng rộng rãi trong các sản phẩm dược phẩm và mỹ phẩm và là hữu dụng trong khoảng rộng của độ pH. Nói chung, các giá trị HLB của chúng nằm trong khoảng từ 2 đến khoảng 18 tùy thuộc vào cấu trúc của chúng. Các chất hoạt động bề mặt không ion bao gồm các este không ion như este etylen glycol, este propylen glycol, este glyxeryl, este polyglyxeryl, este sorbitan, este sucroza, và este etoxylat hóa. Các alkanolamit không ion và các ete như rượu béo etoxylat, các rượu propoxyl hóa, và các polyme khối etoxyl/propoxyl hóa cũng nằm trong nhóm này. Các chất hoạt động bề mặt

polyoxyetylen là các thành viên phổ biến nhất của nhóm chất hoạt động bề mặt không ion.

Nếu phân tử chất hoạt động bề mặt mang điện tích âm thì khi nó được hòa tan hoặc phân tán trong nước, chất hoạt động bề mặt này sẽ được phân loại là có tính anion. Các chất hoạt động bề mặt có tính anion bao gồm các carboxylat như xà phòng, axyl lactylat, axyl amit của các axit amin, các este của axit sulfuric như alkyl sulfat và alkyl sulfat được etoxyl hóa, các sulfonat như alkyl benzen sulfonat, axyl isethionat, axyl taurat và sulfosuccinat, và phosphat. Thành viên quan trọng nhất của nhóm chất hoạt động bề mặt có tính anion là các alkyl sulfat và xà phòng.

Nếu phân tử chất hoạt động bề mặt mang điện tích dương thì khi nó được hòa tan hoặc phân tán trong nước, chất hoạt động bề mặt này sẽ được phân loại là có tính cation. Các chất hoạt động bề mặt có tính cation bao gồm các muối amoni bậc bốn và các amin được etoxyl hóa. Các muối amoni bậc bốn là các thành viên thường được dùng nhất trong nhóm này.

Nếu phân tử chất hoạt động bề mặt có khả năng mang hoặc điện tích âm hoặc điện tích dương thì chất hoạt động bề mặt này được phân loại thành dạng lưỡng tính. Các chất hoạt động bề mặt lưỡng tính gồm các dẫn xuất axit acrylic, các alkylamit được thế, các N-alkylbetain và các phosphatit.

Việc sử dụng các chất hoạt động bề mặt trong sản phẩm thuốc, chế phẩm phối chế và trong các nhũ tương đã được xem xét kỹ lưỡng (Rieger, trong "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

ARNi để sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế cũng có thể được tạo ra dưới dạng chế phẩm phối chế dạng mixen. "Mixen" được định nghĩa ở đây là loại đặc biệt của hệ phân tử trong đó các phân tử lưỡng tính được sắp xếp trong cấu trúc hình cầu sao cho tất cả các phần kỵ nước của các phân tử này được hướng vào trong, để lại các phần ưa nước tiếp xúc với pha nước bao ngoài. Sự sắp xếp ngược lại sẽ tồn tại nếu môi trường là kỵ nước.

Các chế phẩm phối chế dạng mixen hỗn hợp thích hợp để phân phối qua các màng chân bì có thể được điều chế bằng cách trộn dung dịch nước của ARNi, C₈ đến C₂₂ alkyl sulphat của kim loại kiềm, và các hợp chất tạo mixen. Các hợp chất tạo

mixen được lấy làm ví dụ bao gồm lecithin, axit hyaluronic, các muối được dụng của axit hyaluronic, axit glycolic, axit lactic, chiết xuất cam cúc, chiết xuất dưa chuột, axit oleic, axit linoleic, axit linolenic, monoolein, monooleat, monolaurat, dầu lưu ly, tinh dầu hoa anh thảo, menthol, trihydroxy oxo cholanyl glyxin và các muối được dụng của nó, glyxerin, polyglyxerin, lysin, polylysin, triolein, polyoxyetylen ete và các chất tương tự của nó, polidocanol alkyl ete và các chất tương tự của nó, chenodeoxycholat, deoxycholat, và các hỗn hợp của nó. Các hợp chất tạo mixen có thể được bổ sung đồng thời hoặc sau khi bổ sung alkyl sulphat của kim loại kiềm. Các mixen hỗn hợp sẽ tạo thành với cách trộn các thành phần về cơ bản là bất kỳ nhưng phải mạnh để tạo ra các mixen cỡ nhỏ.

Theo một phương pháp, chế phẩm dạng mixen thứ nhất được điều chế, nó chứa ARNi và ít nhất alkyl sulphat của kim loại kiềm. Chế phẩm dạng mixen thứ nhất này sau đó được trộn với ít nhất ba hợp chất tạo mixen để tạo thành chế phẩm dạng mixen hỗn hợp. Theo phương pháp khác, chế phẩm dạng mixen được điều chế bằng cách trộn ARNi, alkyl sulphat của kim loại kiềm và ít nhất một hợp chất tạo mixen, sau đó bổ sung các hợp chất tạo mixen còn lại vào với sự khuấy mạnh.

Phenol hoặc m-cresol có thể được bổ sung vào chế phẩm dạng mixen hỗn hợp để ổn định hóa chế phẩm phối chế và bảo vệ chống lại sự phát triển của vi khuẩn. Cách khác, phenol hoặc m-cresol có thể được bổ sung với các thành phần tạo mixen. Tác nhân đẳng trương như glyxerin cũng có thể được bổ sung sau khi tạo thành chế phẩm dạng mixen hỗn hợp.

Để phân phối chế phẩm phối chế dạng mixen dưới dạng thuốc phun, chế phẩm phối chế có thể được nạp vào bộ phân phối sol khí và bộ phân phối này được nạp chất đầy. Chất đầy, mà dưới áp suất, là ở dạng lỏng trong bộ phân phối. Tỷ lệ các thành phần được điều chỉnh sao cho pha nước và pha chất đầy trở thành một, tức là chỉ có một pha. Nếu có hai pha, thì cần lắc bộ phân phối trước khi phân phối một phần của các thành phần trong bộ phân phối, chẳng hạn, qua van định lượng. Liều được phân phối của được chất được đầy từ van định lượng dưới dạng hạt phun mịn.

Các chất đầy có thể gồm các hợp chất cloflocarbon chứa hydro, các hợp chất floccarbon chứa hydro, dimetyl ete và dietyl ete. Theo các phương án nhất định, HFA

134a (1,1,1,2 tetrafluorêtan) có thể được sử dụng.

Nồng độ cụ thể của các thành phần thiết yếu có thể được xác định bằng thử nghiệm tương đối đơn giản. Để hấp thu qua khoang miệng, thường mong muốn là tăng, chẳng hạn, ít nhất gấp đôi hoặc gấp ba, liều lượng cho việc tiêm hoặc dùng qua đường tiêu hóa.

B. Các hạt lipid

Các ARNi, chẳng hạn, tác nhân ARNi sợi kép theo sáng chế có thể được bao nang đầy đủ trong chế phẩm phối chế lipid, chẳng hạn, LNP, hoặc hạt axit nucleic-lipid khác.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "LNP" chỉ hạt axit nucleic-lipid ổn định. Các LNP thường chứa lipid có tính cation, lipid không có tính cation, và lipid mà ngăn chặn sự kết tụ của các hạt (chẳng hạn, thể liên hợp PEG-lipid). Các LNP là cực kỳ hữu dụng để áp dụng toàn thân, vì chúng thể hiện tuổi thọ tuần hoàn kéo dài sau khi tiêm trong tĩnh mạch (i.v.) và tích tụ ở các vị trí xa (chẳng hạn, các vị trí tách biệt về mặt vật lý với vị trí dùng). Các LNP gồm "pSPLP", mà gồm phức hợp axit nucleic-tác nhân ngưng tụ được bao nang như được nêu trong công bố đơn quốc tế số WO 00/03683. Các hạt theo sáng chế thường có đường kính trung bình khoảng 50 nm đến khoảng 150 nm, điển hình hơn là khoảng 60 nm đến khoảng 130 nm, điển hình hơn là khoảng 70 nm đến khoảng 110 nm, điển hình nhất là khoảng 70 nm đến khoảng 90 nm, và về cơ bản là không độc. Ngoài ra, các axit nucleic nếu có mặt trong các hạt axit nucleic-lipid theo sáng chế trong dung dịch nước là có tính kháng đối với sự phân hủy bởi nucleaza. Các hạt axit nucleic-lipid và phương pháp điều chế chúng được bộc lộ trong, chẳng hạn, các patent Mỹ số 5.976.567; 5.981.501; 6.534.484; 6.586.410; 6.815.432; công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2010/0324120 và công bố đơn quốc tế số WO 96/40964.

Theo một phương án, tỷ lệ lipid trên thuốc (tỷ lệ khối lượng/khối lượng) (chẳng hạn, tỷ lệ lipid trên ARN sợi kép) sẽ nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 50:1, từ khoảng 1:1 đến khoảng 25:1, từ khoảng 3:1 đến khoảng 15:1, từ khoảng 4:1 đến khoảng 10:1, từ khoảng 5:1 đến khoảng 9:1, hoặc khoảng 6:1 đến khoảng 9:1. Các khoảng nằm giữa các khoảng nêu trên cũng được dự tính là một phần của sáng chế.

Lipit có tính cation có thể là, ví dụ, N,N-dioleoyl-N,N-dimethylamoni clorua (DODAC), N,N-distearyl-N,N-dimethylamoni bromua (DDAB), N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylamoni clorua (DOTAP), N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylamoni clorua (DOTMA), N,N-dimetyl-2,3-dioleoyloxy)propylamin (DODMA), 1,2-DiLinoleyloxy-N,N-dimetylaminopropan (DLinDMA), 1,2-Dilinolenyloxy-N,N-dimetylaminopropan (DLinDMA), 1,2-Dilinoleyloxy-3-dimetylaminopropan (DLin-C-DAP), 1,2-Dilinoleyloxy-3-(dimethylamino)axetoxipropan (DLin-DAC), 1,2-Dilinoleyloxy-3-morpholinopropan (DLin-MA), 1,2-Dilinoleoyl-3-dimetylaminopropan (DLinDAP), 1,2-Dilinoleyloxy-3-dimetylaminopropan (DLin-S-DMA), 1-Linoleoyl-2-linoleyloxy-3-dimetylaminopropan (DLin-2-DMA), muối 1,2-Dilinoleyloxy-3-trimetylaminopropan clorua (DLin-TMA.Cl), muối 1,2-Dilinoleoyl-3-trimetylaminopropan clorua (DLin-TAP.Cl), 1,2-Dilinoleyloxy-3-(N-metylpipezazino)propan (DLin-MPZ), hoặc 3-(N,N-Dilinoleylamino)-1,2-propandiol (DLinAP), 3-(N,N-Dioleoylamino)-1,2-propandiol (DOAP), 1,2-Dilinoleyloxy-3-(2-N,N-dimetylaminometyl)etoxipropan (DLin-EG-DMA), 1,2-Dilinolenyloxy-N,N-dimetylaminopropan (DLinDMA), 2,2-Dilinoleyloxy-4-dimetylaminometyl-[1,3]-dioxolan (DLin-K-DMA) hoặc các chất tương tự của chúng, (3aR,5s,6aS)-N,N-dimetyl-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienyl)tetrahydro-3aH-xyclopenta[d][1,3]dioxol-5-amin (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(dimethylamino)butanoat (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-(bis(2-hydroxydodecyl)amino)etyl)(2-hydroxydodecyl)amino)etyl)piperazin-1-yl)etylazandiyl)didodecan-2-ol (Tech G1), hoặc hỗn hợp của chúng. Lipit có tính cation có thể chiếm từ khoảng 20%mol đến khoảng 50%mol hoặc khoảng 40%mol của tổng lượng lipit có trong hạt.

Theo một số phương án, hợp chất 2,2-Dilinoleyloxy-4-dimetylaminometyl-[1,3]-dioxolan có thể được sử dụng để điều chế các hạt nano lipit-ARNi.

Theo một số phương án, hạt lipit-ARNi chứa 40% 2,2-Dilinoleyloxy-4-dimetylaminometyl-[1,3]-dioxolan: 10% DSPC: 40% Cholesterol: 10% PEG-C-DOMG (phần trăm mol) với cỡ hạt là $63,0 \pm 20$ nm và tỷ lệ ARNi/lipit là 0,027.

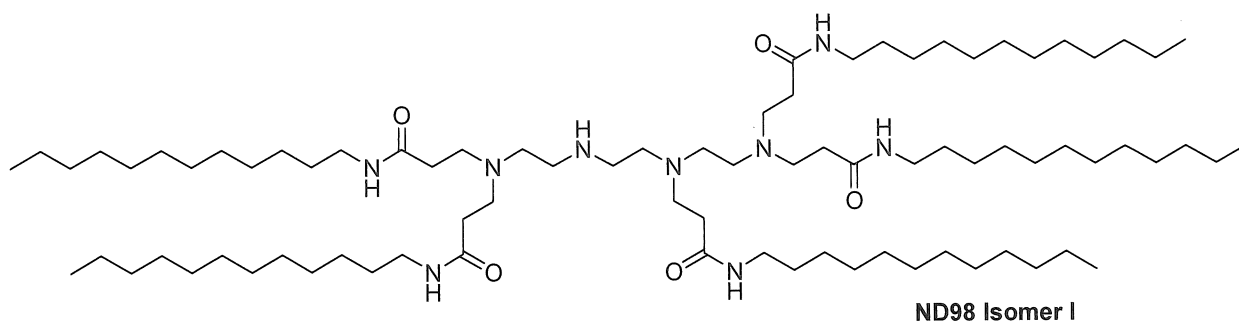
Lipit có thể ion hóa/không có tính cation có thể là lipit có tính anion hoặc lipit trung tính bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, distearoylphosphatidylcholin (DSPC), dioleoylphosphatidylcholin (DOPC), dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), dioleoylphosphatidylglyxerol (DOPG), dipalmitoylphosphatidylglyxerol (DPPG), dioleoyl-phosphatidyletanolamin (DOPE), palmitoyl-oleoylphosphatidylcholin (POPC), palmitoyl-oleoylphosphatidyletanolamin (POPE), dioleoyl-phosphatidyletanolamin 4-(N-maleimidometyl)-xyclohexan-1-carboxylat (DOPE-mal), dipalmitoyl phosphatidyl etanolamin (DPPE), dimyristoylphosphoetanolamin (DMPE), distearoyl-phosphatidyletanolamin (DSPE), 16-O-monometyl PE, 16-O-dimetyl PE, 18-1-trans PE, 1-stearoyl-2-oleoyl-phosphatidyletanolamin (SOPE), cholesterol, hoặc hỗn hợp của chúng. Lipit không có tính cation có thể chiếm từ khoảng 5%mol đến khoảng 90%mol, khoảng 10%mol, hoặc khoảng 58%mol nếu cholesterol được chứa, của tổng lượng lipit có trong hạt.

Lipit được liên hợp mà ức chế sự kết tụ của các hạt có thể là, ví dụ, polyetylen glycol (PEG)-lipit bao gồm, không chỉ giới hạn ở, PEG-diaxylglyxerol (DAG), PEG-dialkyloxypropyl (DAA), PEG-phospholipit, PEG-ceramit (Cer), hoặc hỗn hợp của chúng. Thẻ liên hợp PEG-DAA có thể là, ví dụ, PEG-dilauryloxypropyl (C₁₂), PEG-dimyristyloxypropyl (C₁₄), PEG-dipalmitoyloxypropyl (C₁₆), hoặc PEG-distearoyloxypropyl (C₁₈). Lipit được liên hợp mà ngăn chặn sự kết tụ của các hạt có thể chiếm từ 0%mol đến khoảng 20%mol hoặc khoảng 2%mol của tổng lượng lipit có trong hạt.

Theo một số phương án, hạt axit nucleic-lipit còn chứa cholesterol với lượng, chẳng hạn, khoảng 10%mol đến khoảng 60%mol hoặc khoảng 48%mol của tổng lượng lipit có trong hạt.

Theo một phương án, lipidoit ND98·4HCl (MW 1487) (xem US20090023673, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn), Cholesterol (Sigma-Aldrich), và PEG-Ceramit C16 (Avanti Polar Lipids) có thể được sử dụng để điều chế các hạt nano lipit-ARN sợi kép (tức là, các hạt LNP01). Các dung dịch gốc của mỗi loại trong etanol có thể được điều chế như sau: ND98, 133 mg/ml; Cholesterol, 25 mg/ml, PEG-Ceramit C16, 100 mg/ml. Các dung dịch gốc ND98, Cholesterol, và PEG-Ceramit C16 này sau

đó có thể được kết hợp với tỷ lệ mol, chẳng hạn, là 42:48:10. Dung dịch lipid kết hợp này có thể được trộn với dung dịch nước ARN sợi kép (chẳng hạn, trong dung dịch natri axetat pH bằng 5) sao cho nồng độ ethanol cuối cùng là khoảng 35 đến 45% và nồng độ natri axetat cuối cùng là khoảng 100-300 mM. Các hạt nano lipid-ARN sợi kép thường tạo thành một cách tự phát khi trộn. Tùy thuộc vào sự phân bố cỡ hạt mong muốn, hỗn hợp hạt nano thu được có thể được đùn qua màng polycarbonat (chẳng hạn, ngưỡng 100 nm) sử dụng, ví dụ, máy đùn tang nhiệt, như Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc). Trong một số trường hợp, bước đùn có thể được bỏ qua. Sự loại bỏ ethanol và trao đổi dung dịch đệm đồng thời có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, thẩm tách hoặc lọc dòng tiếp tuyến. Dung dịch đệm có thể được trao đổi với, ví dụ, nước muối đệm phosphat (PBS) ở độ pH khoảng bằng 7, chẳng hạn, pH khoảng bằng 6,9, pH khoảng bằng 7,0, pH khoảng bằng 7,1, pH khoảng bằng 7,2, pH khoảng bằng 7,3, hoặc pH khoảng bằng 7,4.



Công thức 1

Chế phẩm phối chế LNP01 được mô tả, chẳng hạn, trong công bố đơn quốc tế số WO 2008/042973, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Các chế phẩm phối chế lipid-ARN sợi kép được lấy làm ví dụ khác được mô tả trong bảng 1.

Bảng 1. Chế phẩm phối chế lipid được lấy làm ví dụ

	Lipit có thể ion hóa/có tính cation	Thế liên hợp lipid có tính cation/lipit không có tính cation/cholesterol/PEG-lipit Tỷ lệ lipid:ARNi
SNALP -1	1,2-Dilinolenyloxy-N,N-dimethylaminopropan (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Cholesterol/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) lipit:ARNi ~ 7:1
2-XTC	2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminoethyl-[1,3]-dioxolan (XTC)	XTC/DPPC/Cholesterol/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 lipit:ARNi ~ 7:1
LNP05	2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminoethyl-[1,3]-dioxolan (XTC)	XTC/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 lipit:ARNi ~ 6:1
LNP06	2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminoethyl-[1,3]-dioxolan (XTC)	XTC/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 lipit:ARNi ~ 11:1
LNP07	2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminoethyl-[1,3]-dioxolan (XTC)	XTC/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lipit:ARNi ~ 6:1
LNP08	2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminoethyl-[1,3]-dioxolan (XTC)	XTC/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lipit:ARNi ~ 11:1
LNP09	2,2-Dilinoleyl-4-dimethylaminoethyl-[1,3]-dioxolan (XTC)	XTC/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipit:ARNi 10:1

	Lipit có thể ion hóa/có tính cation	Thế liên hợp lipid có tính cation/lipit không có tính cation/cholesterol/PEG-lipit Tỷ lệ lipid:ARNi
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-dimetyl-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienyl)tetrahydro-3aH-xyclopenta[d][1,3]dioxol-5-amin (ALN100)	ALN100/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipit:ARNi 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(dimethylamino)butanoat (MC3)	MC-3/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipit:ARNi 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hydroxydodecyl)amino)etyl)(2-hydroxydodecyl)amino)etyl)piperazin-1-yl)etylazandiyl)didodecan-2-ol (Tech G1)	Tech G1/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipit:ARNi 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipit:ARNi: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 Lipit:ARNi: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 Lipit:ARNi: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5

	Lipit có thể ion hóa/có tính cation	Thế liên hợp lipit có tính cation/lipit không có tính cation/cholesterol/PEG-lipit Tỷ lệ lipit:ARNi
		Lipit:ARNi: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lipit:ARNi: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipit:ARNi: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 Lipit:ARNi: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 Lipit:ARNi: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lipit:ARNi: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lipit:ARNi: 10:1

DSPC: distearoylphosphatidylcholin

DPPC: dipalmitoylphosphatidylcholin

PEG-DMG: PEG-didimyristoyl glyxerol (C14-PEG, hoặc PEG-C14) (PEG với trọng lượng mol trung bình là 2000)

PEG-DSG: PEG-distyryl glyxerol (C18-PEG, hoặc PEG-C18) (PEG với trọng lượng mol trung bình là 2000)

PEG-cDMA: PEG-carbamoyl-1,2-dimyristyloxypropylamin (PEG với trọng lượng mol trung bình là 2000)

Các chế phẩm phối chế chứa SNALP (1,2-Dilinolenyloxy-N,N-dimetylaminopropan (DLinDMA)) được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 2009/127060, toàn bộ nội dung của công bố này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Các chế phẩm phối chế chứa XTC được mô tả, chẳng hạn, trong công bố đơn quốc tế số WO 2010/088537, toàn bộ nội dung của công bố này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Các chế phẩm phối chế chứa MC3 được mô tả, chẳng hạn, trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2010/0324120, nộp ngày 10/06/2010, toàn bộ nội dung của công bố này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Các chế phẩm phối chế chứa ALNY-100 được mô tả, chẳng hạn, trong công bố đơn quốc tế số WO 2010/054406, toàn bộ nội dung của công bố này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Các chế phẩm phối chế chứa C12-200 được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 2010/129709, toàn bộ nội dung của công bố này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

i. Tổng hợp các lipit có thể ion hóa/có tính cation

Các hợp chất bất kỳ, chẳng hạn, các lipit có tính cation và các chất tương tự, được sử dụng trong các hạt axit nucleic-lipit theo sáng chế có thể được điều chế bằng các kỹ thuật tổng hợp hữu cơ đã biết.

Các chế phẩm phối chế được điều chế bằng phương pháp chuẩn hoặc phương pháp không đun có thể được đặc trưng hóa theo cách tương tự. Ví dụ, các chế phẩm phối chế được đặc trưng điển hình bằng sự kiểm tra bằng mắt. Chúng nên là các dung dịch trong mờ màu hơi trắng không có các khối kết tụ hoặc lắng cặn. Cỡ hạt và sự phân bố cỡ hạt của các hạt nano-lipit có thể được đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng sử dụng, ví dụ, thiết bị Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, USA). Các hạt nên có kích cỡ khoảng 20 đến 300 nm, như khoảng 40 đến 100 nm. Sự phân bố cỡ hạt nên là unimodal. Tổng nồng độ ARN sợi kép trong chế phẩm phối chế, cũng như phần được

bấy, được ước tính bằng cách sử dụng thử nghiệm loại trừ bằng thuốc nhuộm. Mẫu ARN sợi kép được phối chế có thể được ủ với thuốc nhuộm gắn kết ARN, như Ribogreen (Molecular Probes) với sự có mặt hoặc không có mặt của chất hoạt động bề mặt phá vỡ chế phẩm phối chế, chẳng hạn, 0,5% Triton®-X100. Tổng lượng ARN sợi kép trong chế phẩm phối chế có thể được xác định bằng tín hiệu từ mẫu chứa chất hoạt động bề mặt, so với đường cong chuẩn. Phần được bấy được xác định bằng cách lấy tổng hàm lượng ARN sợi kép trừ đi hàm lượng ARN sợi kép “tự do” (như được đo bằng tín hiệu với sự không có mặt của chất hoạt động bề mặt). Phần trăm ARN sợi kéo được bấy thường là >85%. Đối với chế phẩm phối chế SNALP, cỡ hạt ít nhất là 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 110 nm, hoặc 120 nm. Khoảng thích hợp thường là 50 nm đến 110 nm, 60 nm đến 100 nm, hoặc 80 nm đến 90 nm.

Các chế phẩm và các chế phẩm phối chế để dùng qua đường miệng bao gồm thuốc bột hoặc hạt, vi hạt, hạt nano, huyền phù, hoặc dung dịch trong nước hoặc môi trường không chứa nước, viên nang, viên nang gel, túi thuốc, viên nén, hoặc viên nén nhỏ. Các chất làm đặc, các chất tạo mùi hương, các chất pha loãng, các chất nhũ hóa, các chất hỗ trợ phân tán, hoặc các chất kết dính có thể là mong muốn. Theo một số phương án, các chế phẩm phối chế dùng qua đường miệng là các chế phẩm trong đó các ARN sợi kép theo sáng chế được dùng cùng với một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt tăng cường tính thấm và các chất tạo chelat. Các chất hoạt động bề mặt thích hợp bao gồm các axit béo hoặc các este hoặc các muối của chúng, các axit mật hoặc các muối của chúng. Các axit mật/muối thích hợp bao gồm axit chenodeoxycholic (CDCA) và axit ursodeoxychenodeoxycholic (UDCA), axit cholic, axit dehydrocholic, axit deoxycholic, axit glucolic, axit glycholic, axit glycodeoxycholic, axit taurocholic, axit taurodeoxycholic, natri tauro-24,25-dihydro-fusidat và natri glycodihydrofusidat. Các axit béo thích hợp gồm axit arachidonic, axit undecanoic, axit oleic, axit lauric, axit caprylic, axit capric, axit myristic, axit palmitic, axit stearic, axit linoleic, axit linolenic, dicaprat, tricaprat, monoolein, dilauren, glyxeryl 1-monocaprat, 1-dodexylazaxycloheptan-2-on, axylcarnitin, axylcholin, hoặc monoglyxerit, diglyxerit hoặc muối được dùng của nó (chẳng hạn, natri). Theo một số phương án, các kết hợp của các chất tăng cường khả năng xuyên thấm được sử dụng, ví dụ, các axit béo/muối kết hợp với các axit mật/muối. Một kết hợp được lấy làm ví dụ là muối natri của axit

lauric, axit capric và UDCA. Các chất tăng cường khả năng xuyên thấm khác gồm polyoxyetylen-9-lauryl ete, polyoxyetylen-20-xetyl ete. Các ARN sợi kép theo sáng chế có thể được phân phối qua đường miệng, dưới dạng hạt bao gồm các hạt được sấy phun, hoặc được tạo phức hợp để tạo thành các hạt micro hoặc nano. Các tác nhân tạo phức hợp ARN sợi kép bao gồm các poly-axit amin; polyimin; polyacrylat; polyalkylacrylat, polyoxetan, polyalkylxyanoacrylat; gelatin được cation hóa, albumin, tinh bột, acrylat, polyetylen glycol (PEG), và tinh bột; polyalkylxyanoacrylat; polyimin được dẫn xuất từ DEAE, pollulan, xenluloza, và tinh bột. Các tác nhân tạo phức thích hợp bao gồm chitosan, N-trimetylchitosan, poly-L-lysin, polyhistidin, polyornithin, polyspermin, protamin, polyvinylpyridin, polythiodietylaminometyetylen P(TDAE), polyaminostyren (chẳng hạn, p-amino), poly(metylxyanoacrylat), poly(etylxyanoacrylat), poly(butylxyanoacrylat), poly(isobutylxyanoacrylat), poly(isohexylxyanoacrylat), DEAE-metacrylat, DEAE-hexylacrylat, DEAE-acrylamit, DEAE-albumin và DEAE-dextran, polymetylacrylat, polyhexylacrylat, poly(axit D,L-lactic), poly(axit DL-lactic-co-glycolic (PLGA), alginat, và polyetylen glycol (PEG). Các chế phẩm phối chế dùng qua đường miệng đối với các ARN sợi kép và việc điều chế chúng được mô tả chi tiết trong patent Mỹ số 6.887.906, công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20030027780, và patent Mỹ số 6.747.014, mỗi tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Các chế phẩm và các chế phẩm phối chế để dùng ngoài đường tiêu hóa, trong nhu mô (vào não), trong vỏ, trong tâm thất, hoặc trong gan có thể gồm các dung dịch nước vô trùng mà có thể còn chứa các dung dịch đậm, các chất pha loãng, và các chất phụ gia thích hợp khác như, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất tăng cường khả năng xuyên thấm, các hợp chất mang, và các chất mang được dùng hoặc các tá dược khác.

Các dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dung dịch, các nhũ dịch, và các chế phẩm phối chế chứa liposom. Các chế phẩm này có thể được tạo ra từ nhiều thành phần mà gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất lỏng được tạo ra từ trước, các chất rắn tự nhũ hóa, và các chất bán rắn tự nhũ hóa. Các chế phẩm phối chế bao gồm các chế phẩm mà hướng đến đích gan khi điều trị các rối loạn ở gan như caxinom gan.

Các dược phẩm phối chế theo sáng chế mà có thể được trình bày một cách thuận tiện dưới dạng liều đơn vị, có thể được điều chế theo các kỹ thuật thông thường đã được biết rõ trong công nghiệp dược. Các kỹ thuật này bao gồm bước kết hợp các thành phần hoạt tính với (các) chất mang dược hoặc (các) tá dược. Nói chung, các chế phẩm phối chế được điều chế bằng cách kết hợp đồng đều và riêng biệt các thành phần hoạt tính với các chất mang lỏng hoặc các chất mang rắn được nghiền mịn hoặc cả hai, và sau đó, nếu cần, tạo hình sản phẩm.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được phối chế thành dạng liều lượng khả dĩ bất kỳ như, nhưng không chỉ giới hạn ở, viên nén, viên nang, viên nang gel, sirô lỏng, gel mềm, thuốc đạn, và thuốc thụt. Các chế phẩm theo sáng chế có thể còn được phối chế dưới dạng các hỗn dịch trong môi trường chứa nước, môi trường không chứa nước hoặc môi trường hỗn hợp. Các hỗn dịch chứa nước có thể còn chứa các chất mà tăng độ nhớt của hỗn dịch bao gồm, ví dụ, natri carboxymethylxenluloza, sorbitol, hoặc dextran. Hỗn dịch này có thể còn chứa các chất làm ổn định.

C. Các chế phẩm phối chế bổ sung

i. Nhũ tương

Các ARNi theo sáng chế có thể được điều chế và phối chế dưới dạng nhũ tương. Nhũ tương là hệ không đồng nhất điển hình của một chất lỏng được phân tán trong chất lỏng khác dưới dạng các giọt nhỏ thường có đường kính vượt quá $0,1\mu\text{m}$ (xem chẳng hạn, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Các nhũ tương thường là các hệ hai pha chứa hai pha lỏng không trộn lẫn được được trộn kỹ và phân tán với nhau. Nói chung, các nhũ tương có thể là dạng nước-trong-dầu (w/o) hoặc dạng dầu-trong-nước (o/w).

Nếu pha nước được phân chia mịn và được phân tán dưới dạng các giọt nhỏ vào khối pha dầu, chế phẩm thu được được gọi là nhũ tương nước-trong-dầu (w/o). Các khác, nếu pha dầu được phân chia mịn và được phân tán dưới dạng các giọt nhỏ vào khối pha nước thì chế phẩm thu được được gọi là nhũ tương dầu-trong-nước (o/w). Các nhũ tương có thể chứa các thành phần bổ sung ngoài các pha được phân tán, và hoạt chất mà có thể được thể hiện dưới dạng hòa tan trong pha nước, pha dầu hoặc bản thân nó là một pha riêng biệt. Các tá dược như chất nhũ hóa, chất làm ổn định, chất nhuộm màu, và các chất chống oxy hóa cũng có thể có trong nhũ tương nếu cần. Các nhũ tương được phẩm cũng có thể là các đa nhũ tương mà gồm nhiều hơn hai pha như, ví dụ, trong trường hợp các nhũ tương dầu-trong-nước-trong-dầu (o/w/o) và nước-trong-dầu-trong-nước (w/o/w). Các chế phẩm phối chế phức hợp này thường cung cấp các lợi thế nhất định mà các nhũ tương nhị thể đơn giản không có. Các đa nhũ tương trong đó các giọt dầu riêng rẽ của nhũ tương o/w bao bọc các giọt nước nhỏ hơn cấu thành nên nhũ tương w/o/w. Tương tự, hệ các giọt dầu được bao bọc trong các giọt nước lớn hơn được ổn định hóa trong pha dầu liên tục tạo ra nhũ tương o/w/o.

Các nhũ tương được đặc trưng bằng tính ổn định nhiệt động nhỏ hoặc không có tính ổn định nhiệt động. Thông thường, pha nhũ tương được phân tán hoặc không liên tục được phân tán tốt vào pha bên ngoài hoặc pha liên tục và được duy trì dưới dạng này bằng các chất nhũ hóa hoặc độ nhớt của chế phẩm phối chế. Các pha của nhũ tương có thể là chất bán rắn hoặc chất rắn, như là trong trường hợp chất nền thuốc mỡ kiểu nhũ tương và kem. Các biện pháp khác để ổn định hóa các nhũ tương đòi hỏi việc sử dụng các chất nhũ hóa mà có thể được kết hợp vào một pha nhất định của nhũ tương. Các chất nhũ hóa có thể được phân loại rộng thành bốn loại: các chất hoạt động bề mặt tổng hợp, các chất nhũ hóa có trong tự nhiên, các chất nền hấp thụ, và các chất rắn được phân tán mịn (xem, chẳng hạn, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., và Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Các chất hoạt động bề mặt tổng hợp, mà còn được biết như là các chất có hoạt tính bề mặt, đã được phát hiện là có ứng dụng rộng rãi trong các chế phẩm phối chế nhũ

trương và đã được xem xét trong tài liệu tham khảo (xem, chẳng hạn, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., và Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Các chất hoạt động bề mặt thường là lưỡng tính và chứa phần ưa nước và phần kỵ nước. Tỷ lệ bản chất ưa nước trên bản chất kỵ nước của chất hoạt động bề mặt đã được gọi là cân bằng ưa nước/ưa béo (HLB) và là công cụ có giá trị trong việc xếp loại và chọn lọc các chất hoạt động bề mặt trong điều chế các chế phẩm phối chế. Các chất hoạt động bề mặt có thể được phân loại thành ba nhóm khác nhau dựa vào bản chất của nhóm ưa nước: không ion, anion, cation, và lưỡng tính (xem, chẳng hạn, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., và Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY Rieger, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Các chất nhũ hóa có trong tự nhiên được sử dụng trong các chế phẩm phối chế nhũ tương bao gồm lanolin, sáp ong, các phosphatit, lecithin, và acacia. Các chất nền hấp thụ có tính chất ưa nước sao cho chúng có thể thấm ẩm nước để tạo thành các nhũ tương w/o mà vẫn giữ lại các độ sệt bán rắn của chúng, chẳng hạn như lanolin khan và petrolatum ưa nước. Các chất rắn được nghiền mịn cũng đã được sử dụng làm các chất nhũ hóa tốt đặc biệt là kết hợp với các chất hoạt động bề mặt và trong các dạng điều chế nhót. Các chất này bao gồm các chất rắn vô cơ phân cực, như các hydroxit của kim loại nặng, đất sét không trương nở như bentonit, attapulgit, hectorit, cao lanh, montmorillonit, nhôm silicat keo, và magie nhôm silicat keo, các chất màu và các chất rắn không phân cực như cacbon hoặc glyxeryl tristearat.

Rất nhiều chất không nhũ hóa cũng được chứa trong các chế phẩm phối chế nhũ tương và góp phần vào các tính chất của nhũ tương. Các chất này bao gồm các chất béo, dầu, sáp, axit béo, rượu béo, este béo, chất làm ẩm, chất keo ưa nước, chất bảo quản, và chất chống oxy hóa (Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.

335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Các chất keo ưa nước hoặc các keo nước bao gồm các gồm có trong tự nhiên và các polyme tổng hợp như các polysacarit (ví dụ, acacia, aga, axit alginic, carrageenan, gồm guar, gồm karaya, và tragacanth), các dẫn xuất xenluloza (ví dụ, carboxymethylxenluloza và carboxypropylxenluloza), và các polyme tổng hợp (ví dụ, các carbome, các ete xenluloza, và các carboxyvinyl polyme). Các chất này phân tán hoặc trương nở trong nước để tạo thành các dung dịch keo mà ổn định hóa nhũ tương bằng cách tạo ra màng phân giới mạnh xung quanh các giọt pha được phân tán và bằng cách tăng độ nhớt của pha bên ngoài.

Vì các nhũ tương thường chứa một số các thành phần như các hydrat cacbon, các protein, các sterol và các phosphatit mà có thể dễ dàng hỗ trợ sự phát triển của các vi sinh vật, nên các chế phẩm phối chế này thường kết hợp các chất bảo quản. Các chất bảo quản thường dùng trong các chế phẩm phối chế nhũ tương bao gồm methyl paraben, propyl paraben, các muối amoni bậc bốn, benzalkoni clorua, các este của axit p-hydroxybenzoic, và axit boric. Các chất chống oxy hóa cũng thường được bổ sung vào các chế phẩm phối chế nhũ tương để ngăn chặn sự hư hại của chế phẩm phối chế. Các chất chống oxy hóa được sử dụng có thể là các chất khử gốc tự do như các tocopherol, alkyl galat, hydroxyanisol được butyl hóa, hydroxytoluen được butyl hóa, hoặc các tác nhân khử như axit ascorbic và natri metabisulfit, và các chất hỗ trợ chống oxy hóa như axit xitric, axit tartric, và lecithin.

Việc dùng các chế phẩm phối chế nhũ tương thông qua đường ngoài da, đường miệng, và ngoài đường tiêu hóa, và các phương pháp sản xuất chúng đã được xem xét kỹ trong tài liệu tham khảo (xem, chẳng hạn, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Các chế phẩm phối chế nhũ tương để phân phối qua đường miệng đã được sử dụng rất rộng rãi do dễ dàng phối chế, cũng như hiệu lực xét về mặt hấp thu và sinh khả dụng (xem, chẳng hạn, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug*

Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., và Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, trong *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, trong *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Các thuốc nhuận tràng nền dầu khoáng, các vitamin hòa tan trong dầu, và các dạng điều chế dinh dưỡng chất béo cao là nằm trong các nguyên liệu mà thường được dùng qua đường miệng dưới dạng các nhũ tương o/w.

ii. Các vi nhũ tương

Theo một phương án của sáng chế, các ARNi được phối chế dưới dạng các vi nhũ tương. Vi nhũ tương có thể được định nghĩa là hệ nước, dầu, và chất lưỡng tính mà là dung dịch lỏng duy nhất ổn định về mặt nhiệt động học và đẳng hướng về mặt quang học (xem, chẳng hạn, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Các vi nhũ tương điển hình là các hệ mà được điều chế bằng cách đầu tiên là phân tán dầu trong dung dịch nước chất hoạt động bề mặt và sau đó bổ sung lượng đủ của thành phần thứ tư mà thường là rượu có chiều dài mạch trung bình, vào để tạo thành hệ trong suốt. Do đó, các vi nhũ tương cũng được mô tả là các thể phân tán trong đẳng hướng, ổn định về mặt nhiệt động học, gồm hai chất lỏng không thể trộn lẫn mà được làm ổn định bởi các màng phân giới của các phân tử có hoạt tính bề mặt (Leung and Shah, trong: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). Các vi nhũ tương thường được điều chế bằng cách kết hợp ba đến năm thành phần mà gồm dầu, nước, chất hoạt động bề mặt, đồng chất hoạt động bề mặt và chất điện ly. Việc vi nhũ tương là loại nước-trong-dầu (w/o) hay dầu-trong-nước (o/w) sẽ tùy thuộc vào tính chất của dầu và chất hoạt động bề mặt được sử dụng và vào cấu trúc và sự nén hình học của các đầu phân cực và các đuôi hydrocarbon của các phân tử chất hoạt động bề mặt (Schott, trong *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Khảo sát hiện tượng luận sử dụng các biểu đồ pha đã được nghiên cứu kỹ lưỡng và đã thu được kiến thức hiểu biết toàn diện, cho người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này về cách tạo ra các vi nhũ tương (xem, chẳng hạn, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., và Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). So với các nhũ tương thông thường, các vi nhũ tương có lợi thế về việc hòa tan các thuốc không hòa tan trong nước trong chế phẩm phối chế gồm các giọt ổn định về mặt nhiệt động học mà được tạo thành một cách tự phát.

Các chất hoạt động bề mặt được sử dụng trong việc điều chế các vi nhũ tương bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất hoạt động bề mặt ion, các chất hoạt động bề mặt không ion, Brij® 96, polyoxyetylen oleyl ete, các este của axit béo polyglyxerol, tetraglyxerol monolaurat (ML310), tetraglyxerol monooleat (MO310), hexaglyxerol monooleat (PO310), hexaglyxerol pentaoleat (PO500), decaglyxerol monocaprat (MCA750), decaglyxerol monooleat (MO750), decaglyxerol sequioleat (SO750), decaglyxerol decaoleat (DAO750), một mình hoặc kết hợp với các đồng chất hoạt động bề mặt. Đồng chất hoạt động bề mặt, thường là rượu mạch ngắn như etanol, 1-propanol, và 1-butanol, có tác dụng gia tăng độ lỏng phân giới bằng cách xuyên vào màng chất hoạt động bề mặt và do đó tạo ra màng hỗn độn vì không gian trống được tạo ra giữa các phân tử chất hoạt động bề mặt. Tuy nhiên, các vi nhũ tương có thể được điều chế mà không sử dụng các đồng chất hoạt động bề mặt và các hệ vi nhũ tương tự nhũ hóa không còn đã được biết đến trong lĩnh vực này. Pha nước có thể điển hình là, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước, dung dịch nước của thuốc, glyxerol, PEG300, PEG400, polyglyxerol, propylen glycol, và các dẫn xuất của etylen glycol. Pha dầu có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vật liệu như Captex® 300, Captex® 355, Capmul® MCM, các este axit béo, các mono, di, và tri-glyxerit chuỗi trung bình (C8-C12), các este axit béo glyxeryl được polyoxyetyl hóa, các rượu béo, các glycerit được polyglycol hóa, các C8-C10 glyxerit được polyglycol hóa bão hòa, các dầu thực vật, và dầu silicon.

Các vi nhũ tương là đặc biệt được quan tâm xét về khả năng hòa tan thuốc và sự tăng cường hấp thu thuốc. Các vi nhũ tương trên cơ sở lipit (cả o/w và w/o) đã được đề xuất để tăng cường sinh khả dụng qua đường miệng của thuốc, bao gồm các peptit (xem chẳng hạn, các patent Mỹ số 6.191.105; 7.063.860; 7.070.802; 7.157.099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Các vi nhũ tương tạo ra các lợi thế về khả năng hòa tan thuốc được cải thiện, bảo vệ thuốc khỏi sự thủy phân do enzym, có thể tăng cường sự hấp thu thuốc do các thay đổi được cảm ứng bởi chất hoạt động bề mặt đối với độ lỏng và khả năng thấm của màng, dễ điều chế, dễ dùng qua đường miệng so với các dạng liều lượng rắn, cải thiện hiệu lực lâm sàng, và giảm độc tính (xem, chẳng hạn, các patent Mỹ số 6.191.105; 7.063.860; 7.070.802; 7.157.099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Các vi nhũ tương thông thường có thể tạo thành một cách tự phát khi các thành phần của chúng được trộn với nhau ở nhiệt độ môi trường. Điều này có thể là đặc biệt có lợi khi phối chế các thuốc không chịu nhiệt, các peptit hoặc các ARNi. Các vi nhũ tương cũng hữu hiệu trong việc phân phối qua da các thành phần hoạt tính trong cả ứng dụng trong dược phẩm và ứng dụng trong mỹ phẩm. Các chế phẩm vi nhũ tương và các chế phẩm phối chế theo sáng chế được mong rằng sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho việc gia tăng hấp thu toàn thân các ARNi và các axit nucleic từ đường tiêu hóa, cũng như cải thiện sự hấp thụ tế bào cục bộ đối với các ARNi và các axit nucleic.

Các vi nhũ tương theo sáng chế cũng có thể chứa các thành phần và các chất phụ gia bổ sung như sorbitan monostearat (Grill® 3), Labrasol®, và các chất tăng cường xuyên thấm để cải thiện các tính chất của chế phẩm phối chế và tăng cường sự hấp thu các ARNi và các axit nucleic theo sáng chế. Các chất tăng cường khả năng xuyên thấm được sử dụng trong các vi nhũ tương theo sáng chế có thể được phân loại là thuộc một trong năm nhóm rộng--các chất hoạt động bề mặt, các axit béo, các muối mật, các chất tạo chelat, và các chất không hoạt động bề mặt không tạo chelat (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Mỗi nhóm trong số các nhóm này đã được bàn luận trên đây.

iii. Các vi hạt

ARNi theo sáng chế có thể được kết hợp vào hạt, chẳng hạn, vi hạt. Các vi hạt có thể được sản xuất bằng cách sấy phun, nhưng cũng có thể được sản xuất bằng các phương pháp khác bao gồm sấy đông khô, bay hơi, sấy tầng sôi, sấy chân không, hoặc tổ hợp của các kỹ thuật này.

iv. Các chất tăng cường khả năng xuyên thấm

Theo một phương án, sáng chế sử dụng các chất tăng cường khả năng xuyên thấm khác nhau để thực hiện sự phân phối hiệu quả các axit nucleic, đặc biệt là các ARNi, vào da của động vật. Hầu hết các thuốc là có mặt trong dung dịch dưới dạng ion hóa và không ion hóa. Tuy nhiên, thường chỉ các thuốc hòa tan trong lipit hoặc ưa béo mới dễ dàng xuyên qua các màng tế bào. Đã phát hiện ra rằng, ngay cả các thuốc không ưa béo cũng có thể xuyên qua các màng tế bào nếu màng cần được xuyên qua được xử lý bằng chất tăng cường khả năng xuyên thấm. Ngoài việc hỗ trợ sự khuếch tán của thuốc không ưa béo xuyên qua các màng tế bào, các chất tăng cường khả năng xuyên thấm còn tăng cường tính thấm của các thuốc ưa béo.

Các chất tăng cường khả năng xuyên thấm có thể được phân loại là thuộc một trong năm nhóm rộng, tức là, các chất hoạt động bề mặt, các axit béo, các muối mật, các chất tạo chelat, và các chất không hoạt động bề mặt không tạo chelat (xem, chẳng hạn, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Các hợp chất này đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

v. Các chất mang

Các chế phẩm nhất định theo sáng chế còn kết hợp với các hợp chất mang trong chế phẩm phối chế. Như được sử dụng ở đây, “hợp chất mang” hoặc “chất mang” có thể chỉ axit nucleic, hoặc chất tương tự của nó, mà là trợ (tức là, thực chất không có hoạt tính sinh học) nhưng được ghi nhận là axit nucleic bằng các quy trình in vivo mà làm giảm sinh khả dụng của axit nucleic có hoạt tính sinh học bằng, ví dụ, việc phân hủy axit nucleic có hoạt tính sinh học hoặc thúc đẩy sự loại bỏ nó ra khỏi vòng tuần hoàn. Sự dùng đồng thời axit nucleic và hợp chất mang, thường là với lượng dư chất mang, có thể dẫn đến sự giảm đáng kể lượng axit nucleic được thu hồi trong gan, thận hoặc các bể chứa ngoài vòng tuần hoàn khác, có lẽ do sự cạnh tranh giữa hợp chất

mang và axit nucleic đối với thụ thể chung. Ví dụ, sự thu hồi một phần ARN sợi kép phosphorothioat trong mô gan có thể bị giảm khi nó được dùng đồng thời với axit polyinosinic, dextran sulfat, axit polyxytidic hoặc axit 4-axetamido-4'isothioxyano-stilben-2,2'-disulfonic (Miyao et al., *DsRNA Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura et al., *DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

vi. Các tá dược

Ngược lại với hợp chất mang, “chất mang dược” hoặc “tá dược” là dung môi, chất tạo huyền phù dược dụng, hoặc chất dẫn trợ về mặt dược lý bất kỳ khác để phân phối một hoặc nhiều axit nucleic vào động vật. Tá dược có thể là chất lỏng hoặc chất rắn và được chọn, với cách thức dùng được lập kế hoạch trong đầu, sao cho tạo ra khối mong muốn, tính nhất quán mong muốn, v.v., khi được kết hợp với axit nucleic và các thành phần khác của dược phẩm được chọn. Các chất mang dược điển hình bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất kết dính (chẳng hạn, tinh bột ngô được gelatin hóa sơ bộ, polyvinylpyrrolidon hoặc hydroxypropyl metylxenluloza, v.v.); các chất độn (chẳng hạn, lactoza và các đường khác, xenluloza vi tinh thể, pectin, gelatin, canxi sulfat, etyl xenluloza, polyacrylat hoặc canxi hydro phosphat, v.v.); các chất làm trơn (chẳng hạn, magie stearat, talc, silic oxit, silic dioxit keo, axit stearic, stearat của kim loại, các dầu thực vật được hydro hóa, tinh bột ngô, polyetylen glycol, natri benzoat, natri axetat, v.v.); các chất gây rã (chẳng hạn, tinh bột, natri tinh bột glycolat, v.v.); và các chất làm ướt (chẳng hạn, natri lauryl sulphat, v.v.).

Các tá dược hữu cơ hoặc vô cơ dược dụng thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa mà không có phản ứng có hại với các axit nucleic cũng có thể được sử dụng để phối chế chế phẩm theo sáng chế. Các chất mang dược dụng thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước, các dung dịch muối, các rượu, các polyetylen glycol, gelatin, lactoza, amyloza, magie stearat, talc, axit silicic, parafin nhớt, hydroxymetylxenluloza, polyvinylpyrrolidon, và các chất tương tự.

Các chế phẩm phối chế để dùng cục bộ các axit nucleic có thể chứa các dung dịch nước vô trùng và không vô trùng, các dung dịch không chứa nước trong dung môi thông thường như các rượu, hoặc các dung dịch của axit nucleic trong các chất nền dầu lỏng hoặc rắn. Các dung dịch có thể còn chứa các chất đệm, các chất pha loãng và các

chất phụ gia thích hợp khác. Các tá dược hữu cơ hoặc vô cơ được dùng thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa mà không có phản ứng có hại với các axit nucleic có thể được sử dụng.

Các tá dược được dùng thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước, các dung dịch muối, rượu, các polyetylen glycol, gelatin, lactoza, amyloza, magie stearat, talc, axit silicic, parafin nhớt, hydroxymetylxenluloza, polyvinylpyrrolidon, và các chất tương tự.

vii. Các thành phần khác

Các chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa các thành phần phụ trợ khác thường thấy trong dược phẩm, ở mức sử dụng đã được thiết lập trong lĩnh vực của chúng. Do đó, ví dụ, các chế phẩm có thể còn chứa các chất có hoạt tính dược, tương thích, như, ví dụ, các chất trị ngứa, các chất làm săn da, các chất gây tê cục bộ, hoặc các chất chống viêm, hoặc có thể chứa các chất bổ sung hữu dụng trong việc phối chế vật lý các dạng liều khác nhau của chế phẩm theo sáng chế, như chất nhuộm, chất tạo hương, chất bảo quản, chất chống oxy hóa, chất cản quang, chất làm đặc và chất làm ổn định. Tuy nhiên, các chất này, khi được bổ sung, sẽ không can thiệp quá mức vào các hoạt tính sinh học của các thành phần của chế phẩm theo sáng chế. Các chế phẩm phối chế có thể được làm vô trùng và, nếu muốn, được trộn với các chất bổ trợ, chẳng hạn, các chất làm trơn, chất bảo quản, chất làm ổn định, chất làm ướt, chất nhũ hóa, muối để tác động đến áp suất thẩm thấu, chất đệm, chất tạo màu, chất tạo hương, và/hoặc chất tạo mùi thơm và các chất tương tự mà không tương tác có hại với (các) axit nucleic của chế phẩm phối chế.

Các hỗn dịch chứa nước có thể chứa các chất mà tăng độ nhớt của hỗn dịch bao gồm, ví dụ, natri carboxymetylxenluloza, sorbitol, hoặc dextran. Hỗn dịch này có thể còn chứa các chất làm ổn định.

Theo một số phương án, các dược phẩm theo sáng chế chứa (a) một hoặc nhiều ARNi và (b) một hoặc nhiều chất mà tác động bằng cơ chế phi ARNi và là hữu dụng trong điều trị rối loạn có liên quan đến PD-L1.

Độc tính và hiệu quả điều trị của các hợp chất này có thể được xác định bằng các quy trình dược lý chuẩn trong các môi trường nuôi cấy tế bào hoặc các động vật thử

nghiệm, chẳng hạn, để xác định LD50 (liều gây chết đối với 50% quần thể) và ED50 (liều hữu hiệu trong điều trị ở 50% quần thể). Tỷ lệ liều giữa tác động gây độc và tác dụng điều trị là chỉ số điều trị và nó có thể được biểu hiện dưới dạng tỷ lệ LD50/ED50. Các hợp chất mà thể hiện các chỉ số điều trị cao là được ưu tiên.

Số liệu thu được từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu trên động vật có thể được sử dụng trong việc phối chế khoảng liều để sử dụng cho người. Liều lượng các chế phẩm được mô tả ở đây theo sáng chế thường nằm trong khoảng nồng độ tuần hoàn mà gồm ED50 với ít hoặc không có độc tính. Liều lượng này có thể thay đổi trong khoảng này tùy thuộc vào dạng liều lượng được sử dụng và cách dùng. Đối với hợp chất bất kỳ được sử dụng trong các phương pháp được nêu trong sáng chế, liều hữu hiệu trong điều trị có thể được ước tính ban đầu từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Liều có thể được phối chế trong các mô hình động vật để đạt được khoảng nồng độ huyết tương tuần hoàn của hợp chất hoặc, nếu thích hợp, của sản phẩm polypeptit của trình tự đích (chẳng hạn, đạt được nồng độ giảm của polypeptit) mà gồm IC50 (tức là, nồng độ của hợp chất thử nghiệm mà đạt được sự ức chế bán tối đa các triệu chứng) như được xác định trong môi trường nuôi cấy tế bào. Thông tin này có thể được sử dụng để xác định một cách chính xác hơn các liều hữu dụng ở người. Các mức trong huyết tương có thể được đo, ví dụ, bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Ngoài việc dùng chúng, như được bàn luận trên đây, các ARNi theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với các chất đã biết khác mà hữu hiệu trong điều trị các quá trình bệnh lý gián tiếp bởi sự biểu hiện PD-L1. Trong sự kiện bất kỳ, bác sỹ điều trị có thể điều chỉnh lượng và thời gian dùng ARNi trên cơ sở kết quả quan sát được sử dụng các phép đo chuẩn đối với hiệu lực đã biết trong lĩnh vực này hoặc được mô tả ở đây.

VI. Các phương pháp ức chế sự biểu hiện PD-L1

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 ở tế bào. Các phương pháp này bao gồm cho tế bào tiếp xúc với tác nhân ARNi, chẳng hạn, tác nhân ARNi sợi kép, với lượng hữu hiệu để ức chế sự biểu hiện của PD-L1 ở tế bào, nhờ đó ức chế sự biểu hiện của PD-L1 ở tế bào. Theo các phương án nhất định của sáng chế, PD-L1 được ức chế ưu tiên trong các tế bào gan.

Việc cho tế bào tiếp xúc với ARNi, chẳng hạn, tác nhân ARNi sợi kép, có thể được thực hiện in vitro hoặc in vivo. Việc cho tế bào tiếp xúc in vivo với ARNi bao gồm cho tế bào hoặc nhóm tế bào trong đối tượng, chẳng hạn, người, tiếp xúc với ARNi. Các kết hợp của các phương pháp tiếp xúc in vitro và in vivo đối với tế bào cũng là khả dĩ. Việc tiếp xúc tế bào có thể là trực tiếp hoặc gián tiếp, như được bàn luận trên đây. Hơn nữa, việc tiếp xúc tế bào có thể được thực hiện thông qua phối tử hướng đích, bao gồm phối tử bất kỳ được mô tả ở đây hoặc đã biết trong lĩnh vực này. Theo các phương án được ưu tiên, phối tử hướng đích là gốc hydrat cacbon, chẳng hạn, phối tử GalNAc₃, hoặc phối tử bất kỳ khác mà hướng tác nhân ARNi đến vị trí quan tâm.

Thuật ngữ “ức chế”, như được sử dụng ở đây, được sử dụng thay thế bằng các thuật ngữ “giảm”, “làm bất hoạt”, “điều hòa giảm”, “ngăn chặn”, và các thuật ngữ tương tự khác, và bao gồm mức ức chế bất kỳ.

Cụm từ “ức chế sự biểu hiện của PD-L1” được dự tính là để chỉ sự ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 bất kỳ (như, chẳng hạn, gen PD-L1 của chuột nhắt, gen PD-L1 của chuột cống, gen PD-L1 của khỉ, hoặc gen PD-L1 của người) cũng như các biến thể hoặc các thể đột biến của gen PD-L1. Do đó, gen PD-L1 có thể là gen PD-L1 kiểu dại, gen PD-L1 đột biến, hoặc gen PD-L1 chuyển gen trong ngữ cảnh tế bào, nhóm tế bào, hoặc cơ quan được thao tác xử lý di truyền.

“Ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1” bao gồm mức ức chế bất kỳ của gen PD-L1, chẳng hạn, ít nhất ngăn chặn một phần sự biểu hiện của gen PD-L1. Sự biểu hiện của gen PD-L1 có thể được đánh giá trên cơ sở mức, hoặc sự thay đổi mức, hoặc tham biến bất kỳ kết hợp với sự biểu hiện gen PD-L1, chẳng hạn, mức mRNA PD-L1 hoặc mức protein PD-L1. Mức này có thể được đánh giá trong tế bào riêng rẽ hoặc trong nhóm các tế bào, bao gồm, ví dụ, mẫu thu được từ đối tượng. Sự biểu hiện PD-L1 được hiểu là có thể gần hoặc dưới mức phát hiện được ở đối tượng bình thường trong nhiều loại tế bào và dịch cơ thể. Do đó, sự ức chế biểu hiện PD-L1 ví dụ, có thể so sánh mức PD-L1 trong gan của đối tượng bị nhiễm virus viêm gan trước và sau khi điều trị bằng tác nhân để ức chế PD-L1 hoặc trong khối u trước hoặc sau khi điều trị bằng tác nhân để ức chế PD-L1.

Theo các phương án nhất định, các dấu chuẩn đại diện có thể được sử dụng để phát hiện sự ức chế PD-L1. Ví dụ, việc điều trị hữu hiệu sự nhiễm, chẳng hạn, sự nhiễm virus viêm gan bằng tác nhân để giảm sự biểu hiện PD-L1 như được chứng minh bằng các tiêu chuẩn chẩn đoán và theo dõi chấp nhận được, có thể được hiểu là biểu lộ sự giảm PD-L1 có liên quan về mặt lâm sàng. Sự làm ổn định hoặc giảm gánh nặng khối u ở đối tượng bị ung thư như được xác định bằng các tiêu chuẩn RECIST sau xử lý bằng tác nhân giảm PD-L1 có thể được hiểu là biểu lộ sự giảm PD-L1 có liên quan về mặt lâm sàng.

Sự ức chế có thể được đánh giá bằng sự giảm mức tuyệt đối hoặc tương đối của một hoặc nhiều tham biến mà kết hợp với sự biểu hiện PD-L1 so với mức đối chứng. Mức đối chứng có thể là loại mức đối chứng bất kỳ mà được sử dụng trong lĩnh vực này, chẳng hạn, mức đường cơ sở trước khi dùng liều, hoặc mức được xác định từ đối tượng tương tự (chẳng hạn, đối chứng lịch sử), tế bào, hoặc mẫu mà không được xử lý hoặc được xử lý bằng chất đối chứng (như, chẳng hạn, đối chứng chỉ có chất đệm hoặc đối chứng tác nhân vô hoạt).

Theo một số phương án của các phương pháp theo sáng chế, sự biểu hiện của gen PD-L1 được ức chế ít nhất 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95%, hoặc đến dưới mức phát hiện của thử nghiệm. Theo các phương án nhất định, các phương pháp bao gồm bước ức chế thích đáng về mặt lâm sàng sự biểu hiện của PD-L1, chẳng hạn như được chứng minh bởi kết quả lâm sàng thích đáng sau khi điều trị đối tượng bằng tác nhân để làm giảm sự biểu hiện của PD-L1.

Sự ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 có thể được biểu thị bằng sự giảm lượng ARNm được biểu hiện bởi tế bào hoặc nhóm tế bào thứ nhất (các tế bào này có thể có mặt, ví dụ, trong mẫu thu được từ đối tượng) trong đó gen PD-L1 được phiên mã và tế bào hoặc các tế bào này đã được xử lý (chẳng hạn, bằng cách cho tế bào hoặc các tế bào tiếp xúc với ARNi theo sáng chế, hoặc bằng cách cho đối tượng dùng ARNi theo sáng chế trong đó tế bào này có hoặc đã có mặt ở đối tượng) sao cho sự biểu hiện của gen PD-L1 được ức chế, so với tế bào hoặc nhóm tế bào thứ hai về cơ bản là giống với tế bào hoặc nhóm tế bào thứ nhất nhưng chưa được xử lý ((các) tế bào đối chứng không

được xử lý bằng ARNi hoặc không được xử lý bằng ARNi hướng đích đến gen quan tâm). Theo các phương án được ưu tiên, sự ức chế được đánh giá bằng phương pháp được nêu trong ví dụ 2 ở các tế bào caxinom ruột kết của người RKO được xử lý với 10nM ARNi và biểu hiện mức mARN trong các tế bào được xử lý dưới dạng phần trăm so với mức mARN trong các tế bào đối chứng, sử dụng công thức sau:

$$\frac{(\text{mARN trong tế bào đối chứng} - \text{mARN trong tế bào xử lý})}{(\text{mARN trong tế bào đối chứng})} \bullet 100\%$$

Theo các phương án khác, sự ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 có thể được đánh giá bằng sự giảm thông số mà có liên kết về mặt chức năng với sự biểu hiện gen PD-L1, chẳng hạn, sự biểu hiện protein PD-L1 hoặc con đường truyền tín hiệu PD-L1. Việc làm bất hoạt gen PD-L1 có thể được xác định ở tế bào bất kỳ biểu hiện PD-L1, nội sinh hoặc khác loại so với cấu trúc biểu hiện, và bằng thử nghiệm bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Sự ức chế sự biểu hiện của protein PD-L1 có thể được biểu lộ bằng sự giảm mức protein PD-L1 mà được biểu hiện bởi tế bào hoặc nhóm tế bào (chẳng hạn, mức protein được biểu hiện trong mẫu thu được từ đối tượng). Như được giải thích trên đây, để đánh giá sự ngăn chặn mARN, sự ức chế mức biểu hiện protein ở tế bào hoặc nhóm tế bào được xử lý tương tự có thể được biểu thị dưới dạng phần trăm so với mức protein trong tế bào hoặc nhóm tế bào đối chứng.

Tế bào hoặc nhóm tế bào đối chứng mà có thể được sử dụng để đánh giá sự ức chế biểu hiện của gen PD-L1 bao gồm tế bào hoặc nhóm tế bào mà chưa từng được tiếp xúc với tác nhân ARNi theo sáng chế. Ví dụ, tế bào hoặc nhóm tế bào đối chứng có thể thu được từ đối tượng riêng lẻ (chẳng hạn, người hoặc động vật) trước khi xử lý đối tượng này bằng tác nhân ARNi.

Mức mARN PD-L1 mà được biểu hiện bởi tế bào hoặc nhóm tế bào có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để đánh giá sự biểu hiện mARN. Theo một phương án, mức biểu hiện của PD-L1 trong mẫu được xác định bằng cách phát hiện polynucleotit được phiên mã, hoặc một phần của nó, chẳng hạn, mARN của gen PD-L1. ARN có thể được chiết từ các tế bào sử dụng các kỹ thuật chiết ARN bao gồm, ví dụ, sử dụng kit chiết axit phenol/guanidin isothioxyanat

(RNAzol B; Biogenesis), kit điều chế ARN RNeasy™ (Qiagen®) hoặc PAXgene (PreAnalytix, Switzerland). Các mẫu thử nghiệm điển hình sử dụng sự lai axit ribonucleic bao gồm các thử nghiệm chạy trên nhân, RT-PCR, các thử nghiệm bảo vệ RNase, lai northern, lai in situ, và phân tích vi mảng. Sự tuần hoàn mARN PD-L1 có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2012/177906, toàn bộ nội dung của công bố này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, mức biểu hiện PD-L1 được xác định bằng cách sử dụng mẫu dò axit nucleic. Thuật ngữ “mẫu dò”, như được sử dụng ở đây, để chỉ phân tử bất kỳ mà có khả năng liên kết một cách chọn lọc với PD-L1 đặc hiệu. Các mẫu dò có thể được tổng hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này, hoặc thu được từ các điều chế sinh học thích hợp. Các mẫu dò có thể được thiết kế một cách đặc hiệu để được đánh dấu. Các ví dụ về các phân tử mà có thể được sử dụng làm các mẫu dò bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ARN, ADN, các protein, các kháng thể, và các phân tử hữu cơ.

mARN được phân lập có thể được sử dụng trong thử nghiệm lai hoặc thử nghiệm khuếch đại mà bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân tích Southern hoặc phân tích northern, phân tích phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và mảng mẫu dò. Một phương pháp để xác định các mức mARN bao gồm cho mARN phân lập được tiếp xúc với phân tử axit nucleic (mẫu dò) mà có thể lai với mARN PD-L1. Theo một phương án, mARN được làm cố định trên bề mặt rắn và được tiếp xúc với mẫu dò, ví dụ bằng cách chạy mARN phân lập được trên gel agarosa và chuyển mARN từ gel này đến màng, như nitrocellulose. Theo phương án khác, (các) mẫu dò được làm cố định trên bề mặt rắn và mARN được tiếp xúc với (các) mẫu dò, ví dụ, trong mảng Affymetrix GeneChip®. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng điều chỉnh cho phù hợp với các phương pháp phát hiện mARN đã biết để sử dụng trong việc xác định mức mARN PD-L1.

Phương pháp khác để xác định mức biểu hiện PD-L1 trong mẫu bao gồm quy trình khuếch đại axit nucleic và/hoặc phiên mã ngược (để điều chế cADN) của, ví dụ, mARN trong mẫu, chẳng hạn, bằng RT-PCR (phương án thử nghiệm được nêu trong

patent Mỹ số 4.683.202 của Mullis năm 1987), phản ứng chuỗi ligaza (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193), sự sao chép trình tự tự duy trì (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), hệ khuếch đại phiên mã (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197), sự sao chép vòng cuốn (Lizardi et al., patent Mỹ số 5.854.033) hoặc phương pháp khuếch đại axit nucleic bất kỳ khác, sau đó là bước phát hiện các phân tử được khuếch đại bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các sơ đồ phát hiện này là đặc biệt hữu dụng để phát hiện các phân tử axit nucleic nếu các phân tử này có mặt với số lượng rất nhỏ. Theo các khía cạnh cụ thể của sáng chế, mức biểu hiện của PD-L1 được xác định bằng RT-PCR sinh huỳnh quang định lượng (tức là, hệ TaqMan™) hoặc thử nghiệm Dual-Glo® Luciferase trong ví dụ 2.

Các mức biểu hiện của mRNA PD-L1 có thể được theo dõi sử dụng phương pháp thẩm tách màng (như được sử dụng trong phương pháp phân tích lai như phân tích northern, Southern, chấm, và các phương pháp tương tự), hoặc các vi lỗ, các ống mẫu, các gel, các giọt hoặc các xơ (hoặc chất nền rắn bất kỳ chứa các axit nucleic được liên kết). Xem, các patent Mỹ số 5.770.722, 5.874.219, 5.744.305, 5.677.195 và 5.445.934, mà được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Việc xác định mức biểu hiện PD-L1 cũng có thể gồm việc sử dụng các mẫu dò axit nucleic trong dung dịch.

Theo các phương án được ưu tiên, mức biểu hiện mRNA được đánh giá bằng cách sử dụng các thử nghiệm ADN phân nhánh (bDNA) hoặc PCR thời gian thực (qPCR). Việc sử dụng phương pháp PCR này được mô tả và lấy làm ví dụ trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế được trình bày ở đây. Các phương pháp này có thể còn được sử dụng để phát hiện các axit nucleic sinh bệnh, chẳng hạn, các axit nucleic virus viêm gan.

Mức biểu hiện PD-L1 có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để đo mức protein. Các phương pháp này bao gồm, ví dụ, điện di, điện di mao quản, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký siêu khuếch tán, các phản ứng kết tủa thể lỏng hoặc thể gel, đo phổ hấp thụ, các thử nghiệm đo màu, các thử nghiệm đo ảnh phổ, đếm dòng tế bào, khuếch tán miễn

dịch (đơn hoặc kép), miễn dịch điện di, thẩm tách western, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay - RIA), các thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISAs), các thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, các thử nghiệm đo mức phát quang điện hóa, và các phương pháp tương tự. Các thử nghiệm này cũng có thể được sử dụng để phát hiện các protein chỉ báo cho sự có mặt hoặc sự sao chép của các tác nhân gây bệnh, chẳng hạn các protein virus.

Theo một số phương án, hiệu lực của phương pháp theo sáng chế trong điều trị bệnh liên quan đến PD-L1 được đánh giá bằng sự giảm mức mRNA PD-L1 (bằng cách sinh thiết gan).

Theo một số phương án, hiệu lực của các phương pháp theo sáng chế trong điều trị bệnh nhiễm HBV được theo dõi bằng cách đánh giá các kết hợp của các dấu chuẩn huyết thanh như được bàn luận dưới đây. Hiệu lực của việc điều trị đối tượng bị HBV có thể được theo dõi bằng cách phát hiện mức kháng nguyên viêm gan B (HBsAg) hoặc HBeAg ở đối tượng, trong đó sự giảm mức HBsAg hoặc HBeAg, chẳng hạn, trong huyết thanh, là dấu hiệu chỉ báo việc điều trị bệnh hữu hiệu. Theo các phương án được ưu tiên, sự giảm mức HBsAg hoặc HbeAg là có liên quan về mặt lâm sàng, chẳng hạn, có thể so sánh với mức giảm quan sát được với chuẩn chăm sóc. Hiệu lực điều trị cũng có thể được xác định bằng sự giảm có liên quan về mặt lâm sàng đối với mức ADN HBV ở đối tượng, chẳng hạn, có thể so sánh với mức giảm quan sát được với chuẩn chăm sóc, chẳng hạn, ngăn chặn khoảng ít nhất là 4 log₁₀ IU/mL, tốt hơn là, ít nhất 5 log₁₀ IU/mL (Dienstag, Hepatology, 2009, 49:S112-S121). Hiệu lực điều trị cũng có thể được xác định bằng sự có mặt của các kháng thể kháng HBsAg.

Theo một số phương án, hiệu lực của phương pháp theo sáng chế trong điều trị ung thư có thể được theo dõi bằng cách đánh giá đối tượng về khả năng duy trì hoặc tốt hơn là giảm gánh nặng khối u của khối u nguyên phát hoặc (các) khối u di căn hoặc ngăn chặn sự di căn. Các phương pháp để phát hiện và theo dõi gánh nặng khối u đã được biết trong lĩnh vực này, chẳng hạn, tiêu chuẩn RECIST như được nêu trong Eisenhauer et al., 2009, New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). Eur. J. Cancer. 45:228-247.

Theo một số phương án của phương pháp theo sáng chế, ARNi được dùng cho đối tượng sao cho ARNi được phân phối đến vị trí cụ thể trong đối tượng. Việc ức chế biểu hiện PD-L1 có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phép đo mức hoặc thay đổi về mức mARN PD-L1 hoặc protein PD-L1 trong mẫu thu được từ vị trí cụ thể trong đối tượng, chẳng hạn, gan. Theo các phương án nhất định, các phương pháp bao gồm bước ức chế thích đáng về mặt lâm sàng sự biểu hiện của PD-L1, chẳng hạn như được chứng minh bởi kết quả lâm sàng thích đáng sau khi điều trị đối tượng bằng tác nhân để làm giảm sự biểu hiện của PD-L1.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ phát hiện hoặc xác định mức chất phân tích được hiểu có nghĩa là thực hiện các bước để xác định liệu vật chất, chẳng hạn, protein, ARN, có mặt hay không. Như được sử dụng ở đây, các phương pháp phát hiện hoặc xác định bao gồm phát hiện hoặc xác định mức chất phân tích mà dưới mức phát hiện đối với phương pháp được sử dụng.

Các mô hình động vật bị bệnh có liên quan đến PD-L1 được biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, các mô hình động vật bị nhiễm viêm gan B được biết trong lĩnh vực này bao gồm các mô hình tinh tinh, chuột chũi, và chuột nhắt chuyển gen bị mắc HBV (Wieland, 2015. Cold Spring Harb. Perspect. Med., 5:a021469, 2015; Tennant and Gerin, 2001. ILAR Journal, 42:89-102; và Moriyama et al., 1990. Science, 248:361-364). Mô hình tinh tinh cũng có thể được sử dụng làm mô hình nhiễm viêm gan D. Các mô hình so sánh sự nhiễm virus viêm màng não lympho bào (LCMV) mãn tính so với cấp tính là hữu dụng cho nghiên cứu xả bỏ miễn dịch (Matloubian et al., 1994, J. Virol. 68:8056-8063). Số lượng lớn các mô hình ung thư bao gồm các khối u biểu hiện PD-L1 đã được biết trong lĩnh vực này (Iwai et al., 2002, PNAS, 99:12293-12297).

VII. Các phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh có liên quan đến PD-L1

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp sử dụng ARNi theo sáng chế hoặc chế phẩm chứa ARNi theo sáng chế để làm giảm hoặc ức chế sự biểu hiện PD-L1 ở tế bào. Các phương pháp này bao gồm cho tế bào tiếp xúc với ARN sợi kép theo sáng chế và duy trì tế bào trong thời gian đủ để đạt được sự phân giải sản phẩm phiên mã mARN của gen PD-L1, nhờ đó ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 ở tế bào. Sự giảm biểu hiện gen có thể được đánh giá bằng các phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Ví

dự, sự giảm biểu hiện PD-L1 có thể được xác định bằng cách xác định mức biểu hiện mRNA của PD-L1, chẳng hạn, trong mẫu gan, sử dụng các phương pháp thông thường đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này, chẳng hạn, lai northern, qRT-PCR, chẳng hạn, như được đề xuất trong ví dụ 2; bằng cách xác định mức protein của PD-L1 sử dụng các phương pháp thông thường đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này, như phương pháp lai western, các kỹ thuật miễn dịch. Sự giảm biểu hiện PD-L1 cũng có thể được đánh giá một cách gián tiếp bằng cách đo mức giảm hoạt tính sinh học của PD-L1 hoặc đo mức PD-L1 trong mẫu đối tượng (chẳng hạn, mẫu huyết thanh). Sự giảm biểu hiện PD-L1 cũng có thể được đánh giá một cách gián tiếp bằng cách đo hoặc quan sát sự thay đổi, tốt hơn là sự thay đổi có liên quan về mặt lâm sàng, ở ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh có liên quan đến PD-L1.

Trong các phương pháp theo sáng chế, tế bào có thể được cho tiếp xúc in vitro hoặc in vivo, tức là tế bào có thể nằm trong đối tượng.

Tế bào thích hợp để điều trị sử dụng các phương pháp theo sáng chế có thể là tế bào bất kỳ mà biểu hiện gen PD-L1, điển hình là tế bào gan. Tế bào thích hợp để sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế có thể là tế bào động vật có vú, chẳng hạn, tế bào linh trưởng (như tế bào người hoặc tế bào linh trưởng không phải người, chẳng hạn, tế bào khỉ hoặc tế bào tinh tinh), tế bào phi linh trưởng (như tế bào bò, tế bào lợn, tế bào lạc đà, tế bào lạc đà không bướu, tế bào ngựa, tế bào dê, tế bào thỏ, tế bào cừu, tế bào chuột đồng, tế bào chuột lang, tế bào mèo, tế bào chó, tế bào chuột cống, tế bào chuột nhắt, tế bào sư tử, tế bào hổ, tế bào gấu, hoặc tế bào trâu), tế bào chim (chẳng hạn, tế bào vịt hoặc tế bào ngỗng), hoặc tế bào cá voi, khi trình tự gen đích có tính bổ trợ đủ đối với tác nhân ARNi để thúc đẩy sự bất hoạt đích. Theo một phương án, tế bào là tế bào người, chẳng hạn, tế bào gan người.

Sự biểu hiện PD-L1 được ức chế ở tế bào khoảng ít nhất là 20%, 25%, tốt hơn là ít nhất 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95%, hoặc đến mức dưới mức phát hiện của thử nghiệm. Theo các phương án nhất định, các phương pháp bao gồm bước ức chế thích đáng về mặt lâm sàng sự biểu hiện của PD-L1, chẳng hạn như được chứng minh bởi kết quả lâm sàng thích đáng sau khi điều trị đối tượng bằng tác nhân để làm giảm sự biểu hiện của PD-L1.

Các phương pháp in vivo theo sáng chế có thể bao gồm việc cho đối tượng dùng chế phẩm chứa ARNi, trong đó ARNi gồm trình tự nucleotit mà bổ trợ cho ít nhất một phần của sản phẩm phiên mã ARN của gen PD-L1 của động vật có vú được điều trị. Nếu sinh vật được điều trị là động vật có vú như người, thì chế phẩm có thể được dùng bằng biện pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc dùng qua đường miệng, trong màng bụng, hoặc ngoài đường tiêu hóa, bao gồm trong sọ (chẳng hạn, trong tâm thất, trong nhu mô, và trong tủy mạch), trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, qua da, đường thở (sol khí), mũi, trực tràng, và tại chỗ (bao gồm trong miệng và dưới lưỡi). Theo các phương án nhất định, các chế phẩm được dùng bằng cách truyền hoặc tiêm trong tĩnh mạch. Theo các phương án nhất định, các chế phẩm được dùng bằng cách tiêm dưới da.

Theo một số phương án, việc dùng là thông qua việc tiêm depot. Việc tiêm depot có thể giải phóng ARNi theo cách thích hợp trong khoảng thời gian dài. Do đó, việc tiêm depot có thể làm giảm tần suất sử dụng liều cần thiết để đạt được tác dụng mong muốn, chẳng hạn, sự ức chế mong muốn PD-L1, hoặc tác dụng điều trị. Việc tiêm depot cũng có thể cung cấp nồng độ trong huyết thanh thích hợp hơn. Việc tiêm depot có thể gồm tiêm dưới da hoặc tiêm trong cơ. Theo các phương án được ưu tiên, việc tiêm depot là tiêm dưới da.

Theo một số phương án, việc dùng là thông qua bơm. Bơm này có thể là bơm bên ngoài hoặc bơm được cấy bằng cách phẫu thuật. Theo các phương án nhất định, bơm này là bơm thẩm thấu được cấy dưới da. Theo các phương án khác, bơm này là bơm truyền. Bơm truyền có thể được sử dụng để truyền trong tĩnh mạch, dưới da, trong động mạch, hoặc ngoài màng cứng. Theo các phương án được ưu tiên, bơm truyền này là bơm truyền dưới da. Theo các phương án khác, bơm này là bơm được cấy bằng cách phẫu thuật mà phân phối ARNi đến gan.

Cách thức dùng có thể được chọn dựa trên việc liệu điều trị cục bộ hay điều trị toàn thân là mong muốn và dựa trên vùng cần điều trị. Đường dùng và vị trí dùng có thể được chọn để tăng cường khả năng hướng đích.

Theo một khía cạnh, sáng chế còn đề xuất các phương pháp ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 ở động vật có vú. Các phương pháp này bao gồm cho động vật có vú

dùng chế phẩm chứa ARN sợi kép mà hướng đích gen PD-L1 trong tế bào của động vật có vú và duy trì động vật có vú trong thời gian đủ để đạt được sự phân giải sản phẩm phiên mã mARN của gen PD-L1, nhờ đó ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 ở tế bào. Sự giảm biểu hiện gen có thể được đánh giá bằng các phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này và bằng các phương pháp, chẳng hạn qRT-PCR, được mô tả ở đây. Sự giảm sản xuất protein có thể được đánh giá bằng các phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này và bằng các phương pháp, chẳng hạn ELISA, được mô tả ở đây. Theo một phương án, mẫu sinh thiết chọc gan có tác dụng như là vật liệu mô để theo dõi sự giảm biểu hiện protein hoặc gen PD-L1. Theo các phương án nhất định, sự ức chế biểu hiện PD-L1 được xác nhận bằng cách quan sát các kết quả có liên quan về mặt lâm sàng.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp điều trị đối tượng cần điều trị. Các phương pháp điều trị theo sáng chế bao gồm cho đối tượng dùng ARNi theo sáng chế, chẳng hạn, đối tượng mà sẽ có lợi từ việc giảm hoặc ức chế sự biểu hiện PD-L1, với lượng hữu hiệu trong điều trị của ARNi hướng đích gen PD-L1 hoặc được phẩm chứa ARNi hướng đích gen PD-L1.

ARNi theo sáng chế có thể được dùng dưới dạng “ARNi tự do”. ARNi tự do được dùng không có mặt được phẩm. ARNi trần có thể trong dung dịch đệm thích hợp. Dung dịch đệm có thể bao gồm axetat, xitrat, prolamin, cacbonat, hoặc phosphat, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một phương án, dung dịch đệm là nước muối đệm phosphat (PBS). Độ pH và độ thẩm thấu của dung dịch đệm chứa ARNi có thể được điều chỉnh sao cho nó thích hợp để dùng cho đối tượng.

Cách khác, ARNi theo sáng chế có thể được dùng dưới dạng được phẩm, như chế phẩm phối chế liposom ARN sợi kép.

Các đối tượng mà sẽ có lợi từ việc giảm hoặc ức chế sự biểu hiện gen PD-L1 là các đối tượng bị rối loạn mà sẽ có lợi từ việc đáp ứng miễn dịch gia tăng, chẳng hạn, bệnh lây nhiễm, chẳng hạn, bệnh nhiễm virus, chẳng hạn, bệnh viêm gan; hoặc bệnh ung thư.

ARNi và các tác nhân trị liệu bổ sung có thể được dùng đồng thời hoặc trong cùng kết hợp, chẳng hạn, dùng ngoài đường tiêu hóa, hoặc tác nhân trị liệu bổ sung có

thể được dùng như là một phần của chế phẩm riêng biệt hoặc ở các thời điểm riêng biệt hoặc bằng phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này hoặc được mô tả ở đây.

Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc dùng chế phẩm được nêu ở đây sao cho sự biểu hiện của gen PD-L1 đích được giảm đi, như trong khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24 giờ, 28, 32, hoặc khoảng 36 giờ. Theo một phương án, sự biểu hiện của gen PD-L1 đích được giảm đi trong khoảng thời gian dài, chẳng hạn, ít nhất khoảng hai, ba, bốn ngày hoặc hơn thế, chẳng hạn, khoảng một tuần, hai tuần, ba tuần, hoặc bốn tuần hoặc lâu hơn, chẳng hạn, khoảng 1 tháng, 2 tháng, hoặc 3 tháng.

Tốt hơn là, các ARNi hữu dụng trong các phương pháp và các chế phẩm được nêu ở đây hướng đích một cách đặc hiệu các ARN (nguyên phát hoặc được xử lý) của gen PD-L1 đích. Các chế phẩm và các phương pháp để ức chế sự biểu hiện của các gen này sử dụng các ARNi có thể được điều chế và thực hiện như được mô tả ở đây.

Việc dùng ARNi theo các phương pháp theo sáng chế có thể dẫn đến sự giảm độ nặng, dấu hiệu, triệu chứng, hoặc các dấu chuẩn của các bệnh hoặc các rối loạn này ở bệnh nhân có, chẳng hạn, PD-L1 gia tăng hoặc khối u đáp ứng với PD-L1. Thuật ngữ “giảm” trong văn cảnh này có nghĩa là giảm có ý nghĩa về mặt thống kê ở các mức này, chẳng hạn, mức chất chỉ báo sự có mặt của tác nhân gây bệnh ở đối tượng, chẳng hạn, HBsAg, HBeAg, hoặc HB cccDNA trong huyết thanh của đối tượng bị nhiễm viêm gan B. Sự giảm có thể là, ví dụ, ít nhất khoảng 20%, 25%, tốt hơn là ít nhất 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95%, hoặc đến dưới mức phát hiện của thử nghiệm được sử dụng. Theo phương án nhất định, sự tăng dấu chuẩn, chẳng hạn, kháng thể kháng HBs là dấu hiệu chỉ báo sự giảm độ nặng của bệnh. Do đó, sự tăng có thể là tăng có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức kháng thể, chẳng hạn, đến mức có thể phát hiện được ở đối tượng.

Hiệu lực điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh có thể được đánh giá, ví dụ bằng cách đo sự tiến triển của bệnh, sự thuyên giảm bệnh, độ nặng của triệu chứng, sự giảm đau, chất lượng cuộc sống, liều thuốc cần thiết để duy trì tác dụng điều trị, mức dấu chuẩn của bệnh, hoặc thông số đo được bất kỳ khác thích hợp đối với bệnh nhất định cần được điều trị hoặc được hướng đích để ngăn ngừa. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đều có khả năng theo dõi hiệu lực của việc điều trị hoặc ngăn ngừa bằng cách đo

thông số bất kỳ trong số các thông số này, hoặc kết hợp bất kỳ của các thông số này. Ví dụ, hiệu lực của việc điều trị rối loạn mà sẽ có lợi từ việc đáp ứng miễn dịch gia tăng, chẳng hạn, bệnh lây nhiễm, chẳng hạn, bệnh nhiễm virus, chẳng hạn, viêm gan, hoặc bệnh ung thư.

Hiệu lực của việc điều trị bệnh lây nhiễm có thể được chứng minh, ví dụ, bằng sự giảm sự có mặt của tác nhân gây nhiễm như được chứng minh bằng sự bất lực trong việc nuôi cấy tác nhân từ mẫu đối tượng. Hiệu lực của việc điều trị bệnh lây nhiễm có thể được chứng minh bằng sự giảm sự có mặt của tác nhân gây nhiễm như được chứng minh, ví dụ, bằng sự giảm protein, axit nucleic, hoặc hydrat cacbon có mặt trong tác nhân gây nhiễm. Hiệu lực điều trị có thể được chứng minh, ví dụ, bằng sự có mặt của đáp ứng miễn dịch như được chứng minh bằng sự có mặt của các kháng thể hoặc các tế bào miễn dịch hướng đích chống lại tác nhân gây nhiễm. Hiệu lực điều trị bệnh lây nhiễm có thể được chứng minh bằng việc giảm sự có mặt tác nhân gây nhiễm như được chứng minh, ví dụ, bằng việc giảm một hoặc nhiều dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh nhiễm, chẳng hạn, sốt, đau, buồn nôn, nôn mửa, hóa học huyết, giảm trọng lượng. Các dấu hiệu hoặc các triệu chứng cụ thể sẽ tùy thuộc vào tác nhân gây bệnh cụ thể. Hiệu lực điều trị bệnh lây nhiễm có thể được chứng minh bằng sự phát triển của các kháng thể hoặc các tế bào miễn dịch hướng đích tác nhân gây bệnh.

Hiệu lực điều trị bệnh ung thư có thể được chứng minh bằng sự ổn định hóa hoặc sự giảm gánh nặng khối u như được chứng minh bằng sự ổn định hóa hoặc sự giảm gánh nặng khối u của khối u nguyên phát, khối u di căn, hoặc sự trì hoãn hoặc ngăn chặn sự di căn khối u. Các phương pháp chẩn đoán và theo dõi được đề xuất ở đây, chẳng hạn, tiêu chuẩn RECIST.

So sánh các thông số đọc sau này với các thông số đọc ban đầu cung cấp cho bác sĩ dấu hiệu liệu việc điều trị có hiệu quả hay không. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đều có khả năng theo dõi hiệu lực của việc điều trị hoặc ngăn ngừa bằng cách đo thông số bất kỳ trong số các thông số này, hoặc kết hợp bất kỳ của các thông số này. Kết hợp với việc dùng ARNi hướng đích PD-L1 hoặc dược phẩm của nó, "hữu hiệu chống lại" rối loạn có liên quan đến PD-L1 thể hiện là việc dùng theo cách thích hợp về mặt lâm sàng dẫn đến tác dụng có lợi trong ít nhất một phân đoạn có ý

nghĩa thống kê của các bệnh nhân, như cải thiện các triệu chứng, cứu chữa, giảm bệnh, kéo dài tuổi thọ, cải thiện chất lượng cuộc sống, hoặc tác dụng khác thường được nhận biết là tích cực bởi các bác sĩ y khoa quen thuộc với việc điều trị các rối loạn liên quan đến PD-L1 như được cung cấp, ví dụ, trong bộ tiêu chuẩn chẩn đoán HBV được đề xuất ở đây.

Tác dụng điều trị hoặc ngăn ngừa là rõ ràng khi có cải thiện có ý nghĩa về mặt thống kê ở một hoặc nhiều thông số về trạng thái bệnh, hoặc bằng sự suy giảm đến làm xấu đi hoặc phát triển các triệu chứng mà chúng được liệu trước. Ví dụ là, sự thay đổi mong muốn ít nhất là 10% về thông số đo được đối với bệnh, và tốt hơn là ít nhất 20%, 30%, 40%, 50% hoặc hơn thế có thể là dấu hiệu chỉ báo việc điều trị hữu hiệu. Hiệu lực đối với thuốc ARNi nhất định hoặc chế phẩm phối chế của thuốc đó cũng có thể được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình động vật thử nghiệm đối với một bệnh nhất định như được biết trong lĩnh vực này. Khi sử dụng mô hình động vật thử nghiệm, hiệu lực điều trị được chứng minh khi thấy có sự giảm có ý nghĩa thống kê ở dấu chuẩn hoặc triệu chứng.

Cách khác, hiệu lực có thể được đo bằng sự giảm độ nặng của bệnh như được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực chẩn đoán dựa trên thang phân loại độ nặng của bệnh được chấp nhận trên lâm sàng. Thay đổi tích cực bất kỳ dẫn đến chẳng hạn, việc làm giảm độ nặng của bệnh đo được sử dụng thang đo thích hợp, thể hiện việc điều trị thích hợp sử dụng ARNi hoặc chế phẩm phối chế ARNi như được mô tả ở đây.

Các đối tượng có thể được dùng lượng có tác dụng điều trị của ARNi, như khoảng 0,01 mg/kg đến khoảng 200 mg/kg.

ARNi có thể được dùng bằng cách truyền trong tĩnh mạch trong khoảng thời gian, trên cơ sở đều đặn. Theo các phương án nhất định, sau chế độ điều trị đầu tiên, các khóa điều trị được thực hiện với tần suất ít hơn. Việc dùng ARNi có thể giảm các mức PD-L1, chẳng hạn, ở tế bào hoặc mô của bệnh nhân khoảng ít nhất là khoảng 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95%, hoặc dưới mức phát hiện của phương pháp thử nghiệm được sử dụng. Theo các phương án nhất định, việc dùng dẫn đến sự ổn định trên lâm sàng hoặc tốt hơn là sự

giảm có liên quan về mặt lâm sàng của ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng của rối loạn có liên quan đến PD-L1.

Theo các phương án nhất định, liều đầy đủ của ARNi, bệnh nhân có thể được dùng liều lượng nhỏ hơn, như 5% phản ứng truyền, và được theo dõi các tác dụng phụ, như phản ứng dị ứng. Theo ví dụ khác, bệnh nhân có thể được theo dõi các tác dụng kích thích miễn dịch không mong muốn, như các mức xytokin tăng (chẳng hạn, TNF-alpha hoặc INF-alpha).

Cách khác, ARNi có thể được dùng dưới da, tức là, bằng cách tiêm dưới da. Một hoặc nhiều lần tiêm có thể được sử dụng để phân phối liều lượng hàng ngày mong muốn của ARNi cho đối tượng. Các lần tiêm có thể được lặp lại trong một khoảng thời gian. Việc dùng có thể được lặp lại trên cơ sở đều đặn. Theo các phương án nhất định, sau chế độ điều trị đầu tiên, các khóa điều trị được thực hiện với tần suất ít hơn. Chế độ dùng liều lặp lại có thể gồm việc dùng liều có tác dụng điều trị của ARNi trên cơ sở đều đặn, như dùng cách ngày hoặc một lần mỗi năm. Theo các phương án nhất định, ARNi được dùng khoảng một lần mỗi tháng đến khoảng một lần mỗi quý (tức là, khoảng một lần mỗi ba tháng).

IX. Các tiêu chuẩn chẩn đoán và điều trị đối với các bệnh có liên quan đến PD-L1

Các tiêu chuẩn chẩn đoán và theo dõi được lấy làm ví dụ đối với các bệnh khác nhau có liên quan đến PD-L1 được cung cấp dưới đây.

A. Viêm gan B

Viêm gan là thuật ngữ chung dùng để chỉ sự viêm của gan và có thể được gây ra bởi nhiều virus khác nhau như viêm gan A, B, C, D và E. Vì sự phát triển của bệnh vàng da là dấu hiệu đặc trưng của bệnh gan, việc chẩn đoán chính xác có thể chỉ được thực hiện bằng cách kiểm tra huyết thanh của bệnh nhân xem có hay không sự mặt kháng nguyên đặc hiệu kháng virus hoặc kháng thể. Hậu quả bệnh lý nặng của các bệnh nhiễm HBV dai dẳng bao gồm sự phát triển của sự thiếu năng gan mạn tính, bệnh xơ gan, và caxinom tế bào gan (hepatocellular carcinoma - HCC). Ngoài ra, các chất mang HBV có thể truyền bệnh trong nhiều năm.

HBV là virus lớn và không đi qua nhau thai, tuy nhiên, phụ nữ mang thai mà bị nhiễm HBV có thể truyền bệnh cho con của họ khi sinh. Nếu không được chủng ngừa khi mới sinh, nhiều đứa trẻ trong số này sẽ phát triển bệnh nhiễm HBV suốt đời, và nhiều trẻ phát triển thành bệnh suy gan hoặc bệnh ung thư gan sau này. Sau khi bị nhiễm HBV cấp tính, nguy cơ phát triển bệnh nhiễm mạn tính thay đổi tỷ lệ nghịch với tuổi tác. Bệnh nhiễm HBV mạn tính diễn ra trong khoảng 90% số trẻ bị nhiễm khi sinh, 25-50% số trẻ bị nhiễm ở độ tuổi 1 đến 5 tuổi và khoảng 1-5% số người bị nhiễm dưới dạng trẻ lớn hơn và người trưởng thành. Sự nhiễm HBV mạn tính cũng thường gặp phải đối với người bị suy giảm miễn dịch (viêm gan B: Tổ chức y tế thế giới. Department of Communicable Diseases Surveillance and Response, có sẵn tại trang web www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_who_dscsrlyo2002_2.pdf?ua=1, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn).

Trong pha ủ bệnh (6 đến 24 tuần), các bệnh nhân có thể cảm thấy không khỏe, có thể có triệu chứng buồn nôn, nôn mửa, tiêu chảy, chán ăn, và đau đầu. Sau đó các bệnh nhân có thể trở nên vàng da mặc dù chứng sốt nhẹ và mất ngon miệng có thể cải thiện. Đôi khi, sự nhiễm HBV không gây ra chứng vàng da hoặc bất kỳ triệu chứng rõ ràng nào. Các trường hợp không triệu chứng có thể được xác định bằng cách phát hiện các thay đổi sinh hóa hoặc các thay đổi huyết thanh đặc hiệu với virus trong máu của người bệnh. Các cá nhân không triệu chứng này có thể trở thành các vật mang virus im lặng và góp phần vào việc truyền tiếp đến những người khác.

Hầu hết các bệnh nhân trưởng thành hồi phục hoàn toàn khỏi bệnh nhiễm HBV, nhưng những người khác, khoảng 5 đến 10%, sẽ không làm sạch được virus và sẽ tiến triển trở thành các vật mang không triệu chứng hoặc phát triển bệnh viêm gan mạn tính mà có thể dẫn đến chứng xơ gan hoặc ung thư gan. Rất hiếm, một số bệnh nhân có thể phát triển bệnh viêm gan bạo phát và chết. Bệnh nhiễm HBV dai dẳng hoặc mạn tính là nằm trong số các bệnh nhiễm virus dai dẳng thông thường nhất ở người. Trên 350 triệu người trên thế giới ngày nay được ước tính là bị nhiễm HBV dai dẳng. Phần lớn trong số này là ở Đông Á và châu Phi cận Sahara, nơi các biến chứng kết hợp của bệnh gan mạn tính và ung thư gan là vấn đề sức khỏe quan trọng nhất.

Ba thử nghiệm máu chuẩn đối với viêm gan B (kháng nguyên HBs, kháng thể kháng HBs, và kháng nguyên HBc) có thể xác định liệu một người hiện đang bị nhiễm HBV, đã hồi phục, là vật mang mạn tính, hoặc có thể mắc bệnh nhiễm HBV.

Các kết quả thử nghiệm			Giải thích
HBsAg	Kháng HBs	Kháng HBc	
+	-	-	Nhiễm HBV cấp tính sớm.
+	+/-	+	Nhiễm HBV cấp tính hoặc mạn tính. Phân biệt với IgM-anti-HBc. Xác định mức độ nhiễm với HBeAg hoặc ADN HBV.
-	+	+	Thể hiện sự nhiễm HBV trước đó và tính miễn dịch đối với viêm gan B.
-	-	+	Các khả năng bao gồm: bị nhiễm HBV trong quá khứ; vật mang HBV mức độ thấp; quãng thời gian giữa sự biến mất HBsAg và sự xuất hiện kháng HBs; hoặc phản ứng dương tính giả hoặc không đặc hiệu. Điều tra với IgM anti-HBc, và/hoặc thử thách với vacxin HBsAg. Nếu có mặt, kháng HBe sẽ giúp hoạt hóa hoạt tính kháng HBc.
-	-	-	Tác nhân gây nhiễm khác, tổn thương do nhiễm độc đối với gan, rối loạn miễn dịch, bệnh gan di truyền, hoặc bệnh đường mật.
-	+	-	Đáp ứng loại vacxin.

Từ: Hollinger FB, Liang TJ. Hepatitis B Virus. In: Knipe DM et al., eds. Fields Virology, 4th ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001:2971-3036.

Các thử nghiệm huyết thanh khác có thể được thực hiện để phân biệt các đối tượng bị HBV mạn tính hay cấp tính, hoặc phân biệt người có thể là vật mang. Một số vaccin chống HBV là có sẵn và hiện là hữu hiệu hơn và tiết kiệm hơn nhiều về mặt chi phí so với việc điều trị.

Hiện tại, không có phương pháp điều trị đối với bệnh viêm gan B cấp tính. Việc điều trị triệu chứng đối với các chứng buồn nôn, chán ăn, nôn mửa, và các triệu chứng khác có thể được chỉ định.

Việc điều trị bệnh viêm gan B mạn tính là nhằm vào việc loại bỏ tính gây nhiễm để ngăn chặn sự lây truyền và lan tràn HBV, nhằm vào việc làm ngừng sự tiến triển của bệnh gan và cải thiện hình ảnh về mặt mô học và lâm sàng, và nhằm vào việc ngăn chặn HCC không cho phát triển, bằng cách làm mất đi các dấu chuẩn của việc sao chép HBV trong huyết thanh và gan như ADN HBV, HBeAg, và HBcAg. Việc bình thường hóa hoạt tính ALT, giải pháp đối với viêm gan và cải thiện các triệu chứng của bệnh nhân thường đi kèm với các thay đổi về mặt virus học này. Tuy nhiên, các phương pháp điều trị hiện có đối với HBV hiếm khi có tính cứu chữa. Các bệnh nhân phải thực hiện khóa điều trị bất định để ngăn chặn bệnh và ngăn ngừa lan truyền.

Có hai nhóm điều trị chính: các chất chống virus: nhằm vào việc ngăn chặn hoặc phá hủy HBV bằng cách can thiệp vào quá trình sao chép virus; và các chất điều biến miễn dịch: nhằm giúp hệ miễn dịch của người thiết lập sự phòng vệ chống lại virus. Các corticosteroid, mà cảm ứng sự biểu hiện tăng cường của virus và các kháng nguyên virus, và ngăn chặn chức năng lympho bào T, và cả adenine arabinoside, acyclovir, hoặc dideoxyinosine, đều được thể hiện là không có lợi trong việc điều trị bệnh và B mạn tính.

Hiện tại, bệnh viêm gan B mạn tính được điều trị bằng các interferon để điều biến đáp ứng miễn dịch. Các chất duy nhất được phê chuẩn là interferon- α -2a và interferon- α -2b. Các interferon thể hiện các tính chất khác nhau mà bao gồm kháng virus, điều biến miễn dịch, và các tác dụng chống tăng sinh. Chúng làm tăng cường hoạt tính tế bào T hỗ trợ, gây ra sự trưởng thành của các lympho bào B, ức chế các chất ức chế tế bào T, và tăng cường biểu hiện HLA týp I. Để có thể thích hợp cho liệu pháp interferon, các bệnh nhân phải được ghi chép bệnh nhiễm trong ít nhất sáu tháng, tăng

men gan (AST và ALT), và có sự phân chia tích cực virus trong máu (các thử nghiệm dương tính HBeAg và/hoặc ADN HBV). Các bệnh nhân bị bệnh nhiễm cấp tính, xơ gan giai đoạn cuối hoặc mắc các vấn đề sức khỏe chủ yếu khác sẽ không được điều trị. Interferon- α tạo ra sự thuyên giảm duy trì, trong thời gian dài đối với bệnh ở 35% số người mắc viêm gan B mạn tính, với sự bình thường hóa men gan và làm mất đi ba dấu chuẩn đối với bệnh nhiễm hoạt động (HBeAg, ADN HBV, và HBsAg). Sự loại bỏ hoàn toàn virus đạt được ở một số bệnh nhân được chọn lọc cẩn thận.

Liệu pháp interferon đối với các bệnh nhân bị xơ gan liên quan đến HBV làm giảm đáng kể tỷ lệ HCC, đặc biệt là ở các bệnh nhân có lượng lớn ADN HBV trong huyết thanh. Ở các bệnh nhân bị xơ gan còn bù dương tính với HBeAg, sự thuyên giảm về mặt virus học và về mặt sinh hóa sau khi dùng liệu pháp interferon được kết hợp với khả năng sống sót cải thiện. Ở các bệnh nhân bị bệnh nhiễm HBV mạn tính, sự thanh thải HBeAg sau khi điều trị bằng interferon- α được kết hợp với các kết quả lâm sàng được cải thiện.

Interferon- α (Intron A (interferon- α -2b), Schering Plough, và Roferon, (interferon- α -2a) Roche Labs) là chất điều trị đầu tiên đối với bệnh viêm gan B mạn tính. Khoảng thời gian chuẩn dùng liệu pháp này được xem xét là 16 tuần. Các bệnh nhân mà thể hiện mức sao chép virus thấp ở cuối chế độ điều trị chuẩn sẽ có lợi nhất từ khóa điều trị kéo dài.

Các chất tương tự nucleotit và nucleosit đã được sử dụng từ lâu để điều trị HBV. Các hợp chất hiện có và đang phát triển bao gồm lamivudin, adefovir, entecavir, telbivudin, tenofovir, emtricitabin, clevudin, ritonavir, dipivoxil, lobucavir, famvir, FTC, N-Acetyl-Cysteine (NAC), PC1323, theradigm-HBV, thymosin-alpha, và ganciclovir. Một số là hữu dụng đối với các bệnh nhiễm virus khác, chẳng hạn, HCV, HIV, trong khi một số khác là chủ yếu hữu hiệu trong điều trị HBV.

Sự mất đi thường xuyên ADN HBV và HBeAg được xem như là mục đích của việc điều trị chống virus, vì các kết quả này được kết hợp với sự cải thiện sự tổn thương hoại tử-viêm, và giảm mức độ nhiễm.

B. Viêm gan D

Virut viêm gan Delta (HDV) là virut khiếm khuyết mà chỉ gây nhiễm với sự có mặt của bệnh nhiễm HBV hoạt động. Sự nhiễm HDV diễn ra dưới dạng nhiễm đồng thời với HBV hoặc dưới dạng siêu nhiễm vật mang HBV. Sự nhiễm đồng thời thường phân giải. Tuy nhiên, sự siêu nhiễm thường gây ra sự nhiễm HDV mãn tính và bệnh viêm gan hoạt động mạn tính. Cả hai loại nhiễm đều có thể gây ra bệnh viêm gan bạo phát.

Đường truyền là tương tự như đường truyền của HBV. Ngăn ngừa sự nhiễm HBV cấp và mạn tính ở người dễ mắc bằng cách chủng ngừa cũng sẽ ngăn ngừa được sự nhiễm HDV. Các thuốc điều trị HBV nhất định cũng hữu hiệu trong điều trị HDV, chẳng hạn, interferon-alpha, cùng hoặc không cùng với adefovir. Tuy nhiên, các thuốc khác như lamivudin, chất ức chế sự sao chép ADN HBV, lại không hữu dụng trong điều trị viêm gan D mạn tính.

C. Bệnh lao (Tuberculosis - TB)

Bệnh lao là bệnh do vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* gây ra. Bệnh lao kết hợp với các triệu chứng bao gồm giảm cân không rõ lý do, mất cảm giác ngon miệng, đổ mồ hôi ban đêm, sốt, mệt mỏi, ho trong thời gian lâu hơn ba tuần, ho máu (ho ra máu), và đau ngực. Có hai loại thử nghiệm mà được sử dụng để xác định liệu một người đã bị nhiễm vi khuẩn TB hay không: thử tuberculin trên da và thử TB huyết mà gồm thử QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) và thử T-SPOT®.TB (T-Spot). Tuy nhiên, các thử nghiệm này không là dấu hiệu chỉ báo sự nhiễm TB hoạt động. Việc chẩn đoán nhiễm TB bao gồm đánh giá tiền sử bệnh, xét nghiệm vật lý, chụp X quang ngực, và thử nghiệm nuôi cấy vi sinh chẩn đoán bao gồm phân tích sự kháng thuốc. Việc đánh giá các thay đổi có liên quan về mặt lâm sàng đối với các dấu hiệu hoặc các triệu chứng của TB là nằm trong khả năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

D. Bệnh ung thư

Bệnh ung thư chỉ khối u bất kỳ trong nhiều loại khối u ác tính khác nhau được đặc trưng bằng sự tăng sinh các tế bào thoái biến mà có xu hướng xâm lấn mô xung quanh và gây di căn đến vị trí mới trong cơ thể và còn chỉ tình trạng bệnh lý được đặc trưng bằng sự phát triển khối u ác tính này. Bệnh ung thư có thể là khối u hoặc bệnh lý

huyết học ác tính, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tất cả các loại u lympho/bệnh bạch cầu, caxinom và sacom. Theo các phương án nhất định, bệnh ung thư bao gồm bệnh ung thư gan. Theo các phương án nhất định, bệnh ung thư bao gồm caxinom tế bào gan (HCC).

Các tiêu chuẩn RECIST là các tiêu chuẩn đánh giá được chấp nhận trên lâm sàng được sử dụng để cung cấp phương pháp tiếp cận chuẩn đối với việc đo khối u rắn và cung cấp các định nghĩa để đánh giá khách quan sự thay đổi về kích cỡ khối u để sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng. Các tiêu chuẩn này cũng có thể được sử dụng để theo dõi đáp ứng của một cá nhân đang trải qua khóa điều trị đối với khối u rắn. Các tiêu chuẩn RECIST 1.1 được bàn luận chi tiết trong Eisenhauer et al., New response evaluation criteria in solid tumors: Revised RECIST guideline (version 1.1). Eur. J. Cancer. 45:228-247, 2009, tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Các tiêu chuẩn đáp ứng đối với các tổn thương đích bao gồm:

Đáp ứng hoàn toàn (Complete Response - CR): Sự biến mất của tất cả các tổn thương đích. Bất kỳ hạch bạch huyết bệnh lý nào (đích hoặc không phải đích) đều phải có sự giảm bớt về trực ngắn xuống <10mm.

Đáp ứng một phần (Partial Response - PR): Ít nhất là giảm 30% về tổng các đường kính của tổn thương đích, lấy tổng các đường kính cơ sở làm tham chiếu.

Bệnh tiến triển (Progressive Diseases - PD): Ít nhất là tăng 20% về tổng các đường kính của tổn thương đích, lấy tổng nhỏ nhất khi nghiên cứu làm tham chiếu (tổng nhỏ nhất này bao gồm cả tổng ở mức cơ sở nếu như nó là tổng nhỏ nhất khi nghiên cứu). Ngoài sự gia tăng tương đối 20%, tổng cũng phải chứng minh sự gia tăng tuyệt đối ít nhất 5mm. (Lưu ý: sự xuất hiện của một hoặc nhiều tổn thương mới cũng được xem là sự tiến triển).

Bệnh ổn định (Stable Disease - SD): Không có sự co giảm đủ đáp ứng tiêu chuẩn PR cũng không gia tăng đủ đáp ứng tiêu chuẩn PD, lấy tổng đường kính nhỏ nhất trong khi nghiên cứu làm tham chiếu.

Các tiêu chuẩn RECIST 1.1 cũng xem xét các tổn thương không phải đích mà được xác định như là các tổn thương mà có thể đo được, nhưng không cần phải đo, và

sẽ chỉ được đánh giá định lượng tại các thời điểm mong muốn. Các tiêu chuẩn đáp ứng đối với các tổn thương không phải đích bao gồm:

Đáp ứng hoàn toàn (Complete Response - CR): Sự biến mất của tất cả các tổn thương không phải đích và sự bình thường hóa các mức dấu chuẩn khối u. Tất cả các hạch bạch huyết phải có kích cỡ không mang tính bệnh lý (trục ngắn <10 mm).

Không CR/Không PD: Tồn tại dai dẳng một hoặc nhiều tổn thương không phải đích và/hoặc duy trì mức dấu chuẩn khối u trên giới hạn bình thường.

Bệnh tiến triển (Progressive Disease - PD): Sự tiến triển rõ rệt của các tổn thương không phải đích đang tồn tại. Sự xuất hiện của một hoặc nhiều tổn thương mới cũng được xem như là bệnh tiến triển. Để đạt được "sự tiến triển rõ rệt" trên cơ sở bệnh không phải đích, phải có mức chung làm xấu đi đáng kể bệnh không phải đích này đến mức mà, thậm chí khi có mặt SD hoặc PR ở bệnh đích, gánh nặng khối u chung đã gia tăng đủ để đáng phải ngừng liệu pháp. "Sự gia tăng" vừa phải về kích cỡ của một hoặc nhiều tổn thương không phải đích thường là không đủ để đáp ứng tiêu chuẩn của tình trạng tiến triển rõ rệt. Do đó, việc định rõ sự tiến triển chung chỉ trên cơ sở thay đổi ở bệnh không phải đích khi có mặt SD hoặc PR ở bệnh đích sẽ cực kỳ hiếm.

Các tiêu chuẩn chấp nhận được về mặt lâm sàng đối với đáp ứng với việc điều trị bệnh bạch cầu cấp tính là như sau:

Thuyên giảm hoàn toàn (Complete remission - CR): Bệnh nhân phải không có tất cả các triệu chứng liên quan đến bệnh bạch cầu và có số lượng bạch cầu trung tính tuyệt đối là $\geq 1,0 \times 10^9/L$, số lượng tiểu cầu $\geq 100 \times 10^9/L$, và tủy xương bình thường với <5% blast (tế bào non ác tính) và không có que Auer.

Thuyên giảm hoàn toàn với sự hồi phục số lượng tế bào máu không hoàn toàn (Cri): Như theo CE, nhưng với chứng giảm lượng tiểu cầu sót lại (số lượng tiểu cầu $< 100 \times 10^9/L$) hoặc chứng giảm bạch cầu trung tính sót lại (số lượng bạch cầu trung tính tuyệt đối $< 1,0 \times 10^9/L$).

Thuyên giảm một phần (Partial remission - PR): Mức giảm $\geq 50\%$ ở số blast tủy xương đối với 5 đến 25% số tế bào bất thường trong tủy xương; hoặc CR với số blast $\leq 5\%$ nếu các que Auer có mặt.

Thất bại trong điều trị: Việc điều trị đã thất bại không đạt được CR, Cri, hoặc PR. Tái phát.

Tái diễn sau khi CR được xác nhận: Sự xuất hiện lại của các blast của bệnh bạch cầu trong máu ngoại vi hoặc $\geq 5\%$ blast trong tủy xương không được quy cho là do nguyên nhân bất kỳ khác (chẳng hạn, sự tái tạo tủy xương sau liệu pháp củng cố) hoặc sự xuất hiện của các thay đổi loạn sản mới.

Các ứng dụng của các chế phẩm và các phương pháp theo sáng chế bao gồm đạt được ít nhất là sự ổn định bệnh ở đối tượng có khối u rắn trong thời gian đủ để đáp ứng định nghĩa bệnh ổn định theo các tiêu chuẩn RECIST. Theo các phương án nhất định, ứng dụng của các chế phẩm và các phương pháp theo sáng chế bao gồm đạt được ít nhất là sự đáp ứng một phần ở đối tượng có khối u rắn trong thời gian đủ để đáp ứng định nghĩa bệnh ổn định theo các tiêu chuẩn RECIST.

Các ứng dụng của các chế phẩm và các phương pháp theo sáng chế bao gồm đạt được ít nhất là sự thuyên giảm một phần ở đối tượng bị bệnh bạch cầu cấp tính trong thời gian đủ để đáp ứng định nghĩa bệnh ổn định theo các tiêu chuẩn RECIST. Theo các phương án nhất định, ứng dụng của các chế phẩm và các phương pháp theo sáng chế bao gồm đạt được ít nhất là sự thuyên giảm hoàn toàn với sự hồi phục số lượng tế bào máu không hoàn toàn ở đối tượng bị bệnh bạch cầu cấp tính trong thời gian đủ để đáp ứng định nghĩa bệnh ổn định theo các tiêu chuẩn RECIST.

Sáng chế được minh họa tiếp bằng các ví dụ sau đây, các ví dụ này sẽ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế. Toàn bộ các thành phần của tất cả các tài liệu tham khảo, các patent và các đơn yêu cầu cấp patent đã được công bố được nêu trong đơn sáng chế này, cũng như Danh mục trình tự, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Tổng hợp ARNi

Nguồn các chất phản ứng

Nếu nguồn một chất phản ứng không được nêu cụ thể ở đây thì chất phản ứng này có thể thu được từ bất kỳ nhà cung cấp chất phản ứng cho lĩnh vực sinh học phân tử nào với tiêu chuẩn chất lượng/độ tinh khiết để áp dụng trong sinh học phân tử.

Các sản phẩm phiên mã

Thiết kế siARN

Tập hợp các siARN hướng đích PD-L1 của người/ CD274 (của người: NCBI refseqID NM_001267706; NCBI GeneID: 29126; SEQ ID NO:1), cũng như các ortholog PD-L1 các loài gây độc (chuột nhắt: XM_006527249 (SEQ ID NO:3); chuột cống, XM_006231248 (SEQ ID NO:5); và khỉ cynomolgus: XM_005581779 (SEQ ID NO: 7)) được thiết kế bằng cách sử dụng các tập lệnh R và Python thông thường. mARN REFSEQ PD-L1 của người có chiều dài 3349 bazơ. Cơ sở và phương pháp đối với tập hợp các thiết kế siARN là như sau: hiệu lực được dự đoán đối với mỗi 19mer siARN tiềm năng từ vị trí 109 đến vị trí 3349 (vùng mã hóa và 3' UTR) được xác định với mô hình tuyến tính thu được từ biện pháp trực tiếp bất hoạt mARN từ trên 20.000 thiết kế siARN khác biệt hướng đích số lượng lớn gen động vật có xương sống. Tập hợp con các siARN PD-L1 được thiết kế với sự khớp hoàn hảo hoặc gần hoàn hảo giữa người và khỉ cynomolgus. Tập hợp con khác được thiết kế với sự khớp hoàn hảo hoặc gần hoàn hảo với các ortholog PD-L1 của chuột nhắt và chuột cống. Tập hợp con khác được thiết kế với sự khớp hoàn hảo hoặc gần hoàn hảo với các ortholog PD-L1 của người, khỉ cynomolgus, chuột nhắt và chuột cống. Đối với mỗi sợi siARN, tập tin Python thông thường được sử dụng trong tra cứu thuật toán để đo số lượng và vị trí của các chỗ không khớp giữa siARN và tất cả các sắp xếp thẳng hàng tiềm năng trong hệ sản phẩm phiên mã loài đích. Trọng lượng vượt mức được đưa cho các chỗ không khớp trong vùng hạt giống, được định nghĩa ở đây là các vị trí 2-9 của oligonucleotit đối nghĩa, cũng như vị trí phân cắt của siARN, được định nghĩa ở đây là các vị trí 10-11 của oligonucleotit đối nghĩa. Trọng lượng tương đối của các chỗ không khớp là 2,8; 1,2: 1 đối với các chỗ không khớp hạt giống, vị trí phân cắt, và các vị trí khác cho đến vị trí đối nghĩa 19. Các chỗ không khớp ở vị trí thứ nhất được bỏ qua. Điểm đặc hiệu được tính đối với mỗi sợi bằng cách cộng giá trị của mỗi chỗ không khớp đã được xác định trọng lượng. Ưu tiên là các siARN mà điểm đối nghĩa của chúng ở người và khỉ

cynomolgus là $\geq 3,0$ và hiệu lực dự đoán là $\geq 70\%$ bất hoạt sản phẩm phiên mã PD-L1.

Danh sách chi tiết của các trình tự sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của PD-L1 không được biến đổi được thể hiện trên bảng 3. Danh sách chi tiết của các trình tự sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của PD-L1 được biến đổi được thể hiện trên bảng 5.

Tổng hợp siARN

Các trình tự siARN PD-L1 được tổng hợp ở quy mô 1 μmol trên thiết bị tổng hợp Mermade 192 (BioAutomation) sử dụng hóa chất phosphoramidit qua trung gian chất nền rắn. Chất nền rắn là thủy tinh lỗ xốp được kiểm soát (500 Å) được nạp phối tử GalNAc thông thường hoặc chất nền rắn toàn bộ (AM biochemical). Các chất phản ứng tổng hợp phụ, 2'-F và 2'-O-methyl ARN và các deoxy phosphoramidit thu được từ Thermo-Fisher® (Milwaukee, WI) và Hongene (China). 2'-F 2'-O-Methyl, GNA (các glycol axit nucleic), 5'phosphat và các cải biến khác được đưa vào sử dụng các phosphoramidit tương ứng. Việc tổng hợp các sợi đơn được liên hợp với 3' GalNAc được thực hiện trên chất nền CPG được cải biến GalNAc. Chất nền rắn toàn bộ CPG thông thường được dùng để tổng hợp các sợi đơn đối nghĩa. Thời gian kết hợp đối với tất cả các phosphoramidit (100 mM trong axetonitril) là 5 phút sử dụng 5-Ethylthio-1H-tetrazol (ETT) làm chất hoạt hóa (0,6 M trong axetonitril). Các liên kết phosphorothioat được tạo ra bằng cách sử dụng dung dịch 50 mM của 3-((Dimethylamino-metyliden)amino)-3H-1,2,4-dithiazol-3-thion (DDTT, thu được từ Chemgenes® (Wilmington, MA, USA)) trong axetonitril/pyridin khan (tỷ lệ 1:1 thể tích/thể tích). Thời gian oxy hóa là 3 phút. Tất cả các trình tự được tổng hợp với sự loại bỏ cuối cùng đối với nhóm DMT ("loại bỏ DMT").

Khi hoàn thành quy trình tổng hợp pha rắn, oligoribonucleotit được phân tách ra khỏi chất nền rắn và được khử bảo vệ trong các đĩa 96 lỗ sâu bịt kín sử dụng 200 μL chất phản ứng Metylamin Nước ở 60°C trong 20 phút. Đối với các trình tự chứa các gốc 2' ribo (2'-OH) mà được bảo vệ bằng nhóm tert-butyl dimethyl silyl (TBDMS), bước thứ hai khử bảo vệ được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng TEA.3HF (triethylamin trihydro florua). Bổ sung vào dung dịch khử bảo vệ metylamin: 200 μL dimethyl sulfoxit (DMSO) và 300 μL chất phản ứng TEA.3HF và dung dịch này được ủ

thêm 20 phút ở 60°C. Cuối bước phân tách và khử bảo vệ, đĩa tổng hợp được cho phép để đến nhiệt độ trong phòng và được kết tủa bằng cách bổ sung 1mL hỗn hợp axetontil: ethanol (9:1). Các đĩa được làm lạnh ở -80 C trong 2 giờ, dịch nổi được gạn ra một cách cẩn thận với sự hỗ trợ của pipet nhiều kênh. Viên cặn oligonucleotit được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm NaOAc 20mM và được khử muối sử dụng cột loại trừ theo kích cỡ 5 mL HiTrap® (GE Healthcare) trên hệ tinh chế AKTA® được lắp bộ lấy mẫu tự động A905 và bộ thu gom phân đoạn Frac 950. Các mẫu đã khử muối được thu gom trong các đĩa 96 lỗ. Các mẫu từ mỗi trình tự được phân tích bằng LC-MS để xác nhận tính tương đồng, UV (260 nm) để định lượng và phân tích tập hợp các mẫu được chọn bằng cách sắc ký IEX để xác định độ tinh khiết.

Việc ủ các sợi đơn PD-L1 được thực hiện trên robot xử lý chất lỏng Tecan®. Hỗn hợp đẳng mol của sợi đơn có nghĩa và sợi đơn đối nghĩa được kết hợp và được ủ trong các đĩa 96 lỗ. Sau khi kết hợp các sợi đơn bổ trợ này, đĩa 96 lỗ được bịt chặt và được gia nhiệt trong lò ở 100°C trong 10 phút và để từ từ đến nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2-3 giờ. Nồng độ của mỗi bộ đôi được chuẩn hóa đến 10µM trong 1X PBS.

Ví dụ 2 - Sàng lọc in vitro:

Nuôi cấy tế bào và các plasmit/các chuyển nhiễm cho thử nghiệm Dual-Glo®:

Các tế bào Cos7 (ATCC®, Manassas, VA) được nuôi cấy đến gần mức hợp dòng ở 37°C trong khí quyển 5% CO₂ trong môi trường DMEM (ATCC®) được bổ sung 10% FBS, trước khi được giải phóng ra khỏi đĩa bằng cách trypsin hóa. Trình tự tham chiếu CD274 hoàn toàn của người (NM_001267706.1) được tách dòng vào vector luciferaza kép psiCHECK2™ sử dụng ba cấu trúc với các đoạn chèn có chiều dài xấp xỉ 750bp, 1,4kb, và 1,4kb (SEQ ID NO: 11-13). Các plasmit luciferaza kép được đồng chuyển nhiễm với siARN vào 15x10³ tế bào sử dụng Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™, Carlsbad CA. cat # 11668-019). Đối với mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ, 0,2ul Lipofectamine™ được bổ sung vào 10ng vector plasmit và siARN trong 14,8ul Opti-MEM® và được để tạo phức ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Sau đó hỗn hợp này được bổ sung và các tế bào đã được tái tạo huyền phù trong 80ul môi trường hoàn toàn

mới. Các tế bào được ủ trong 48 giờ trước khi luciferaza được đo. Các thử nghiệm liều đơn được thực hiện ở nồng độ sợi kép cuối cùng là 10nM và 0,1nM.

Thử nghiệm Dual-Glo® Luciferaza

48 giờ sau khi các siARN được chuyển nhiễm, Firefly (đối chứng chuyển nhiễm) và Renilla (được dung hợp với trình tự đích PD-L1 trong 3' UTR) luciferaza được đo. Đầu tiên, môi trường được loại bỏ khỏi tế bào. Sau đó hoạt tính Firefly luciferaza được đo bằng cách bổ sung 75ul chất phản ứng Dual-Glo® Luciferaza bằng với thể tích môi trường nuôi cấy vào mỗi lỗ và trộn. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút trước khi cường độ phát quang (500nm) được đo trên Spectramax® (Molecular Devices®) để phát hiện tín hiệu Firefly luciferaza. Hoạt tính Renilla luciferaza được đo bằng cách bổ sung 75ul chất phản ứng Dual-Glo® Stop & Glo® ở nhiệt độ trong phòng vào mỗi lỗ và các đĩa được ủ trong 10-15 phút trước khi cường độ phát quang được đo lại lần nữa để xác định tín hiệu Renilla luciferaza. Chất phản ứng Dual-Glo® Stop & Glo® dập tắt tín hiệu Firefly luciferaza và cường độ phát quang duy trì đối với phản ứng Renilla luciferaza. Hoạt tính siARN được xác định bằng cách chuẩn hóa tín hiệu Renilla (PD-L1) thành tín hiệu Firefly (đối chứng) trong mỗi lỗ. Cường độ hoạt tính siARN sau đó được đánh giá so với các tế bào mà được chuyển nhiễm với vector tương tự nhưng không được xử lý với siARN hoặc được xử lý với siARN không hướng đích. Tất cả các chuyển nhiễm được lặp lại ba lần.

Nuôi cấy và chuyển nhiễm tế bào đối với qPCR:

Các tế bào caxinom ruột kết của người RKO (ATCC®, Manassas, VA) được nuôi cấy đến gần mức hợp dòng ở 37°C trong khí quyển 5% CO₂ trong EMEM (ATCC®) được bổ sung 10% FBS, trước khi được giải phóng ra khỏi đĩa bằng cách trypsin hóa.

Các tế bào được chuyển nhiễm bằng cách bổ sung 4,9µl Opti-MEM cộng với 0,1µl Lipofectamine™ RNAiMax trên mỗi lỗ (Invitrogen™, Carlsbad CA. cat # 13778-150) vào 5µl các sợi kép siARN trên mỗi lỗ vào đĩa 384 lỗ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15 phút. Sau đó 40µl DMEM chứa ~5 x10³ tế bào được bổ sung vào hỗn hợp siARN. Các tế bào được ủ trong 24 giờ trước khi tinh chế ARN. Các thử nghiệm liều đơn được thực hiện ở nồng độ sợi kép cuối cùng là 10nM và 0,1nM.

Phân tách ARN toàn bộ sử dụng kit phân tách mARN DYNABEADS®:

ARN được phân tách bằng cách sử dụng phương thức tự động trên platform BioTek-EL406 sử dụng DYNABEADS® (Invitrogen™, cat#61012). Ngăn gọn là, 50µl dung dịch đệm phân giải/gắn kết và 25µl dung dịch đệm phân giải chứa 3µl hạt có từ tính được bổ sung đĩa với các tế bào. Các đĩa được ủ trên máy lắc điện từ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó các hạt có từ tính được giữ lại và dịch nổi được loại ra. Sau đó ARN liên kết với hạt được rửa 2 lần bằng 150µl dung dịch đệm rửa A và một lần bằng dung dịch đệm rửa B. Sau đó các hạt được rửa bằng 150µl dung dịch đệm rửa giải, được tái giữ lại và dịch nổi được loại ra.

Tổng hợp cADN sử dụng kit phiên mã ngược cADN dung lượng cao ABI™ (Applied Biosystems®, Foster City, CA, Cat #4368813):

Mười µl hỗn hợp chủ chứa 1µl dung dịch đệm 10X, 0,4µl 25X dNTPs, 1µl 10x đoạn môi ngẫu nhiên, 0,5µl Transcriptaza nghịch đảo, 0,5µl chất ức chế RNase và 6,6µl H₂O trên mỗi phản ứng được bổ sung vào ARN được phân tách trên đây. Các đĩa được bịt kín, trộn, và ủ trong máy lắc điện từ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, sau đó là khoảng 2 giờ ở 37°C. Sau đó các đĩa được ủ ở 81°C trong 5 phút.

PCR thời gian thực:

Hai µl cADN được bổ sung vào hỗn hợp chủ chứa 0,5µl mẫu dò GAPDH TaqMan® (Hs99999905), 0,5µl mẫu dò CD274 (Hs01125301_m1, CD274) và 5µl hỗn hợp chủ mẫu dò Lightcycler® 480 (Roche Cat # 04887301001) trên lỗ trong đĩa 384 lỗ (Roche cat # 04887301001). PCR thời gian thực được thực hiện trong hệ PCR thời gian thực LightCycler®480 (Roche) sử dụng thử nghiệm $\Delta\Delta C_t(RQ)$. Mỗi sợi kép được thử nghiệm trong bốn quá trình chuyển nhiễm độc lập.

Để tính sự thay đổi số lần tương đối, số liệu thời gian thực được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp $\Delta\Delta C_t$ và được chuẩn hóa đối với các thử nghiệm được thực hiện trong các tế bào được chuyển nhiễm bằng 10nM AD-1955, hoặc các tế bào được chuyển nhiễm giả.

Bảng 2. Chữ viết tắt của các monome nucleotit được sử dụng trong việc thể hiện trình tự axit nucleic. Cần hiểu rằng các monome này, nếu có mặt trong oligonucleotit, được liên kết với nhau bằng các liên kết 5'-3'-phosphodiester.

Chữ viết tắt	(Các) Nucleotit
A	Adenosin-3'-phosphat
Af	2'-floadenosin-3'-phosphat
Afs	2'-floadenosin-3'-phosphorothioat
As	adenosin-3'-phosphorothioat
C	cytidin-3'-phosphat
Cf	2'-flocytidin-3'-phosphat
Cfs	2'-flocytidin-3'-phosphorothioat
Cs	cytidin-3'-phosphorothioat
G	guanosin-3'-phosphat
Gf	2'-floguanosin-3'-phosphat
Gfs	2'-floguanosin-3'-phosphorothioat
Gs	guanosin-3'-phosphorothioat
T	5'-methyluridin-3'-phosphat
Tf	2'-flo-5-methyluridin-3'-phosphat
Tfs	2'-flo-5-methyluridin-3'-phosphorothioat
Ts	5-methyluridin-3'-phosphorothioat
U	Uridin-3'-phosphat
Uf	2'-flouridin-3'-phosphat
Ufs	2'-flouridin-3'-phosphorothioat
Us	uridin-3'-phosphorothioat
N	Nucleotit bất kỳ (G, A, C, T hoặc U)
a	2'-O-methyladenosin-3'-phosphat
as	2'-O-methyladenosin-3'-phosphorothioat
c	2'-O-methylcytidin-3'-phosphat
cs	2'-O-methylcytidin-3'-phosphorothioat
g	2'-O-methylguanosin-3'-phosphat

Chữ viết tắt	(Các) Nucleotit
gs	2'-O-metylguanosin-3' - phosphorothioat
t	2'-O-metyl-5-metyluridin-3'-phosphat
ts	2'-O-metyl-5-metyluridin-3'-phosphorothioat
u	2'-O-metyluridin-3'-phosphat
us	2'-O-metyluridin-3'-phosphorothioat
s	Liên kết phosphorothioat
L96	N-[tris(GalNAc-alkyl)-amidodecanoyl]-4-hydroxyprolinol Hyp- (GalNAc-alkyl) ₃
dT	2'-deoxythymidin-3'-phosphat
dC	2'-deoxycytidin-3'-phosphat
Y44	ADN mất một bazơ nghịch đảo (2-hydroxymetyl-tetrahydrofuran-5-phosphat)
(Tgn)	Axit thymidin-glycol nucleic (GNA) chất đồng phân S
P	Phosphat
VP	Vinyl-phosphat
(Aam)	2'-O-(N-metylaxetamit)adenosin-3'-phosphat

Bảng 3. Các trình tự sợi đối nghĩa và có nghĩa không được cải biến của ARN sợi kép PD-L1

Tên sợi kép	Tên Oligo có nghĩa	Trình tự có nghĩa	Vị trí trong SEQ ID: 1	SEQ ID	Tên Oligo đối nghĩa	Trình tự đối nghĩa	Vị trí trong SEQ ID: 1	SEQ ID
AD-67630	A-135540	GAAGCUUUUCA AUGUGACCAA	332-351	18	A-135541	UUGGUCACA UUGAAAAGCUUCUC	330-351	19
AD-67639	A-135560	GAAGCUUUUCA AUGUGACCAA	332-351	20	A-135561	UUGGUCACA UUGAAAAGCUUCUC	330-351	21
AD-67649	A-135560	GAAGCUUUUCA AUGUGACCAA	332-351	22	A-135576	UUGGUCACA UUGAAAAGCUUCUC	330-351	23
AD-67634	A-135550	AGCUUUUCA AUGUGACCAGCA	334-353	24	A-135551	UGCUGGUCACA UUGAAAAGCUUC	332-353	25
AD-67644	A-135570	AGCUUUUCA AUGUGACCAGCA	334-353	26	A-135571	UGCUGGUCACA UUGAAAAGCUUC	332-353	27
AD-67654	A-135570	AGCUUUUCA AUGUGACCAGCA	334-353	28	A-135581	UGCUGGUCACA UUGAAAAGCUUC	332-353	29
AD-67627	A-135534	GCUUUUCA AUGUGACCAGCAA	335-354	30	A-135535	UUGCUGGUCACA UUGAAAAGCUU	333-354	31
AD-	A-	GCUUUUCA AUGUGACCAGCAA	335-354	32	A-	UUGCUGGUCACA UUGAAAAGCUU	333-354	33

Tên sợi kép	Tên Oligo có nghĩa	Trình tự có nghĩa	Vị trí trong SEQ ID: 1	SEQ ID	Tên Oligo đối nghĩa	Trình tự đối nghĩa	Vị trí trong SEQ ID: 1	SEQ ID
67636	135554				135555			
AD-67646	A-135554	GCUUUUCA AUGUGACCAAGCAA	335-354	34	A-135573	UUUCUGGUCACA UUUGAAAAGCUU	333-354	35
AD-67658	A-135590	CACACUGAGAAUCAACACAAA	353-372	36	A-135591	UUUGUGUUGAUUCUCAGUGUGCU	351-372	37
AD-67657	A-135586	CCAAAUGAAAGGACUCACUUA	471-490	38	A-135587	UAAAGUGAGUCCUUUCAUUUGGAG	469-490	39
AD-67632	A-135546	UACACAUUUGGAGGAGACGUA	620-639	40	A-135547	UACGUCUCCUCCAAAUGUGUAUC	618-639	41
AD-67642	A-135566	UACACAUUUGGAGGAGACGUA	620-639	42	A-135567	UACGUCUCCUCCAAAUGUGUAUC	618-639	43
AD-67652	A-135566	UACACAUUUGGAGGAGACGUA	620-639	44	A-135579	UACGUCUCCUCCAAAUGUGUAUC	618-639	45
AD-67629	A-135538	ACACAUUUGGAGGAGACGUAA	621-640	46	A-135539	UUACGUCUCCUCCAAAUGUGUAU	619-640	47
AD-	A-	ACACAUUUGGAGGAGACGUAA	621-640	48	A-	UUACGUCUCCUCCAAAUGUGUAU	619-640	49

Tên sợi kép	Tên Oligo có nghĩa	Trình tự có nghĩa	Vị trí trong SEQ ID: 1	SEQ ID	Tên Oligo đối nghĩa	Trình tự đối nghĩa	Vị trí trong SEQ ID: 1	SEQ ID
67638	135558				135559			
AD-67648	A-135558	ACACAUUUGGAGGAGACGUAA	621-640	50	A-135575	UUACGUCUCCUCCAAAUUGUGUAU	619-640	51
AD-67631	A-135544	CACAUUUGGAGGAGACGUAAU	622-641	52	A-135545	AUUACGUCUCCUCCAAAUUGUGUA	620-641	53
AD-67641	A-135564	CACAUUUGGAGGAGACGUAAU	622-641	54	A-135565	AUUACGUCUCCUCCAAAUUGUGUA	620-641	55
AD-67651	A-135564	CACAUUUGGAGGAGACGUAAU	622-641	56	A-135578	AUUACGUCUCCUCCAAAUUGUGUA	620-641	57
AD-67675	A-135630	GAGACCUUGAUACUUUCAAAU	848-867	58	A-135631	AUUUGAAAGUAUCAAGGUCUCCC	846-867	59
AD-67665	A-135608	UAAUUUGAGGGUCAGUUCUUA	978-997	60	A-135609	UAGGAACUGACCCUCAAUUUAGG	976-997	61
AD-67633	A-135548	UUCCUAUUUAUUUUGAGUCUA	1095-1114	62	A-135549	UAGACUCAAAAUAUAAUAGGAAAA	1093-1114	63
AD-	A-	UUCCUAUUUAUUUUGAGUCUA	1095-	64	A-	UAGACUCAAAAUAUAAUAGGAAAA	1093-	65

Tên sợi kép	Tên Oligo có nghĩa	Trình tự có nghĩa	Vị trí trong SEQ ID: 1	SEQ ID	Tên Oligo đối nghĩa	Trình tự đối nghĩa	Vị trí trong SEQ ID: 1	SEQ ID
67643	135568		1114		135569		1114	
AD-67653	A-135568	UUCCUAUUUAUUUUGAGUCUA	1095-1114	66	A-135580	UAGACUCAAAAUAUAGGAAA	1093-1114	67
AD-67640	A-135562	UCCUAUUUAUUUUGAGUCUGU	1096-1115	68	A-135563	ACAGACUCAAAAUAUAGGAAA	1094-1115	69
AD-67650	A-135562	UCCUAUUUAUUUUGAGUCUGU	1096-1115	70	A-135577	ACAGACUCAAAAUAUAGGAAA	1094-1115	71
AD-67663	A-135604	UUGAAGAUUAUUGUAGUAGA	1159-1178	72	A-135605	UCUACUACAAUAUAUCUCAA	1157-1178	73
AD-67676	A-135632	AUUGUAGUAGUUAACAAU	1169-1188	74	A-135633	AAUUGUAAACAUCUACAAUAU	1167-1188	75
AD-67666	A-135610	GUAUUUGUAAGGUGCUUGGUA	1247-1266	76	A-135611	UACCAAGCACCUUACAAAACUC	1245-1266	77
AD-67661	A-135596	AAGCAUAAAGAUCAAACCGUU	1295-1314	78	A-135597	AACGGUUUGAUCUUUAUGCUUCC	1293-1314	79
AD-	A-	CCUUUAUUUAACCCAUUAAUA	1333-	80	A-	UAUUAAUGGGUUAAAUAAGGUG	1331-	81

Tên sợi kép	Tên Oligo có nghĩa	Trình tự có nghĩa	Vị trí trong SEQ ID: 1	SEQ ID	Tên Oligo đối nghĩa	Trình tự đối nghĩa	Vị trí trong SEQ ID: 1	SEQ ID
67669	135618		1352		135619		1352	
AD-67667	A-135612	AGGAAGCAACAGAUUAAGUA	1520-1539	82	A-135613	UACUUAAUCUGUUUUGCUUCCUCA	1518-1539	83
AD-67674	A-135628	CAGGCAUUGAAUCUACAGUA	1684-1703	84	A-135629	UAUCUGUAGAUUCAUGCCUGGC	1682-1703	85
AD-67655	A-135582	UGAUUCAAAAUUCAAAAGUA	2105-2124	86	A-135583	UAUCUUUUGAAUUUUGAAUCAUG	2103-2124	87
AD-67672	A-135624	UCUAAAGAUAGUCUACAUUUA	2222-2241	88	A-135625	UAAAUGUAGACUAUCUUUAGAAG	2220-2241	89
AD-67659	A-135592	GGAAAUUGUAUGUUAAGCAA	2242-2261	90	A-135593	UUGCUUUUAACAUAUAUUUCCAA	2240-2261	91
AD-67673	A-135626	UGUUUUCUGCUUUCUGUCAAA	2650-2669	92	A-135627	UUUGACAGAAAGCAGAAAACAAA	2648-2669	93
AD-67664	A-135606	UUUCUGUCAAGUAUAAACUUA	2660-2679	94	A-135607	UAAGUUUAUACUUGACAGAAAGC	2658-2679	95
AD-	A-	UUUCUGUCAAGUAUAAACUUA	2661-	96	A-	UGAAGUUUAUACUUGACAGAAAG	2659-	97

Tên sợi kép	Tên Oligo có nghĩa	Trình tự có nghĩa	Vị trí trong SEQ ID: 1	SEQ ID	Tên Oligo đối nghĩa	Trình tự đối nghĩa	Vị trí trong SEQ ID: 1	SEQ ID
67662	135598		2680		135599		2680	
AD-67671	A-135622	GUACUUGCAAAUACAUUUU	2692-2711	98	A-135623	AAAUGUGAUUUUGCAAGUACAG	2690-2711	99
AD-67670	A-135620	UUCUUUGUGGAAUACAGGA	3033-3052	100	A-135621	UCCUGUAAUUCACACAAAGAACA	3031-3052	101
AD-67668	A-135616	UGUGGUGUUGGAUUUGUAAGA	3117-3136	102	A-135617	UCUUACAAAUCCAAACACCACAAG	3115-3136	103
AD-67660	A-135594	UCCCUUUUGUCUCAUGUUUCA	3145-3164	104	A-135595	UGAAACAUGAGACAAAAGGGAUA	3143-3164	105
AD-67656	A-135584	CUGCAUUUGAUUGCACUUUU	3200-3219	106	A-135585	AAAAGUGACAAUCAAUUGCAGAA	3198-3219	107
AD-67628	A-135536	UACCUGCAUUAUUUAUAAA	3223-3242	108	A-135537	UUUAUUAAAUAUAAUGCAGGUACA	3221-3242	109
AD-67637	A-135556	UACCUGCAUUAUUUAUAAA	3223-3242	110	A-135557	UUUAUUAAAUAUAAUGCAGGUACA	3221-3242	111
AD-	A-	UACCUGCAUUAUUUAUAAA	3223-	112	A-	UUUAUUAAAUAUAAUGCAGGUACA	3221-	113

Tên sợi kép	Tên Oligo có nghĩa	Trình tự có nghĩa	Vị trí trong SEQ ID: 1	SEQ ID	Tên Oligo đối nghĩa	Trình tự đối nghĩa	Vị trí trong SEQ ID: 1	SEQ ID
67647	135556		3242		135574		3242	
AD-67626	A-135532	ACCUGCAUUAUUUAAUAAAA	3224-3243	114	A-135533	UUUUUUUUAAUUAAUGCAGGUAC	3222-3243	115
AD-67635	A-135552	ACCUGCAUUAUUUAAUAAAA	3224-3243	116	A-135553	UUUUUUUUAAUUAAUGCAGGUAC	3222-3243	117
AD-67645	A-135552	ACCUGCAUUAUUUAAUAAAA	3224-3243	118	A-135572	UUUUUUUUAAUUAAUGCAGGUAC	3222-3243	119

Bảng 4. Số liệu CD274 Dual-Glo® Luciferaza và qPCR

Số liệu được biểu hiện dưới dạng phần trăm thông tin còn lại so với đối chứng không hướng đích.

	Số liệu thử nghiệm Luc ở các tế bào Cos7				Số liệu qPCR ở các tế bào RKO				
Tên sợi kép	10nM AVG	10nM STDEV	0,1nM AVG	0,1nM STDEV	10nM AVG	10nM STDEV	0,1nM AVG	0,1nM STDEV	Bắt đầu chuyển nhiễm
AD-67630	7,6	0,4	17,8	1,2	53,4	3,5	63,0	15,2	330
AD-67639	16,0	2,5	62,6	2,8	44,4	2,8	71,7	5,5	330
AD-67649	12,5	1,2	32,0	10,0	70,7	6,9	65,4	11,6	330
AD-67634	19,7	1,6	25,1	1,0	73,7	13,6	78,8	5,8	332
AD-67644	67,7	5,5	107,1	3,9	79,4	5,1	85,0	4,2	332
AD-67654	28,1	1,8	65,9	5,2	79,7	4,0	77,6	9,8	332
AD-67627	12,7	2,3	27,1	0,9	52,3	3,4	67,5	1,9	333
AD-67636	33,1	6,0	82,6	5,0	56,0	3,9	67,2	23,7	333
AD-67646	21,4	1,0	70,3	8,4	62,1	5,7	85,7	4,9	333
AD-67658	11,7	0,1	16,6	0,8	35,3	5,4	58,4	3,2	351

	Số liệu thử nghiệm Luc ở các tế bào Cos7				Số liệu qPCR ở các tế bào RKO				
Tên sợi kép	10nM AVG	10nM STDEV	0,1nM AVG	0,1nM STDEV	10nM AVG	10nM STDEV	0,1nM AVG	0,1nM STDEV	Bắt đầu chuyển nhiễm
AD-67657	18,7	3,2	55,0	3,0	53,7	8,4	61,7	15,7	469
AD-67632	6,0	0,3	10,1	0,8	25,9	4,9	29,1	15,5	618
AD-67642	33,7	3,6	79,1	0,7	52,4	4,9	85,3	0,6	618
AD-67652	25,9	5,9	49,3	0,9	30,6	1,7	75,3	4,0	618
AD-67629	10,4	0,6	24,9	1,9	23,1	1,9	47,6	4,8	619
AD-67638	15,9	1,2	79,5	5,1	28,6	2,9	68,3	6,7	619
AD-67648	13,6	1,2	35,4	5,3	18,9	4,3	62,6	7,0	619
AD-67631	6,8	1,0	11,4	0,8	18,5	2,8	42,9	1,2	620
AD-67641	19,2	3,2	61,2	9,4	67,3	8,7	62,3	11,4	620
AD-67651	15,2	0,9	48,5	1,1	45,3	5,9	81,8	7,6	620
AD-67675	18,5	1,1	30,7	4,2	44,4	4,8	58,6	8,6	846
AD-67665	29,9	1,1	34,3	2,8	36,4	2,0	54,0	4,4	976
AD-67633	7,4	0,8	23,2	1,0	42,5	4,9	55,3	26,1	1093

	Số liệu thử nghiệm Luc ở các tế bào Cos7				Số liệu qPCR ở các tế bào RKO				
Tên sợi kép	10nM AVG	10nM STDEV	0,1nM AVG	0,1nM STDEV	10nM AVG	10nM STDEV	0,1nM AVG	0,1nM STDEV	Bắt đầu chuyển nhiễm
AD-67643	9,2	0,5	57,4	4,1	32,7	1,9	71,5	5,5	1093
AD-67653	7,7	0,1	16,2	1,2	22,0	1,8	59,5	4,8	1093
AD-67640	6,7	0,5	31,8	2,2	18,4	4,4	45,1	14,4	1094
AD-67650	7,3	0,7	17,3	2,3	22,0	1,7	45,6	3,2	1094
AD-67663	13,2	2,2	33,8	3,3	35,7	2,6	46,5	2,7	1157
AD-67676	10,4	1,2	27,7	3,1	34,7	4,3	51,8	4,4	1167
AD-67666	9,3	0,6	14,7	1,8	47,5	4,7	63,4	6,5	1245
AD-67661	9,9	0,6	21,1	1,1	37,1	2,0	48,9	3,1	1293
AD-67669	25,4	4,2	51,9	5,8	52,0	3,3	73,3	12,0	1331
AD-67667	15,8	4,0	31,4	1,0	35,8	0,3	51,0	3,7	1518
AD-67674	13,8	2,7	21,3	3,9	43,1	10,8	61,2	15,1	1682
AD-67655	5,8	1,5	20,5	3,2	23,2	3,4	40,2	3,7	2103
AD-67672	5,7	0,3	13,5	0,5	36,1	9,0	52,5	2,6	2220

	Số liệu thử nghiệm Luc ở các tế bào Cos7				Số liệu qPCR ở các tế bào RKO				
Tên sợi kép	10nM AVG	10nM STDEV	0,1nM AVG	0,1nM STDEV	10nM AVG	10nM STDEV	0,1nM AVG	0,1nM STDEV	Bắt đầu chuyển nhiễm
AD-67659	12,0	1,8	24,3	4,3	32,8	2,4	54,0	5,5	2240
AD-67673	8,1	0,5	44,0	5,0	33,2	1,4	58,8	8,6	2648
AD-67664	10,1	0,4	20,1	4,9	37,3	2,9	48,2	3,1	2658
AD-67662	14,6	0,9	25,9	0,6	28,6	1,8	40,3	3,0	2659
AD-67671	5,8	1,0	32,2	7,4	49,1	2,0	65,0	3,5	2690
AD-67670	9,6	0,6	28,7	3,5	41,0	2,0	63,6	3,5	3031
AD-67668	15,7	3,2	30,7	6,3	42,4	7,2	62,8	2,2	3115
AD-67660	4,9	0,6	17,1	2,7	29,2	2,0	53,5	1,7	3143
AD-67656	6,1	1,0	6,6	0,7	27,9	6,6	36,0	7,0	3198
AD-67628	11,6	0,3	26,8	3,7	38,8	4,7	53,1	8,4	3221
AD-67637	8,8	0,6	24,6	4,2	26,9	0,7	45,5	7,8	3221
AD-67647	9,1	0,6	23,7	4,1	25,2	1,3	47,3	2,2	3221
AD-67626	7,3	0,6	7,7	0,4	29,1	8,9	26,5	9,4	3222

	Số liệu thử nghiệm Luc ở các tế bào Cos7				Số liệu qPCR ở các tế bào RKO				
Tên sợi kép	10nM AVG	10nM STDEV	0,1nM AVG	0,1nM STDEV	10nM AVG	10nM STDEV	0,1nM AVG	0,1nM STDEV	Bắt đầu chuyển nhiễm
AD-67635	9,3	1,0	28,2	4,4	26,3	3,0	49,7	4,8	3222
AD-67645	9,2	1,0	44,7	7,2	29,0	1,5	57,8	5,0	3222

Bảng 5. Các trình tự được cải biến PD-L1

Tên sợi kép	Tên Oligo có nghĩa	Trình tự Oligo	SEQ ID	Tên Oligo đối nghĩa	Trình tự Oligo đối nghĩa	SEQ ID	Bắt đầu chuyển nhiễm ở SEQ ID: 1
AD-67630	A-135540	Y44GAAGCUUUUCA AUGAGACCAa	120	A-135541	UUGGUCACAUUGAAAAGCUUUCUc	121	330
AD-67639	A-135560	gsasagcuUfuUfCfAfaugugaccaal96	122	A-135561	usUfsgguCfaCfa fuugaAfaAfgcuucsusc	123	330
AD-67649	A-135560	gsasagcuUfuUfCfAfaugugaccaal96	124	A-135576	UfsUfsgguCfaCfa fuugaAfaAfgcuucsusc	125	330
AD-67634	A-135550	Y44AGCUUUUCA AUGAGCCAGCa	126	A-135551	UGCUGGUCACAUUGAAAAGCUUC	127	332
AD-67644	A-135570	asgscuuuUfcAfAfUfugaccagcaL96	128	A-135571	usGfscugGfuCfAfcauuGfaAfaagcususc	129	332
AD-67654	A-135570	asgscuuuUfcAfAfUfugaccagcaL96	130	A-135581	UfsGfscugGfuCfAfcauuGfaAfaagcususc	131	332
AD-67627	A-135534	Y44GCUUUUCA AUGAGCCAGCAa	132	A-135535	UUGCUGGUCACAUUGAAAAGCUUu	133	333

Tên sợi kép	Tên Oligo có nghĩa	Trình tự Oligo	SEQ ID	Tên Oligo đối nghĩa	Trình tự Oligo đối nghĩa	SEQ ID	Bắt đầu chuyển nhiễm ở SEQ ID: 1
AD-67636	A-135554	gscsuuuuCfaAflUfGfugaccagcaal96	134	A-135555	usUfsgcuGfgUfCfcauUfgAfaagcsusu	135	333
AD-67646	A-135554	gscsuuuuCfaAflUfGfugaccagcaal96	136	A-135573	UfsUfsgcuGfgUfCfcauUfgAfaagcsusu	137	333
AD-67658	A-135590	CACACUGAGAAUCAACACAAa	138	A-135591	UUUGUGUGAUUCUCAGUGUGCa	139	351
AD-67657	A-135586	CCAAAUAGAAAGGACUCACUUA	140	A-135587	UAAGUGAGUCCUUUCAUUUGGAg	141	469
AD-67632	A-135546	Y44UACACAUUUGGAGGAGACGUa	142	A-135547	UACGUCUCCUCCAAAUUGUGUAUc	143	618
AD-67642	A-135566	usascacaUfuUfGfGfaggagacgual96	144	A-135567	usAfscguCfuCfCfuccaAfaUfguguasusc	145	618
AD-67652	A-135566	usascacaUfuUfGfGfaggagacgual96	146	A-135579	UfsAfscguCfuCfCfuccaAfaUfguguasusc	147	618
AD-67629	A-135538	Y44ACACAUUUGGAGGAGACGUAA	148	A-135539	UUACGUCUCCUCCAAAUGUGUAu	149	619
AD-	A-	ascacauUfuGfGfAfggagacgual96	150	A-135559	usUfsacgUfcUfCfcuccAfaAfgugusasusu	151	619

Tên sợi kép	Tên Oligo có nghĩa	Trình tự Oligo	SEQ ID	Tên Oligo đối nghĩa	Trình tự Oligo đối nghĩa	SEQ ID	Bắt đầu chuyển nhiễm ở SEQ ID: 1
67638	135558						
AD-67648	A-135558	ascacauUfuGfGfAfggagacguaaL96	152	A-135575	UfsUfsacgUfcUfcfcuccAfaAfaugugusasu	153	619
AD-67631	A-135544	Y44CACAUUUGGAGGAGACGUAAu	154	A-135545	AUUACGUCUCUCCUCCAAUUGUGUa	155	620
AD-67641	A-135564	csascauuUfgGfAfGfgagacguaaL96	156	A-135565	asUfsuacGfuCfUfccucCfaAfaugugsusa	157	620
AD-67651	A-135564	csascauuUfgGfAfGfgagacguaaL96	158	A-135578	AfsUfsuacGfuCfUfccucCfaAfaugugsusa	159	620
AD-67675	A-135630	GAGACCUUGAUACUUAUCAAu	160	A-135631	AUUUGAAAAGUAUCAAGGUCUCUCCc	161	846
AD-67665	A-135608	UAAUUUGAGGGUCAGUUCCUa	162	A-135609	UAGGAACUGACCCUCAAUUUAGg	163	976
AD-67633	A-135548	Y44UUCCUAUUUAUUUUGAGUCUa	164	A-135549	UAGACUCAAAAUAAAUAGGAAAa	165	1093
AD-67643	A-135568	ususccuaUfuUfAfUfuugagucuaL96	166	A-135569	usAfsagacUfcAfaAfaaAfaUfaggaasasa	167	1093

Tên sợi kép	Tên Oligo có nghĩa	Trình tự Oligo	SEQ ID	Tên Oligo đối nghĩa	Trình tự Oligo đối nghĩa	SEQ ID	Bắt đầu chuyển nhiễm ở SEQ ID: 1
AD-67653	A-135568	ususcuaUfuUfAfUfuugagucuaL96	168	A-135580	UfsAfsagacUfcAfAfaauaAfaUfaggaasasa	169	1093
AD-67640	A-135562	uscscuaUfuAfUfuugagucuguL96	170	A-135563	asCfsagaCfuCfAfaauAfaAfuaggasasa	171	1094
AD-67650	A-135562	uscscuaUfuAfUfuugagucuguL96	172	A-135577	AfsCfsagaCfuCfAfaauAfaAfuaggasasa	173	1094
AD-67663	A-135604	UUGAAGAUAAUUAUUGUAGUAGa	174	A-135605	UCUACUACAAUAUAUCUUCUCAAaa	175	1157
AD-67676	A-135632	AUUGUAGUAGAUGUUAACAUAu	176	A-135633	AAUUGUAAACAUCUACUACAAUAu	177	1167
AD-67666	A-135610	GUAUUUGUAAAGGUGCUUGGUa	178	A-135611	UACCAAGCACCCUUAACAAAUACUc	179	1245
AD-67661	A-135596	AAGCAUAAAGAUCAAACCGUa	180	A-135597	AACGGUUUGAUCUUUAUGCUUCa	181	1293
AD-67669	A-135618	CCUUUAUUUAACCCAUUAAUA	182	A-135619	UAUUAAUGGGUUAAAAUAAAGGUG	183	1331
AD-	A-	AGGAAGCAACACAGAUUAAAGUa	184	A-135613	UACUUAUCUGUUUGCUUCCUCa	185	1518

Tên sợi kép	Tên Oligo có nghĩa	Trình tự Oligo	SEQ ID	Tên Oligo đối nghĩa	Trình tự Oligo đối nghĩa	SEQ ID	Bắt đầu chuyển nhiễm ở SEQ ID: 1
67667	135612						
AD-67674	A-135628	CAGGCAUUGAAUCUACAGAUa	186	A-135629	UAUCUGUAGAUUCA AUGCCUGGc	187	1682
AD-67655	A-135582	UGAUUCAA AAUUC AAAAGAUa	188	A-135583	UAUCUUUUUGAAUUUUGAAUCAUg	189	2103
AD-67672	A-135624	UCUAAAAGAUAGUCUACAUUUa	190	A-135625	UAAAUGUAGACUAUCUUUUGAAGa	191	2220
AD-67659	A-135592	GGAAAUGUAUGUUAAAAGCAa	192	A-135593	UUUCUUUUUAAACAUAUAUUUCCAA	193	2240
AD-67673	A-135626	UGUUUUUCUGCUUUUCUGUCAAA	194	A-135627	UUUGACAGAAAAGCAGAAAACAAa	195	2648
AD-67664	A-135606	UUUCUGUCAAGUAUAAACUUa	196	A-135607	UAAGUUUUAUACUUGACAGAAAAGc	197	2658
AD-67662	A-135598	UUCUGUCAAGUAUAAACUUa	198	A-135599	UGAAGUUUAUACUUGACAGAAAAG	199	2659
AD-67671	A-135622	GUACUUGCAAAAUCAUAUUUu	200	A-135623	AAA AUGUAUUUUUGCAAGUACAg	201	2690

Tên sợi kép	Tên Oligo có nghĩa	Trình tự Oligo	SEQ ID	Tên Oligo đối nghĩa	Trình tự Oligo đối nghĩa	SEQ ID	Bắt đầu chuyển nhiễm ở SEQ ID: 1
AD-67670	A-135620	UUCUUUGUGUGAAUACAGGa	202	A-135621	UCCUGUAUUUCACACAAAGACa	203	3031
AD-67668	A-135616	UGUGGUGUUGGAUUUGUAGa	204	A-135617	UCUUACAAAUCCAAACACCACAag	205	3115
AD-67660	A-135594	UCCUUUUGUCUCAUGUUUCa	206	A-135595	UGAAACAUGAGACAAAAGGGAUa	207	3143
AD-67656	A-135584	CUGCAUUUGAUUGUCACUUUu	208	A-135585	AAAAGUGACAAUCAAUUGCAGAA	209	3198
AD-67628	A-135536	Y44UACCGCAUUAUUUAAUAAa	210	A-135537	UUUAUUAAAUAUAAUGCAGGUACa	211	3221
AD-67637	A-135556	usasccugCfaUfUfAfauuuauaaaL96	212	A-135557	usUfsuauUfaAfAfauaaUfgCfagguaasca	213	3221
AD-67647	A-135556	usasccugCfaUfUfAfauuuauaaaL96	214	A-135574	UfsUfsuauUfaAfAfauaaUfgCfagguaasca	215	3221
AD-67626	A-135532	Y44ACCGCAUUAUUUAAUAAa	216	A-135533	UUUUAUUAAAUAUAAUGCAGGUAc	217	3222
AD-	A-	ascscugcAfuUfAfAfauuuauaaaL96	218	A-135553	usUfsuauUfuAfAfauuaAfuGfcaggusasc	219	3222

Tên sợi kép	Tên Oligo có nghĩa	Trình tự Oligo	SEQ ID	Tên Oligo đối nghĩa	Trình tự Oligo đối nghĩa	SEQ ID	Bắt đầu chuyển nhiễm ở SEQ ID: 1
67635	135552						
AD-67645	A-135552	ascscugcAfuUfAfAfuuuauaaaaL96	220	A-135572	UfsUfsuuaUfuAfAfauuaAfuGfcaggusasc	221	3222

Các phương án tương đương

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận ra rằng, hoặc có khả năng biết chắc rằng bằng cách sử dụng không nhiều hơn thử nghiệm thông thường, có nhiều phương án tương đương với các phương án cụ thể và phương pháp mô tả ở đây. Các phương án tương đương như vậy được dự định được bao hàm bởi phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tác nhân axit ribonucleic sợi kép (dsARNi) để ức chế sự biểu hiện của phối tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1 (programmed cell death 1 ligand 1 - PD-L1), trong đó tác nhân dsARNi đã nêu bao gồm một sợi có nghĩa và một sợi đối nghĩa, trong đó sợi có nghĩa đã nêu bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kế khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ các nucleotit bất kỳ trong số các nucleotit 3222-3243 của trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và sợi đối nghĩa đã nêu bao gồm ít nhất 15 nucleotit liên kế khác nhau bởi không nhiều hơn 3 nucleotit từ phần bổ trợ của trình tự nucleotit SEQ ID NO:2,

trong đó về cơ bản toàn bộ nucleotit của sợi có nghĩa đã nêu và về cơ bản toàn bộ nucleotit của sợi đối nghĩa đã nêu bao gồm các cải biến nucleotit, và

trong đó sợi có nghĩa đã nêu được tiếp hợp với dẫn xuất N-acetyl-galactosamin (GalNAc) được gắn ở đầu tận cùng 3'.

2. Tác nhân dsARNi theo điểm 1, trong đó:

(a) sợi có nghĩa bao gồm 5'-ACCUGCAUUAUUAUAAAA-3' (SEQ ID NO:116) và sợi đối nghĩa bao gồm 5'—UUUUAUUAUUAAUAAUGCAGGUAC-3' (SEQ ID NO:117); hoặc

(b) sợi có nghĩa bao gồm 5'—UACCUGCAUUAUUAUAAAA-3' (SEQ ID NO:110) và sợi đối nghĩa đã nêu bao gồm 5'—UUUAUUAUUAAUAAUGCAGGUACA-3' (SEQ ID NO:111).

3. Tác nhân dsARNi theo điểm 1, trong đó:

(a) sợi có nghĩa bao gồm 5'-ascscugcAfuUfAfAfuuuaauaaaaL96-3' (SEQ ID NO:218) và sợi đối nghĩa bao gồm 5'-usUfsuuaUfuAfAfauuaAfuGfcaggusasc-3' (SEQ ID NO:219);

(b) sợi có nghĩa bao gồm 5'-ascscugcAfuUfAfAfuuuaauaaaaL96-3' (SEQ ID NO:220) và sợi đối nghĩa đã nêu bao gồm 5'—UfsUfsuuaUfuAfAfauuaAfuGfcaggusasc-3' (SEQ ID NO:221);

(c) sợi có nghĩa bao gồm 5'-usascugCfaUfUfAfauuuaauaaaL96-3' (SEQ IDNO:212) và sợi đối nghĩa đã nêu bao gồm 5'-usUfsuauUfaAfAfuaaaUfgCfagguascsa-3' (SEQ IDNO:213); hoặc

(d) sợi có nghĩa bao gồm 5'-usascugCfaUfUfAfauuuaauaaaL96-3' (SEQ IDNO:214) và sợi đối nghĩa đã nêu bao gồm 5'—UfsUfsuauUfaAfAfuaaaUfgCfagguascsa-3' (SEQ IDNO:215);

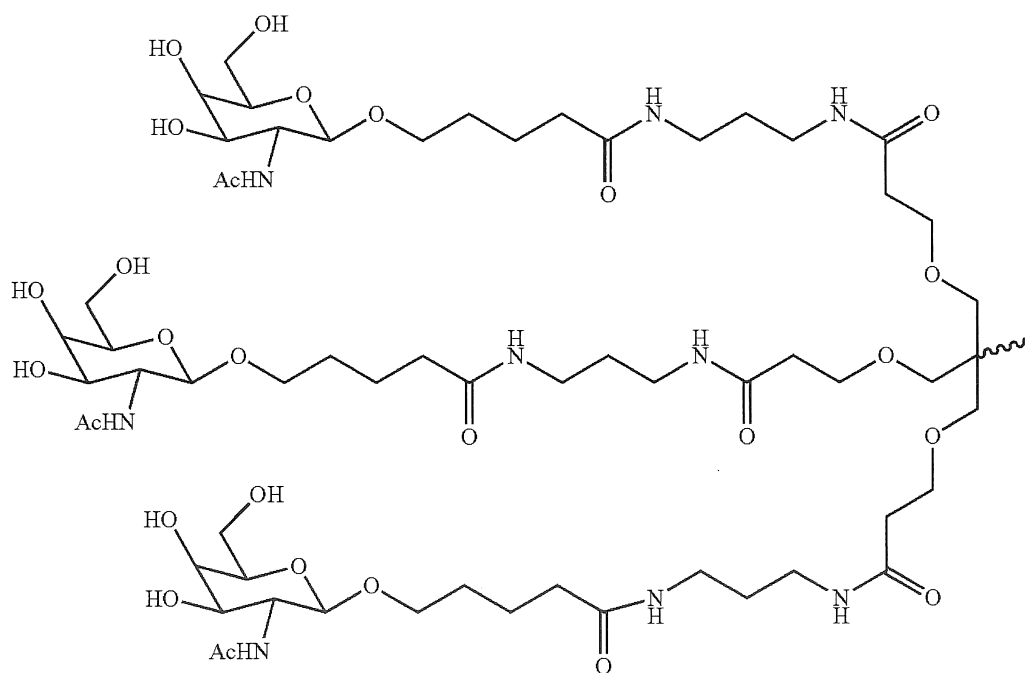
trong đó a, c, g, và u là 2'-O-metyl (2'-OMe) A, 2'-OMe C, 2'-OMe G, và 2'-OMe U, tương ứng; Af, Cf, Gf, và Uf là 2'-flo A, 2'-flo C, 2'-flo G, và 2'-flo U, tương ứng; s là liên kết phosphorothioat; và L96 là N-[tris(GalNAc-alkyl)-(amidodecanoyl)]-4-hydroxyprolinol.

4. Tác nhân dsARNi theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong số các cải biến nucleotit đã nêu được chọn từ nhóm gồm deoxy-nucleotit, nucleotit deoxy-thymin (dT) đầu tận cùng 3', nucleotit được cải biến 2'-O-metyl, nucleotit được cải biến 2'-flo, nucleotit được cải biến 2'-deoxy, nucleotit dạng khóa, nucleotit dạng không khóa, nucleotit giới hạn một cách thích ứng, etyl nucleotit không tự nhiên, nucleotit mất một bazơ, nucleotit cải biến 2'-amino, nucleotit cải biến 2'-O-allyl, nucleotit cải biến 2'-C-alkyl, nucleotit cải biến 2'-hydroxly, nucleotit cải biến 2'-metoxyetyl, nucleotit cải biến 2'-O-alkyl, morpholino nucleotit, phosphoramidat, nucleotit chứa bazơ không tự nhiên, nucleotit cải biến tetrahydropyran, nucleotit cải biến 1,5-anhydrohexitol, nucleotit cải biến xyclohexenyl, nucleotit chứa nhóm phosphorothioat, nucleotit chứa nhóm metylphosphonat, nucleotit chứa 5'-phosphat, và nucleotit chứa nhóm giả 5'-phosphat.

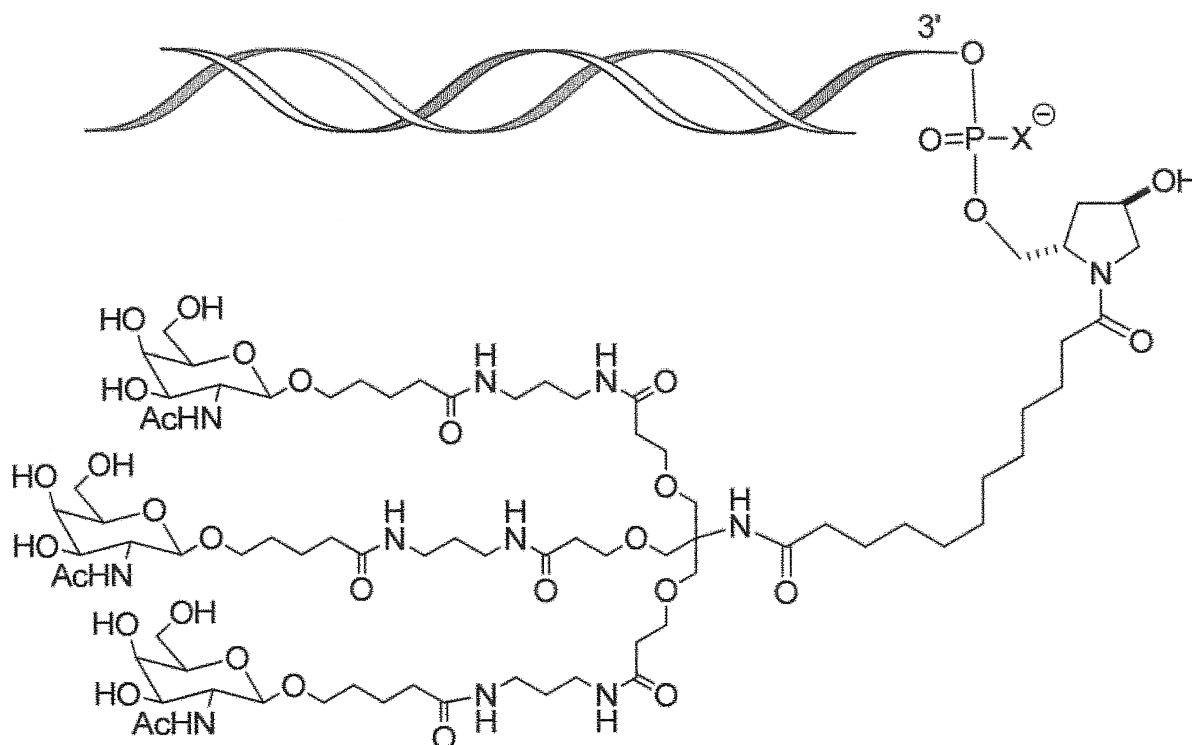
5. Tác nhân dsARNi theo điểm 1, trong đó mỗi sợi có chiều dài không lớn hơn 30 nucleotit.

6. Tác nhân dsARNi theo điểm 1, trong đó ít nhất một sợi chứa phần nhô ra ở đầu 3' gồm ít nhất 1 nucleotit.

7. Tác nhân dsARNi theo điểm 1, trong đó dẫn xuất GalNAc là:



8. Tác nhân dsARNi theo điểm 7, trong đó tác nhân dsARNi này được liên hợp với dẫn xuất GalNAc như được thể hiện trong sơ đồ dưới đây:



và, trong đó X bằng 0 hoặc là S.

9. Tác nhân dsARNi theo điểm 8, trong đó X bằng 0.
10. Tác nhân dsARNi theo điểm 1, trong đó các cải biến nucleotit được chọn từ nhóm gồm LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxyetyl, 2'-O-alkyl, 2'-O-allyl, 2'-C- allyl, 2'-flo, 2'-deoxy, 2'-hydroxyl, và tổ hợp của chúng.
11. Tác nhân dsARNi theo điểm 10, trong đó các cải biến nucleotit là các cải biến 2'-O-metyl hoặc 2'-flo.
12. Tác nhân dsARNi theo điểm 1, trong đó phối tử là một hoặc nhiều dẫn xuất GalNAc được gắn qua một đoạn liên kết mạch nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba.
13. Tác nhân dsARNi theo điểm 1, trong đó tác nhân này còn bao gồm ít nhất một liên kết liên nucleotit phosphorothioat hoặc metylphosphonat.
14. Tác nhân dsARNi theo điểm 1,
trong đó về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa đã nêu bao gồm một cải biến nucleotit được chọn từ nhóm gồm cải biến 2'-O-metyl và cải biến 2'-flo,
trong đó sợi có nghĩa này chứa hai liên kết liên nucleotit phosphorothioat ở đầu tận cùng 5',
trong đó về cơ bản tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa đã nêu bao gồm một cải biến nucleotit được chọn từ nhóm gồm cải biến 2'-O-metyl và cải biến 2'-flo, và
trong đó sợi đối nghĩa đã nêu bao gồm hai liên kết liên nucleotit phosphorothioat ở đầu tận cùng 5' và hai liên kết liên nucleotit phosphorothioat ở đầu tận cùng 3'.
15. Dược phẩm để ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 chứa tác nhân dsARNi theo điểm 1.
16. Dược phẩm theo điểm 15, còn chứa chế phẩm lipid.
17. Phương pháp in vitro ức chế sự biểu hiện PD-L1 ở tế bào, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho tế bào tiếp xúc với tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 1, nhờ đó ức chế sự biểu hiện của gen PD-L1 ở tế bào này.

Danh mục trình tự

<110> ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.

<120> Tác nhân axit ribonucleic sợi kép (dsARNi) để ức chế sự biểu hiện của
phổ tử 1 gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-L1) và được phẩm chứa nó

<130> 121301-04220

<140>

<141>

<150> 62/213,224

<151> 2015-09-02

<160> 221

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3349

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggcgcaacgc tgagcagctg gcgcgtcccg cgcgggcccca gttctgcgca gcttcccag	60
gctccgcacc agccgcgctt ctgtccgcct gcagggcatt ccagaaagat gaggatattt	120
gctgtcttta tattcatgac ctactggcat ttgctgaacg cccatacaa caaatcaac	180
caaagaattt tggttgtgga tccagtcacc tctgaacatg aactgacatg tcaggctgag	240
ggctacccca aggccgaagt catctggaca agcagtgacc atcaagtcct gagtggtgtaag	300
accaccacca ccaattccaa gagagaggag aagcttttca atgtgaccag cacactgaga	360
atcaacacaa caactaatga gattttctac tgcactttta ggagattaga tcctgaggaa	420
aaccatacag ctgaattggt catcccagaa ctacctctgg cacatcctcc aatgaaagg	480
actcatttgg taattctggg agccatctta ttatgccttg gtgtagcact gacattcatc	540
ttccgtttta gaaaaggagg aatgatggat gtgaaaaaat gtggcatcca agatacaaac	600
tcaaagaagc aaagtgatac acatttggag gagacgtaat ccagcattgg aacttctgat	660
cttcaagcag ggattctcaa cctgtgggtt aggggttcat cggggctgag cgtgacaaga	720
ggaaggaatg ggcccgctgg atgcaggcaa tgtgggactt aaaaggccca agcactgaaa	780
atggaacctg gcgaaagcag aggaggagaa tgaagaaaga tggagtcaaa cagggagcct	840
ggagggagac cttgatactt tcaaatgcct gaggggctca tcgacgcctg tgacagggag	900

aaaggatact tctgaacaag gagcctccaa gcaaatcatc cattgctcat cctaggaaga	960
cggggttgaga atccctaatt tgaggggtcag ttcttgcaga agtgcccttt gcctccactc	1020
aatgcctcaa tttgttttct gcatgactga gagtctcagt gttggaacgg gacagtattt	1080
atgtatgagt ttttcctatt tattttgagt ctgtgaggtc ttcttgtcat gtgagtgtgg	1140
ttgtgaatga tttcttttga agatatattg tagtagatgt tacaattttg tcgccaaact	1200
aaacttgctg cttaatgatt tgctcacatc tagtaaaaca tggagtattt gtaagggtgct	1260
tgggtctcctc tataactaca agtatacatt ggaagcataa agatcaaacc gttgggttgca	1320
taggatgtca cctttattta acccattaat actctggttg acctaattctt attctcagac	1380
ctcaagtgtc tgtgcagtat ctgttccatt taaatatcag ctttacaatt atgtggtagc	1440
ctacacacat aatctcattt catcgctgta accaccctgt tgtgataacc actattattt	1500
taccatcgt acagctgagg aagcaaacag attaagtaac ttgcccaaac cagtaaatag	1560
cagacctcag actgccaccc actgtccttt tataatacaa ttacagcta tattttactt	1620
taagcaattc ttttattcaa aaaccattta ttaagtgtcc ttgcaatatc aatcgctgtg	1680
ccaggcattg aatctacaga tgtgagcaag acaaagtacc tgtcctcaag gagctcatag	1740
tataatgagg agattaacaa gaaaatgtat tattacaatt tagtccagtg tcatagcata	1800
aggatgatgc gaggggaaaa cccgagcagt gttgccaaaga ggaggaaata ggccaatgtg	1860
gtctgggacg gttggatata cttaaaccatc ttaataatca gagtaatttt catttacaaa	1920
gagaggtcgg tacttaaaat aaccctgaaa aataacactg gaattccttt tctagcatta	1980
tatttattcc tgatttgctt ttgccatata atctaattgct tgtttatata gtgtctggta	2040
ttgtttaaca gttctgtctt ttctatttaa atgccactaa attttaaatt catacctttc	2100
catgattcaa aattcaaaag atcccatggg agatggttgg aaaatctcca cttcatcctc	2160
caagccattc aagtttcctt tccagaagca actgctactg cctttcattc atatgttctt	2220
ctaaagatag tctacatttg gaaatgtatg ttaaaagcac gtatttttaa aatttttttc	2280
ctaaatagta acacattgta tgtctgctgt gtactttgct atttttatatt attttagtgt	2340
ttcttatata gcagatggaa tgaatttgaa gttcccaggg ctgaggatcc atgccttctt	2400
tgtttctaag ttatctttcc catagctttt cattatcttt catatgatcc agtatatggt	2460

aaatatgtcc tacatataca tttagacaac caccatttgt taagtatttg ctctaggaca	2520
gagtttggat ttgtttatgt ttgctcaaaa ggagacccat gggctctcca ggggtgactg	2580
agtcaatcta gtcctaaaaa gcaatcttat tattaactct gtatgacaga atcatgtctg	2640
gaacttttgt tttctgcttt ctgtcaagta taaacttcac tttgatgctg tacttgcaaa	2700
atcacatttt ctttctggaa attcggcag tgtaccttga ctgctagcta ccctgtgcca	2760
gaaaagcctc attcgttgtg cttgaaccct tgaatgccac cagctgtcat cactacacag	2820
ccctcctaag aggccttctg gaggtttcga gattcagatg ccctgggaga tcccagagtt	2880
tcctttccct cttggccata ttctggtgtc aatgacaagg agtaccttgg ctttgccaca	2940
tgtcaaggct gaagaaacag tgtctccaac agagctcctt gtgttatctg tttgtacatg	3000
tgcatttgta cagtaattgg tgtgacagtg ttctttgtgt gaattacagg caagaattgt	3060
ggctgagcaa ggcacatagt ctactcagtc tattcctaag tcctaactcc tccttgtggt	3120
gttggtttg taaggcactt tatccctttt gtctcatgtt tcatcgtaaa tggcataggc	3180
agagatgata cctaattctg catttgattg tcactttttg tacctgcatt aatttaataa	3240
aatattctta tttattttgt tacttggtac accagcatgt ccattttctt gtttattttg	3300
tgtttaataa aatgttcagt ttaacatccc agtggagaaa gttaaaaaa	3349

<210> 2

<211> 3349

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

ttttttaact ttctccactg ggatgttaaa ctgaacattt tattaaacac aaaataaaca	60
agaaaatgga catgctggtg taccaagtaa caaaataaat aagaatattt tattaaatta	120
atgcaggtac aaaaagtgac aatcaaatgc agaattaggt atcatctctg cctatgccat	180
ttacgatgaa acatgagaca aaagggataa agtgccttac aaatccaaca ccacaaggag	240
gagttaggac ttaggaatag actgagtaga ctatgtgcct tgctcagcca caattcttgc	300
ctgtaattca cacaaagaac actgtcacac caattactgt acaaatgcac atgtacaaac	360
agataacaca aggagctctg ttggagacac tgtttcttca gccttgacat gtggcaaagc	420

caaggtactc cttgtcattg acaccagaat atggccaaga gggaaaggaa actctgggat	480
ctcccagggc atctgaatct cgaaacctcc aggaagcctc ttaggagggc tgtgtagtga	540
tgacagctgg tggcattcaa gggttcaagc acaacgaatg aggcttttct ggcacagggt	600
agctagcagt caaggtacac tgccggaatt tccagaaaga aaatgtgatt ttgcaagtac	660
agcatcaaag tgaagtttat acttgacaga aagcagaaaa caaaagttcc agacatgatt	720
ctgtcataca gagttaataa taagattgct ttttaggact agattgactc agtgcaccct	780
ggagagccca tgggtctcct tttagagcaa cataaacaaa tccaaactct gtcctagagc	840
aaataacttaa caaatggtgg ttgtctaaat gtatatgtag gacatattha acatatactg	900
gatcatatga aagataatga aaagctatgg gaaagataac ttagaaacaa agaaggcatg	960
gatcctcagc cctgggaact tcaaattcat tccatctgct atataagaaa cactaaaata	1020
aataaaaata gcaaagtaca cagcagacat acaatgtggt actatttagg aaaaaattt	1080
taaaaatacg tgcttttaac atacatttcc aaatgtagac tatctttaga agaacatatg	1140
aatgaaaggc agtagcagtt gcttctggaa aggaaacttg aatggcttgg aggatgaagt	1200
ggagatthtc caaccatctc ccatgggatc ttttgaattt tgaatcatgg aaaggtatga	1260
atttaaaatt tagtggcatt taaatagaaa agacagaact gttaaacaat accagacact	1320
atataaacia gcattagatt atatggcaaa ggcaaatcag gaataaatat aatgctagaa	1380
aaggaattcc agtgthattt ttcagggtta ttttaagtac cgacctctct ttgtaaatga	1440
aaattactct gattattaag atgtttaagt atatccaacc gtcccagacc acattggcct	1500
atttctctct cttggcaaca ctgctcgggt tttcccctcg catcatcctt atgctatgac	1560
actggactaa attgtaataa tacattttct tgttaatctc ctcatatac tatgagctcc	1620
ttgaggacag gtactttgtc ttgctcacat ctgtagattc aatgcctggc acagcgattg	1680
atattgcaag ggcacttaat aaatggtttt tgaataaaag aattgcttaa agtaaaatat	1740
agctgtaaat tgtattataa aaggacagtg ggtggcagtc tgaggctctgc tatttactgg	1800
tttgggcaag ttacttaatc tgtttgcttc ctgagctgta cgatgggtaa aataatagtg	1860
gttatcacia cagggtgggt acagcgatga aatgagatta tgtgtgtagg ctaccacata	1920
attgtaaagc tgatatttaa atggaacaga tactgcacag acacttgagg tctgagaata	1980

```

agattaggtc aaccagagta ttaatgggtt aaataaaggt gacatcctat gcaaccaacg      2040
gtttgatctt tatgcttcca atgtatactt gtagttatag aggagaccaa gcaccttaca      2100
aatactccat gttttactag atgtgagcaa atcattaagc agcaagttta gtttggcgac      2160
aaaattgtaa catctactac aatatatctt caaaagaaat cattcacaac cacactcaca      2220
tgacaagaag acctcacaga ctcaaaataa ataggaaaaa ctcatacata aatactgtcc      2280
cgttccaaca ctgagactct cagtcatgca gaaaacaaat tgaggcattg agtggaggca      2340
aagggcactt ctgcaggaac tgaccctcaa attagggatt ctcaaccctg ctccctagga      2400
tgagcaatgg atgatttgct tggaggctcc ttgttcagaa gtatcctttc tccctgtcac      2460
aggcgtcgat gagcccctca ggcatttgaa agtatcaagg tctccctcca ggctccctgt      2520
ttgactccat ctttcttcat tctcctcctc tgctttcgcc aggttccatt ttcagtgtct      2580
gggcctttta agtcccacat tgcttgcctc ccacgggccc attccttcct cttgtcacgc      2640
tcagccccga tgaaccctta aaccacaggt tgagaatccc tgcttgaaga tcagaagttc      2700
caatgctgga ttacgtctcc tccaaatgtg tatcactttg cttctttgag tttgtatctt      2760
ggatgccaca ttttttcaca tccatcattc tcccttttct taaacggaag atgaatgtca      2820
gtgctacacc aaggcataat aagatggctc ccagaattac caagtgagtc ctttcatttg      2880
gaggatgtgc cagaggtagt tctgggatga ccaattcagc tgtatggttt tcctcaggat      2940
ctaattctct aaaagtgcag tagaaaatct cattagttgt tgtgttgatt ctcagtgtgc      3000
tggtcacatt gaaaagcttc tcctctctct tggaattggg ggtggtggtc ttaccactca      3060
ggacttgatg gtcactgctt gtccagatga cttcggcctt ggggtagccc tcagcctgac      3120
atgtcagttc atgttcagag gtgactggat ccacaaccaa aattccttgg ttgattttgt      3180
tgtatggggc gttcagcaaa tgccagtagg tcatgaatat aaagacagca aatatacctca      3240
tctttctgga atgccctgca ggcggacaga agcgcggctg gtgcggagcc tcgggaagct      3300
gcgcagaact ggggccgcgc gggacgcgcc agctgctcag cgttgcgcc      3349

```

<210> 3

<211> 3566

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 3

tgggtcccca	gcctcatgcc	aggctgcact	tgcacgtcgc	gggccagtct	cctcgcctgc	60
agcgtttact	atcacggctc	caaaggactt	gtacgtggtg	gagtatggca	gcaacgtcac	120
gatggagtgc	agattccctg	tagaacggga	gctggacctg	cttgcgttag	tgggtgtactg	180
ggaaaaggaa	gatgagcaag	tgattcagtt	tgtggcagga	gaggaggacc	ttaagcctca	240
gcacagcaac	ttcaggggga	gagcctcgct	gccaaaggac	cagcttttga	agggaaatgc	300
tgcccttcag	atcacagacg	tcaagctgca	ggacgcaggc	gtttactgct	gcataatcag	360
ctacggtggt	gcggactaca	agcgaatcac	gctgaaagtc	aatgccccat	accgcaaaat	420
caaccagaga	atltccgtgg	atccagccac	ttctgagcat	gaactaatat	gtcaggccga	480
gggttatcca	gaagctgagg	taatctggac	aaacagtgc	caccaacccg	tgagtgggaa	540
gagaagtgtc	accacttccc	ggacagaggg	gatgcttctc	aatgtgacca	gcagtctgag	600
ggtcaacgcc	acagcgaatg	atgttttcta	ctgtacgttt	tggagatcac	agccagggca	660
aaaccacaca	gcggagctga	tcatcccaga	actgcctgca	acacatcctc	cacagaacag	720
gactcactgg	gtgcttctgg	gatccatcct	gttgcttctc	attgtagtgt	ccacggtcct	780
cctcttcttg	agaaaacaag	tgagaatgct	agatgtggag	aaatgtggcg	ttgaagatac	840
aagctcaaaa	aaccgaaatg	atacacaatt	cgaggagacg	taagcagtgt	tgaaccctct	900
gatcgtcgat	tggcagcttg	tggctctgtga	aagaaagggc	ccatgggaca	tgagtccaaa	960
gactcaagat	ggaacctgag	ggagagaacc	aagaaagtgt	tgggagagga	gcctggaaca	1020
acggacatth	tttccaggga	gacactgcta	agcaagttgc	ccatcagtcg	tcttgggaaa	1080
tggattgagg	gttcctggct	tagcagctgg	tccttgacaca	gtgacctttt	cctctgctca	1140
gtgccgggat	gagagatgga	gtcatgagtg	ttgaagaata	agtgccttct	atttattttg	1200
agtctgtgtg	ttctcactth	gggcatgtaa	ttatgactgg	tgaattctga	cgacatgata	1260
gatcttaaga	tgtagtcacc	aaactcaact	gctgcttagc	atcctccgta	actactgata	1320
caagcaggga	acacagaggt	cacctgcttg	gtttgacagg	ctcttgctgt	ctgactcaaa	1380
taatctttat	ttttcagtcc	tcaaggctct	tcgatagcag	ttgtttctgta	tcagccttat	1440
aggtgtcagg	tatagcactc	aacatctcat	ctcattacaa	tagcaaccct	catcaccata	1500
gcaacagcta	acctctgtta	tcctcacttc	atagccagga	agctgagcga	ctaagtcact	1560

tgcccacaga gtatcagctc tcagatttct gttcttcagc cactgtcctt tcaggataga	1620
at ttgtcggt aagaaattaa tttaaaaact gattattgag tagcattgta tatcaatcac	1680
aacatgcctt gtgcactgtg ctggcctctg agcataaaga tgtacgccgg agtaccggtc	1740
ggacatgttt atgtgtgtta aatactcaga gaaatgttca ttaacaagga gcttgcattt	1800
tagagacact ggaaagtaac tccagttcat tgtctagcat tacatttacc tcatttgcta	1860
tccttgccat acagtctctt gttctccatg aagtgtcatg aatcttggtt aatagttctt	1920
ttat ttttta aatgtttcta tttaaatgat attgacatct gaggcgatag ctgagttggt	1980
aaaacccttt cctcacaagt gtgaaaccct gagtcttata cctagaaccc acataaaaaa	2040
cagttgcgta tgtttgtgca tgcttttgat cccagcacta gggaggcaga ggcaggcaga	2100
tcctgagctc tcattgacca cccagcctag cctacatggt tagctccagg cctacaggag	2160
ctggcagagc ctgaaaaacg atgcctagac acacacacac acacacacac acacacacac	2220
acacacacac accatgtact catagaccta agtgcaccct cctacacatg cacacacata	2280
caattcaaac acaaataaac agggaattgt ctgagaatgg tccccaagac aaagaagaag	2340
aaaaacacca aaccagctct attccctcag cctatcctct ctactccttc ctagaagcaa	2400
ctactattgt ttttgtatat aaatttacct aacgacagtt aatatgtaga atatatatta	2460
aagtgtctgt caatatatat tatctctttc tttctttctt cttttctttc tttctttctt	2520
tctttctttc tttctttctt tctttctttc ttccttcctt ctttccttcc ttccttcctt	2580
ccttcctttc tttctttctt tctttttttc tgtctatctg tacctaaatg gttgctcact	2640
atgcattttc tgtgctcttc gcccttttta tttaatgtat ggatatttat gctgcttcca	2700
gaatggatct aaagctcttt gtttctaggt tttctcccc atccttctag gcatctctca	2760
cactgtctag gccagacacc atgtctgctg cctgaatctg tagacaccat ttataaagca	2820
cgtactcacc gagtttgtat ttggcttggt ctgtgtctga ttaaagggag accatgagtc	2880
cccagggtag actgagttac ccagtagca agggggagcc ttgtttgtgt ctccatggca	2940
gaagcaggcc tggagccatt ttggtttctt ccttgacttc totcaaacac agacgcctca	3000
cttgctcatt acaggttctc ctttggaat gtcagcattg ctcttgact gctggctgcc	3060
ctggaaggag ccattagct ctgtgtgagc ccttgacagc tactgcctct ccttaccaca	3120

ggggcctcta agatactggt acctagaggt cttgaggatc tgtgttctct ggggggagga 3180
 aaggaggagg aaccagaaac tttcttacag ttttccttgt tctgtcacat gtcaagactg 3240
 aaggaacagg ctgggctacg tagtgagatc ctgtctcaaa ggaaagacga gcatagccga 3300
 acccccgggtg gaaccccctc tgttacctgt tcacacaagc ttattgatga gtctcatggt 3360
 aatgtcttgt ttgtatgaag ttttaagaaaa tatcgggttg ggcaacacat tctatttatt 3420
 cattttattt gaaatcttaa tgccatctca tgggtgttga ttggtgtggc actttattct 3480
 tttgtgttgt gtataacat aaattttatt ttgcatcaga ttgtcaatgt attgcattaa 3540
 ttttaataaat attttttatt attaaa 3566

<210> 4
 <211> 3566
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 4
 ttttaataaat aaaaatattt attaaattaa tgcaatacat tgacaatctg atgcaaaata 60
 aaatttatgg ttatacacia cacaaaagaa taaagtgcc aaccaatcca acaccatgag 120
 atggcattaa gatttcaaat aaaatgaata aatagaatgt gttgcccaac ccgatatttt 180
 cttaaacttc atacaaacia gacattaaca tgagactcat caataagctt gtgtgaacag 240
 gtaacagagg ggggtccacc ggggggtcgg ctatgctcgt ctttcctttg agacaggatc 300
 tcactacgta gccagcctg ttccttcagt cttgacatgt gacagaacia ggaaaactgt 360
 aagaaagtgc tgggttcctc ctcttttct ccccccagag aacacagatc ctcaagacct 420
 ctaggtaaca gtatcttaga ggcccctgtg gtaaggagag gcagtagctg tcaagggctc 480
 acacagagct aatgggctcc ttccagggca gccagcagtc aaggagcaat gctgacattc 540
 ccaaaggaga acctgtaat agcaagttag gcgtctgtgt ttgagagaag tcaaggaaga 600
 aacaaaaatg gctccaggcc tgcttctgcc atggagacac aaacaaggct ccccttggt 660
 actggggtaa ctcagtgtac cctggggact catgggtctc ctttaatcag acacagaaca 720
 agccaaatac aaactcgggt agtacgtgct ttataaatgg tgtctacaga ttcaggcagc 780
 agacatgggt tctggcctag acagtgtgag agatgcctag aaggatgggg gagaaaacct 840

agaaacaaag agctttagat ccattctgga agcagcataa atatccatac attaaataaa	900
aagggcgaag agcacagaaa atgcatagtg agcaaccatt taggtacaga tagacagaaa	960
aaaagaaaga aagaaagaaa ggaaggaagg aaggaaggaa ggaaggaagg aaggaagaaa	1020
gaaagaaaga aagaaagaaa gaaagaaaga aagaaagaaa gaaaggaaga aagaaagaaa	1080
gagataatat atattgacag acactttaat atatattcta catattaact gtcgttgggt	1140
aaatttatat acaaaaacaa tagtagttgc ttctaggaag gagtagagag gataggctga	1200
gggaatagag ctggtttggt gtttttcttc ttctttgtct tggggaccat tctgagacaa	1260
ttccctgttg atttgtgttt gaattgtatg tgtgtgcatg tgtaggaggg tgcacttagg	1320
tctatgagta catggtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtct	1380
aggcatcggt tttcaggctc tgccagctcc tgtaggcctg gagctaacca tgtaggctag	1440
gctgggtggg caatgagagc tcaggatctg cctgcctctg cctccctagt gctgggatca	1500
aaagcatgca caaacatacg caactgtttt ttatgtgggt tctagggata agactcaggg	1560
tttcacactt gtgaggaaag ggttttacca actgagctat cgcctcagat gtcaatatca	1620
tttaaataga aacattttaa aaataaaaga actattcaac aagattcatg acacttcatg	1680
gagaacaaga gactgtatgg caaggatagc aaatgaggta aatgtaatgc tagacaatga	1740
actggagtta ctttccagtg tctctaaaat gcaagctcct tgttaatgaa catttctctg	1800
agtatttaac acacataaac atgtccgacc ggtactccgg cgtacatctt tatgctcaga	1860
ggccagcaca gtgcacaagg catgttgatg ttgatataca atgctactca ataatcagtt	1920
tttaaattaa tttcttaacg acaaattcta tcctgaaagg acagtggctg aagaacagaa	1980
atctgagagc tgatactctg tgggcaagtg acttagtcgc tcagcttcct ggctatgaag	2040
tgaggataac agaggttagc tgttgctatg gtgatgaggg ttgctattgt aatgagatga	2100
gatgttgagt gctatacctg acacctataa ggctgataca gaacaactgc tatcgaagag	2160
ccttgaggac tgaaaaataa agattatttg agtcagacag caagagcctg tcaaaccaag	2220
caggtgacct ctgtgttccc tgcttgatc agtagttacg gaggatgcta agcagcagtt	2280
gagtttggtg actacatctt aagatctatc atgtcgtcag aattcaccag tcataattac	2340
atgccc aaag tgagaacaca cagactcaaa ataaatagaa ggcacttatt cttcaacact	2400

catgactcca tctctcatcc cggcactgag cagaggaaaa ggtcactgtg caaggaccag	2460
ctgctaagcc aggaaccctc aatccatttc ccaagacgac tgatgggcaa cttgcttagc	2520
agtgtctccc tggaaaaaat gtccgttggt ccaggctcct ctcccaacac tttcttggtt	2580
ctctccctca ggttccatct tgagtctttg gactcatgtc ccatgggccc tttctttcac	2640
agaccacaag ctgccaatcg acgatcagag ggttcaacac tgcttacgtc tcctcgaatt	2700
gtgtatcatt tcgggtttttt gagcttgat cttcaacgcc acatttctcc acatctagca	2760
ttctcacttg ttttctcaag aagaggagga ccgtggacac tacaatgagg aacaacagga	2820
tggatcccag aagcaccag tgagtcctgt tctgtggagg atgtgttgca ggcagttctg	2880
ggatgatcag ctccgctgtg tggttttgcc ctggctgtga tctccaaaac gtacagtaga	2940
aaacatcatt cgctgtggcg ttgaccctca gactgctggt cacattgaga agcatcccct	3000
ctgtccggga agtggtgaca cttctcttcc cactcacggg ttggtggtca ctgtttgtcc	3060
agattacctc agcttctgga taaccctcgg cctgacatat tagttcatgc tcagaagtgg	3120
ctggatccac ggaaattctc tggttgattt tgcggtatgg ggcattgact ttcagcgtga	3180
ttcgcttgta gtccgcacca ccgtagctga ttatgcagca gtaaacgcct gcgtcctgca	3240
gcttgacgtc tgtgatctga agggcagcat ttcccttcaa aagctgggtcc tttggcagcg	3300
aggctctccc cctgaagttg ctgtgctgag gcttaaggtc ctctctcct gccacaaact	3360
gaatcacttg ctcatcttcc ttttcccagt acaccactaa cgcaagcagg tccagctccc	3420
gttctacagg gaatctgcac tccatcgtga cgttgctgcc atactccacc acgtacaagt	3480
cctttggagc cgtgatagta aacgctgcag gcgaggagac tggcccgcga cgtgcaagtg	3540
cagcctggca tgaggcttgg ggacca	3566

<210> 5

<211> 3706

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 5

tctttgctac ggataagacc aggaaatcgc cctccccagc ctccagccag gctgcagcta	60
cgcgacttgc cagtctcctc gcctacaggt aagtctcaaa ccatgaggat atttgctgtc	120
cttatagtca cagcctgcag tcacgtgcta gcggcattta ccatcacagc tccaaaggac	180

ctgtacgtgg tggagtatgg cagcaatgtc acgatggaat gcagattccc agtagaacag	240
aaattggacc tgcttgcctt agtgggtgtac tgggaaaagg aagacaagga agttattcag	300
tttgtggagg gagaggagga cctgaagcct caacacagca gcttcagggg gagagccttc	360
ttgccaaagg accagctttt gaaggggaac gcggtgcttc agatcacaga tgtcaagctg	420
caggacgcag gtgtctactg ctgcatgata agctatgggtg gagcggacta caagcgaatc	480
acattgaaag tcaacgctcc ataccgcaa atcaaccaa gaatttccat ggatccagcc	540
acttctgagc atgaactaat gtgccaggct gagggttacc cagaagccga agtgatctgg	600
acaaacagtg accaccagtc cctgagtggg gaaacaactg tcaccacttc ccagactgag	660
gagaagcttc tcaacgtgac cagcgttctg agggtaacg caacagctaa tgatgttttc	720
cactgtacgt tctggagagt aactcaggg gagaaccaca cggctgaact gatcatccca	780
gaactgcctg taccacgtct cccacataac aggacacact gggactcct gggatccgtc	840
cttttgttcc tcatcgtggg gttcacgctc ttcttctgct tgagaaaaca agtgagaatg	900
ctagatgtgg aaaaatgcgg cttcgaagat agaaattcaa agaaccgaaa tgatacacag	960
ttcgaggaga cgtaagcagt gttgaaccct ctgagcctcg aggcgggatt ggcagcttgt	1020
ggtctgtgaa agaaagggcc cgtgggacat ggggccaggg actcaaaaat ggaaccggag	1080
aggagaagag aacaaagaaa gtgttggaag aggagcctgg gacgaaagac atttctacag	1140
gagacactgc taagcaagtt acccatcagt catctcgggc aataagttga gggttcctca	1200
ttttaacagc tggtcctcgc acaagtgacc ttctctctta ccagtgctt ggatgagagg	1260
cagagtcaca agtgttgaag tgtgagtgcc ttctatttac ttccagtcg tgtgttcttg	1320
ctgtgggcat gtggttatga ctagtgcata aataggcgtt aaaatgcagt caccaaactc	1380
aactgctgct tagcatcctc tgtaactact ggcacaagca ggaaacgtgg aggtcacatg	1440
gttcgtttga cgggctcttg ctgtccgact tgagtaatct tcattctcag gcctcaaggt	1500
tctgcagtag tagttgttct ctttaaatat ctgctttaca agtgttgggt actatactca	1560
aacatcttat ttcatcacca tggcaaccct catactaacc tctgtcatac tcccttcata	1620
gccaaagacgc tgagtgtctg agtaacttga ccacaaaatg acagctatca gatttctatt	1680
tttcagacac tgtcctttca ggatagaatt tgtagctaag aatttaataa taacaaaaaa	1740

accccgcctta ttaggcactt ccacaccaca ccatgccttg tgcaactgctc tggcctctga	1800
cagagaagga agccagagtg ccggtcggat ttgcttatgt gtgttcaata ctcaaataca	1860
tgctcattaa catggagtct gcattttaaa gacactctcc agttctttgt ctagcattat	1920
atttacctct aatctgttat ccctgccaaa caatctcatg ttctccatga agtgtctagt	1980
cttgttgagt agttcttttt tttttttttc tatttaaata atattgacat ctgaggagac	2040
agctcagttg gtagaattct ttccttacia gtgggaaacc ctgttttatc cccagaaccc	2100
acataaaaaa cagttgcgta tatctgtgca tgcttaatcc aagcactagg gaggcagaga	2160
caggcagatc tctagctctc accgatcagc cagctccagg tctacaagag ctgacagtgc	2220
ctgagaaaca tgtctacaca cacacacata cacactctca catacatgga ccatgtactc	2280
atacacctaa gtggactctc ttagtgaaca cacatacaat ggtccccaag acaaaacaaa	2340
acaaaaaaaa aataaaccaa actagctcta ttccatcagc ctagccatgc tactcccttc	2400
ccagaagcaa ctgctattgt ttttgacat atattttctt aaagacagtt aatatgtata	2460
aatctttgtt aaagtatgtc tgtctgtctg cctgcctgcc tacctatcta cctatctatc	2520
tatccatcca tccatccatc catccacca tctgtccatc cgtctgtctg tccatctgtc	2580
tgtctatcta cctatctacc tacctacata cctatcatct gtctgtctgt ctttcctaaa	2640
tggtatagga aaactgtacg ttttctatgc actttgccct tttcatttag tgtattgata	2700
cttatgctgc ttccagactg atctaaagat ccataaagag aactgcctca tttctaggtt	2760
ttctttccca tccctctagg cacctctcac actgtctagg ccagacactt gctgcctgta	2820
tctgtagaca tcatttataa agtgtgtact caccgagttt gtgtctactc aaagggaggc	2880
catgggtccc cagggtcact gagtcaaccc agtaccaagg tggagccttg tatctccatg	2940
gcagaagcaa atctggggcc atttctgttt ctcccttgac ttcttttcta aaacacagat	3000
gctctaatta cttattacag gttgtccctg gtaatgtcag cattgctcct agacttctgg	3060
gtgccctgga aaagcccgtt agctctgtgt gaacccttaa ggcagctgtc tctccttacc	3120
tcatagacac tgtttcctgg agggtttgag atactgtttc caaaagggtgt tcacttgggc	3180
gaggagggga gggggagccc agaactttgt tactattttc tttgttttgt cacatgtcaa	3240
ggctgaagaa agagcctggg tatgttgggc catgtctcca gttgcaggca gaggcaggtg	3300

gatctctgtg agtttgtggc cagcctgggc tccatagtga attctaagcc agccagggct 3360
cggttacata gtgagatccc gtctcaaagg aaagactggc ctatcagaac ccccagtga 3420
accccttctg ttacttggtc acacatgttt gttgatgatt ctctgtgtaa tgtcttggtt 3480
gtatgacgtt caagaaaaga tctggttggg caacacattg tatttattca tcttattcaa 3540
aatcttaatg ccatctcatg gcattggatt ggtatggcac tttattcttt tgtgttctgt 3600
ataaccacaa atggaaatth tttttgtgt ctgattgtca ttgtattgca ttaatttaat 3660
aagatattat ttattaaaaa catttgattt ttttcttttt taaaaa 3706

<210> 6

<211> 3706

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

tttttaaaaa agaaaaaaat caaatgtttt taataaataa tatcttatta aattaatgca 60
atacaatgac aatcagacac aaaataaaat ttccatttgt ggttatacag aacacaaaag 120
aataaagtgc cataccaatc caatgccatg agatggcatt aagattttga ataagatgaa 180
taaatacaat gtgttgccca accagatctt ttcttgaacg tcatacaaac aagacattaa 240
cacgagaatc atcaacaaac atgtgtgaac aagtaacaga aggggtttca ctgggggttc 300
tgataggcca gtctttcctt tgagacggga tctcactatg taaccgagcc ctggctggct 360
tagaattcac tatggagacc aggctggcca caaactcaca gagatccacc tgcctctgcc 420
tgcaactgga gacatgcgcc aacataccca ggctctttct tcagccttga catgtgacaa 480
aacaagaaa atagtaacaa agttctgggc tccccctccc ctctcgccc aagtgaacac 540
cttttggaag cagtatctca aaccctccag gaaacagtgt ctatgaggta aggagagaca 600
gctgccttaa gggttcacac agagctaacg ggcttttcca gggcaccag aagtctagga 660
gcaatgctga cattaccagg gacaacctgt aataagtaat tagagcatct gtgttttaga 720
aaagaagtca aggaagaaac agaaatggcc ccagatttgc ttctgccatg gagatacaag 780
gctccacctt ggtactgggt tgactcagtg accctgggga cccatggcct ccctttgagt 840
agacacaaac tcggtgagta cacactttat aaatgatgtc tacagataca ggcagcaagt 900

gtctggccta gacagtgtga gaggtgccta gagggatggg aaagaaaacc tagaaatgag	960
gcagttctct ttatggatct ttagatcagt ctggaagcag cataagtatc aatacactaa	1020
atgaaaaggg caaagtgcag agaaaacgta cagttttcct ataccattta ggaaagacag	1080
acagacagat gataggtatg taggtaggta gataggtaga tagacagaca gatggacaga	1140
cagacggatg gacagatggg tggatggatg gatggatgga tggatagata gataggtaga	1200
taggtaggca ggcaggcaga cagacagaca tactttaaca aagatttata catattaact	1260
gtctttaaga aaatatatgt gcaaaaacaa tagcagttgc ttctgggaag ggagtagcat	1320
ggctaggctg atggaataga gctagtttg gttatTTTT ttttgTTTT ttttgtcttg	1380
gggaccattg tatgtgtgtt cactaagaga gtccacttag gtgtatgagt acatggtcca	1440
tgtatgtgag agtgtgtatg tgtgtgtgtg tagacatggt tctcaggcac tgtcagctct	1500
tgtagacctg gagctggctg atcggtgaga gctagagatc tgctgtctc tgctcccta	1560
gtgcttgat taagcatgca cagatatag caactgtttt ttatgtgggt tctggggata	1620
aaacagggtt tcccacttgt aaggaaagaa ttctaccaac tgagctgtct cctcagatgt	1680
caatatcatt taaatagaaa aaaaaaaaaa agaactactc aacaagacta gacacttcat	1740
ggagaacatg agattgtttg gcagggataa cagattagag gtaaataata tgctagacaa	1800
agaactggag agtgtcttta aaatgcagac tccatgttaa tgagcattga tttgagtatt	1860
gaacacacat aagcaaatcc gaccggcact ctggcttcct tctctgtcag aggccagagc	1920
agtgcacaag gcatggtgtg gtgtggaagt gcctaataag cggggTTTT tttttattat	1980
taaattctta gctacaaatt ctatcctgaa aggacagtgt ctgaaaaata gaaatctgat	2040
agctgtcatt ttgtggtcaa gttactcaga cactcagcgt cttggctatg aagggagtat	2100
gacagagggt agtatgaggg ttgccatggt gatgaaataa gatgtttgag tatagtaccc	2160
aacacttgta aagcagatat ttaaagagaa caactactac tgcagaacct tgaggcctga	2220
gaatgaagat tactcaagtc ggacagcaag agcccgtaa acgaacctg tgacctccac	2280
gtttcctgct tgtgccagta gttacagagg atgctaagca gcagttgagt ttggtgactg	2340
cattttaacg cctattatgt cactagtcac aaccacatgc ccacagcaag aacacacgga	2400
ctggaagtaa atagaaggca ctcacacttc aacacttggt actctgcctc tcatccaggc	2460

actgggtaga gagaaaggct acttggtgca ggaccagctg ttaaaatgag gaaccctcaa 2520
 cttattgccc gagatgactg atgggtaact tgcttagcag tgtctcctgt agaaatgtct 2580
 ttctgtccag gctcctcttc caaacactttc tttgttctct tctcctctcc ggttccattt 2640
 ttgagtccct ggacccatgt cccacgggccc ctttctttca cagaccacaa gctgccaatc 2700
 ccgcctcgag gctcagaggg ttcaaacactg cttacgtctc ctggaactgt gtatcatttc 2760
 ggttctttga atttctatct tcgaagccgc atttttccac atctagcatt ctcaattggt 2820
 ttctcaagca gaagaagacg gtgaacccca cgatgaggaa caaaaggacg gatcccagga 2880
 gtaccagtg tgtcctgtta tgtgggagac gtggtacagg cagttctggg atgatcagtt 2940
 cagccgtgtg gttctcccct gagtgtactc tccagaacgt acagtggaaa acatcattag 3000
 ctgttgcggt gaccctcaga acgctgggtc cggtgagaag cttctcctca gtctgggaag 3060
 tggtgacagt tgtttcccca ctgaggact ggtggtcact gttgtccag atcacttcgg 3120
 cttctgggta accctcagcc tggcacatta gttcatgctc agaagtggct ggatccatgg 3180
 aaattctttg gttgattttg cggtatggag cggtgacttt caatgtgatt cgctttagt 3240
 ccgtccacc atagctgac atgcagcagt agacacctgc gtcctgcagc ttgacatctg 3300
 tgatctgaag caccgcgttc ccttcaaaa gctggtcctt tggcaagaag gctctcccc 3360
 tgaagctgct gtgttgaggc ttcaggctct cctctccctc cacaaactga ataacttcct 3420
 tgtcttcctt tcccagtag accactaagg caagcaggct caatttctgt tctactggga 3480
 atctgcattc catcgtgaca ttgctgccat actccaccac gtacagggtcc tttggagctg 3540
 tgatggtaaa tgccgctagc acgtgactgc aggctgtgac tataaggaca gcaaataatcc 3600
 tcatggtttg agacttacct gtaggcgagg agactggcaa gtcgcgtagc tgcagcctgg 3660
 ctggaggctg gggagggcga tttcctggct ttatccgtag caaaga 3706

<210> 7

<211> 3909

<212> ADN

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 7

aaatcaaggc gcgttcagat gttggcttgt tgtaaatttc tgtttatatt aataacatac 60

caaagtggga tttgttttaa tcttcggaac tctttccggt gaaaacctca tttacaagaa 120

aactggactg acaggtttca ctttctgttt catttctata catagcttta ttcttaggac	180
accaacacca ctcgctaccc aaactgaaag cttccccgat tccgccgaag gtcaggaaaag	240
tccaatgccg ggcaaactgg atttgctgcc ttgctgagag gtgggcggga ccccgctcc	300
gggcccggcg ccaagttgag cagctggcac gcctcgcaa gcccagtc tgaagcccca	360
gtcctgctgt gcttcccag gctccgcacc agccgcgtt ctctctgcct gcagcacatt	420
ccagaaagat gaggatattt gctgtcttta tattcacgat ctactggcat ttgctgaatg	480
catttactgt cacggttccc aaggacctat atgtggtaga gtatggcagc aatatgacaa	540
ttgaatgcaa attcccagta gaaaaacaat tagacctgac ttcactaatt gtctattggg	600
aatggagga taagaacatt attcaatttg tgcattgaga ggaagacctg aaggttcagc	660
atagtaacta cagacagagg gccagctgt tgaaggacca gctctccctg ggaaatgctg	720
catttcggat cacagatgtg aaattgcagg atgcaggggt ttaccgctgc atgatcagct	780
atggtggtgc cgactacaag cggattaccg tgaaagtcaa tgctccatac aacaaaatca	840
accaagaat tttggttgc gatccagtca cctctgaaca tgaactaaca tgtcaggctg	900
agggtaccc caaggccga gtcatttgga caagcagtga ccatcaagtc ctgagtggta	960
agaccaccac caccaattcc aagagagagg agaagctttt aaatgtgacc agcactga	1020
gaatcaacac aacagctaatt gagattttct actgcatttt taggagatta gatcctgagg	1080
aaaaccatac agctgaattg gtcattccag aactacctct ggcgcttct ccaaataaaa	1140
ggactcactt ggtaattctg ggagccatct ttttactcct tgggtgtagca ctgacattca	1200
tcttctatct aagaaaaggg agaattgatg atatgaaaa atgtggcatt cgagttacaa	1260
actcaaagaa gcaacgtgat acacaattgg aggagacgta atccagcatt ggaacttctg	1320
atcttcaagc agggattctc agcctgtggt ttgggggttc gtcagggctg agcatgacca	1380
gaggaatgaa tgggcccgtg ggatgcatgc agtatgggac ttaaaaggcc caagcactga	1440
aatggaacc tggcgaaagc agaggaggag aatgaagaaa aatggagttg aacagggagc	1500
gtggagggag accttgatac tttcaaattgc ctgaggggct catcggtgca tgtgacaggg	1560
agaaaggata cttctgaaca aggagcctcc aagcaaatca tccactgctc atcttaggaa	1620
aacgggttga gaatccctaa tttgagggtc agttcctgca gaagtgccct ttgcctccac	1680

tcaatgcctc aatttgtttt ctgcgtgact gaggggtccca gtggttgaac agtattttatg	1740
tatgagatatt tcctatttat tttgagtctg tgaggtcttc ttgtcatggg agtgtggttg	1800
tgaatgattt cttttgaaga tatattgtag tagatgttac aattttgtcg ccaaactaaa	1860
cttgatgctt aatgacttgc tcacatctag taaaacatgg agtatttgta aggtgcttgg	1920
tctcctctat aactacaagt acacattgga agcataaaga tcaaaccgtt gatttggtata	1980
ggatgtcacc tttattttaac ccattaatac tctgattgac ttaatcttat tctcagacct	2040
caagtgtctg tgcagtatct gttccattta aatatcagct ttataattat gtggtaccat	2100
acacacataa tctcctttca tcgctgtaac caccctgttg tgatgaccac tattatttta	2160
cccattgtac agctgaggaa gcaaacagat taagtaactt gccaaaacca gtaaatagca	2220
gagctcagac tgccaccac tgtcctttta taatacaatt tacagctata ttttacttta	2280
agcaattcat ttattcaaaa cccatttatt aagtgccctt gcaatatcaa tcaactgtacc	2340
aggcattgaa tctacagatg tgagcaagag aaagtacctg tcctcaagga gcttgaggta	2400
taataaggag attaataaga aaatatatta ttacaatcta gtccagtgtc atagcataag	2460
gatgatgtga ggagaaaagc tgagcagtgt tgccaagagg aggaaatagg ccaatgtggt	2520
ctgggacagt tgaatgtatt taaacatctt aataatcaaa gtaattttca tttacaaaga	2580
gaagtcagta cttaaaataa ccctgaaaaa taacactgga attccttttc tagcattata	2640
tttatccctg atttgccctt gccatacaat ctaatgcttg tttatatagt gtctgatatt	2700
gtttaacagt tctgtctttt ctattcaaat gctattaaat tttaaattca tacctttcca	2760
tgattcaaaa ttcaaaagat cccatgggag atggtttgaa aatctccact tcctcctcca	2820
agccattcaa gtttcctttc cagaagcaac tgctactgcc ttttattcat atgttcttct	2880
aaagatagtc tacatttgga aatgtatgtt aaaagcatat atttttaaat ttttttcct	2940
aaatagtaac acattatatg tctgctgtgc actttgctat ttttatttat tgtagtgttt	3000
cttatgtage agatggaatg aatttgaagc tccaagggt caggacacat gccttctttg	3060
tttctaagtt atctttccca tagcttttca taatctttca tatgatttag tacatgttaa	3120
atatgtgcta catatacatt tagacaacca gcatttggtta agtatttgct ctaggactga	3180
gtttggattt atgtttgctc aaaaggagac ccatgggctc tccagggtgc actgagtcaa	3240

tctagtccta aaaagcaatc ttattattaa ctctgtatga cagaatcata tctggaactt	3300
ttgttttctg ctttctgtca agtataaact tcactttgat gctgtacttg caaaatcaca	3360
ttttctttct ggaaattcca gtagtgtacc ttgactgcta gttaccctgt gccagaaaag	3420
cctcattcgt tgtgcttgaa ccctttaatg ccaccagctg tcatcactac acaggcctcc	3480
taagaggctt cctggagggt ttgagattca gatgccctga gagatcccag agtttccttt	3540
ccctcttggc cacattctgg tgtcagtgac aaggaatacc ttcgctttgc caccgtcaa	3600
ggttgaagaa acagcgtctc caacagagct ccttgtgtta tctgtttgta catgtgcatt	3660
tgtacagtaa tttgtgtgac agtggtcttt gtgtgaatta caggcaagaa ctgtggctga	3720
gcaaggcaca tagtctactc agtctattcc taactcctcc ttttgggtgtt ggatttgtaa	3780
ggcactttat cccttttgtc tcatgtttca tcgtaaattgg cataggcaga gatgatctct	3840
aattctgcat ttgattgtca ctttttgtac ctgcattaat ttaataaaat atccttattt	3900
attttgtta	3909

<210> 8
 <211> 3909
 <212> ADN
 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 8	
taacaaaata aataaggata ttttattaaa ttaatgcagg tacaaaaagt gacaatcaaa	60
tgcagaatta gatatcatct ctgcctatgc catttacgat gaaacatgag aaaaaggga	120
taaagtgcct tacaaatcca acacaaaag gaggagttag gaatagactg agtagactat	180
gtgccttgct cagccacagt tcttgctgt aattcacaca aagaacactg tcacacaaat	240
tactgtacaa atgcacatgt acaaacagat aacacaagga gctctgttgg agacgtgtt	300
tcttcaacct tgacgggtgg caaagcgaag gtattccttg tcaactgacac cagaatgtgg	360
ccaagaggga aaggaaactc tgggatctct cagggcattc gaatctcaaa acctccagga	420
agcctcttag gaggcctgtg tagtgatgac agctggtggc attaaagggt tcaagcacia	480
cgaatgaggc ttttctggca cagggttaact agcagtcaag gtacactact ggaatttcca	540
gaaagaaaat gtgattttgc aagtacagca tcaaagtga gtttatactt gacagaaagc	600

agaaaacaaa agttccagat atgattctgt catacagagt taataataag attgcttttt	660
aggactagat tgactcagtg caccctggag agcccatggg tctccttttg agcaaacata	720
aatccaaact cagtcctaga gcaaatactt aacaaatgct gggtgtctaa atgtatatgt	780
agcacatatt taacatgtac taaatcatat gaaagattat gaaaagctat gggaaagata	840
acttagaaac aaagaaggca tgtgtcctga cccttgggag cttcaaattc attccatctg	900
ctacataaga aacactacaa taaataaaaa tagcaaagtg cacagcagac atataatgtg	960
ttactatttta gggaaaaaaa tttaaaaata tatgctttta acatacattt ccaaattgtag	1020
actatcttta gaagaacata tgaataaaaag gcagtagcag ttgcttctgg aaaggaaact	1080
tgaatggctt ggaggatgaa gtggagattt tcaaaccatc tcccatggga tcttttgaat	1140
tttgaatcat ggaaaggat gaatttaaaa tttaatagca tttgaataga aaagacagaa	1200
ctgttaaaca atatcagaca ctatataaac aagcattaga ttgtatggca aaggcaaact	1260
agggataaat ataatgctag aaaaggaatt ccagtgttat ttttcagggt tattttaagt	1320
actgacttct ctttgtaaact gaaaattact ttgattatta agatgtttta atacattcaa	1380
ctgtcccaga ccacattggc ctatttcctc ctcttggcaa cactgctcag cttttctcct	1440
cacatcatcc ttatgctatg aactggact agattgtaat aatatatttt cttattaatc	1500
tccttattat actccaagct ccttgaggac aggtactttc tcttgctcac atctgtagat	1560
tcaatgcctg gtacagtgat tgatattgca agggcactta ataaatgggt tttgaataaa	1620
tgaattgctt aaagtaaaat atagctgtaa attgtattat aaaaggacag tgggtggcag	1680
tctgagctct gctattttact ggttttggca agttacttaa tctgtttgct tcctcagctg	1740
tacaatgggt aaaataatag tggtcatcac aacaggggtg ttacagcgat gaaaggagat	1800
tatgtgtgta tgggtaccaca taattataaa gctgatattt aaatggaaca gatactgcac	1860
agacacttga ggtctgagaa taagattaag tcaatcagag tattaatggg ttaaataaag	1920
gtgacatcct atacaaatca acggtttgat ctttatgctt ccaatgtgta cttgtagtta	1980
tagaggagac caagcacctt acaaatactc catgttttac tagatgtgag caagtcatta	2040
agcatcaagt ttagtttggc gacaaaattg taacatctac tacaatatat cttcaaaaga	2100
aatcattcac aaccacactc ccatgacaag aagacctcac agactcaaaa taaataggaa	2160

aatctcatac ataaatactg ttccaacact gggaccctca gtcacgcaga aaacaaattg	2220
aggcattgag tggaggcaaa gggcacttct gcaggaactg accctcaa at tagggattct	2280
caacccgttt tctaagatg agcagtggat gatttgcttg gaggctcctt gttcagaagt	2340
atcctttctc cctgtcacat gcaccgatga gccctcagg catttgaaag tatcaaggtc	2400
tccctccacg ctccctgttc aactccattt ttcttcattc tcctcctctg ctttcgccag	2460
gttccatttt cagtgtttgg gccttttaag tcccatactg catgcatccc acgggccccat	2520
tcattcctct ggtcatgctc agccctgacg aacccccaaa ccacaggctg agaatccctg	2580
cttgaagatc agaagttcca atgctggatt acgtctctc caattgtgta tcacgttgct	2640
tctttgagtt tgtaactcga atgccacatt ttttcatatc catcattctc ccttttctta	2700
aatagaagat gaatgtcagt gctacaccaa ggagtaaaaa gatggctccc agaattacca	2760
agtgagtcct ttcatttgga ggaagcgcca gaggtagttc tgggatgacc aattcagctg	2820
tatggttttc ctcaggatct aatctcctaa aaatgcagta gaaaatctca ttagctgttg	2880
tgttgattct cagtgtgctg gtcacattta aaagcttctc ctctctcttg gaattggtgg	2940
tggtggtctt accactcagg acttgatggc cactgcttgt ccaaatagact tcggccttgg	3000
ggtagccctc agcctgacat gttagttcat gttcagaggt gactggatcg acaacaaaa	3060
ttctttggtt gattttgttg tatggagcat tgactttcac ggtaatccgc ttgtagtcgg	3120
caccaccata gctgatcatg cagcggtaaa cccctgcac ctgcaatttc acatctgtga	3180
tccgaagtgc agcatttccc agggagagct ggtccttcaa cagctgggccc ctctgtctgt	3240
agttactatg ctgaaccttc aggtcttcct ctccatgcac aaattgaata atgttcttat	3300
cctccatttc ccaatagaca attagtgaag tcagggtctaa ttgtttttct actgggaatt	3360
tgcattcaat tgtcatattg ctgccatact ctaccacata taggtccttg ggaaccgtga	3420
cagtaaagtc attcagcaaa tgccagtaga tcgtgaatat aaagacagca aatatcctca	3480
tctttctgga atgtgctgca ggcagagaga agcgcggctg gtgcggagcc tcgggaagca	3540
gcgaggact ggggcttcag gactggggct tcgcgaggcg tgccagctgc tcaacttggc	3600
gcccggcccg gaggcggggt cccgcccacc tctgcgcaag gcagcaaata cagtttgccc	3660
ggcattggac tttctgacc ttcggcgga tccggggaagc tttcagtttg ggtagcgagt	3720

ggtgttgggtg tcttaggaat aaagctatgt atagaaatga aacagaaagt gaaacctgtc 3780
 agtccagttt tcttgtaaat gaggttttca ccggaagag ttccgaagat taaaacaaat 3840
 ccacatttgg tatgttatta atataaacag aaatttaca caagccaaca tctgaacgca 3900
 ccttgattt 3909

<210> 9

<211> 3691

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

ggcgcaacgc tgagcagctg gcgcgtcccg cgcggcccca gttctgcgca gcttcccag 60
 gctccgcacc agccgcgctt ctgtccgcct gcagggcatt ccagaaagat gaggatattt 120
 gctgtcttta tattcatgac ctactggcat ttgctgaacg catttactgt cacggttccc 180
 aaggacctat atgtggtaga gtatggtagc aatatgacaa ttgaatgcaa attcccagta 240
 gaaaaacaat tagacctggc tgcactaatt gtctattggg aaatggagga taagaacatt 300
 attcaatttg tgcattggaga ggaagacctg aaggttcagc atagtagcta cagacagagg 360
 gcccggtgtg tgaaggacca gctctccctg ggaaatgctg cacttcagat cacagatgtg 420
 aaattgcagg atgcaggggt gtaccgctgc atgatcagct atggtggtgc cgactacaag 480
 cgaattactg tgaaagtcaa tgccccatac aacaaaatca accaaagaat tttggttgtg 540
 gatccagtca cctctgaaca tgaactgaca tgtcaggctg agggctaccc caaggccgaa 600
 gtcattctgga caagcagtga ccatcaagtc ctgagtggta agaccaccac caccaattcc 660
 aagagagagg agaagctttt caatgtgacc agcacactga gaatcaacac aacaactaat 720
 gagattttct actgcacttt taggagatta gatcctgagg aaaaccatac agctgaattg 780
 gtcattcccag aactacctct ggcacatcct ccaaataaaa ggactcactt ggtaattctg 840
 ggagccatct tattatgcct tgggtgtagca ctgacattca tcttccgttt aagaaaaggg 900
 agaattgatg atgtgaaaaa atgtggcatc caagatacaa actcaaagaa gcaaagtgat 960
 acacatttgg aggagacgta atccagcatt ggaacttctg atcttcaagc agggattctc 1020
 aacctgtggt ttaggggttc atcggggctg agcgtgacaa gaggaaggaa tgggcccgtg 1080
 ggatgcaggc aatgtgggac ttaaaaggcc caagcactga aaatggaacc tggcgaaagc 1140

agaggaggag aatgaagaaa gatggagtca aacagggagc ctggagggag accttgatac	1200
tttcaaattgc ctgaggggct catcgacgcc tgtgacaggg agaaaggata cttctgaaca	1260
aggagcctcc aagcaaatca tccattgctc atcctaggaa gacgggttga gaatccctaa	1320
tttgaggggtc agttcctgca gaagtgcctt ttgcctccac tcaatgcctc aatttgtttt	1380
ctgcatgact gagagtctca gtgttggaac gggacagtat ttatgtatga gtttttccta	1440
tttatttttga gtctgtgagg tcttcttgct atgtgagtgt gggtgtgaat gatttctttt	1500
gaagatatat tgtagtagat gttacaattt tgcgccaaa ctaaacttgc tgcttaatga	1560
tttgctcaca tctagtaaaa catggagtat ttgtaagggtg cttgggtctcc tctataacta	1620
caagtataca ttggaagcat aaagatcaaa ccgttggttg cataggatgt cacctttatt	1680
taaccatta atactctggt tgacctaatc ttattctcag acctcaagtg tctgtgcagt	1740
atctgttcca tttaaataatc agctttacaa ttatgtggta gcctacacac ataatctcat	1800
ttcatcgctg taaccaccct gttgtgataa ccactattat tttaacctc gtacagctga	1860
ggaagcaaac agattaagta acttgcccaa accagtaaat agcagacctc agactgccac	1920
ccactgtcct ttataataac aatttacagc tatattttac tttaagcaat tctttttattc	1980
aaaaaccatt tattaagtgc ccttgcaata tcaatcgctg tgccaggcat tgaatctaca	2040
gatgtgagca agacaaagta cctgtcctca aggagctcat agtataatga ggagattaac	2100
aagaaaatgt attattacaa tttagtccag tgtcatagca taaggatgat gcgaggggaa	2160
aacccgagca gtgttgccaa gaggaggaaa taggccaatg tgggtctggga cggttgata	2220
tacttaaaaca tcttaataat cagagtaatt ttcatttaca aagagaggtc ggtacttaaa	2280
ataaccctga aaaataacac tggaattcct tttctagcat tatatttatt cctgatttgc	2340
ctttgccata taatctaattg cttgtttata tagtgtctgg tattgtttta cagttctgtc	2400
ttttctattt aaatgccact aaattttaaa ttcatacctt tccatgattc aaaattcaaa	2460
agatcccatg ggagatggtt ggaaaatctc cacttcatcc tccaagccat tcaagtttcc	2520
tttccagaag caactgctac tgcctttcat tcatatgttc ttctaaagat agtctacatt	2580
tggaaatgta tgttaaaagc acgtatTTTTT aaaattTTTTT tcctaaatag taacacattg	2640
tatgtctgct gtgtactttg ctatttttat ttatttttagt gtttcttata tagcagatgg	2700

```

aatgaatttg aagttcccag ggctgaggat ccatgccttc tttgtttcta agttatcttt 2760
cccatagctt ttcattatct ttcatatgat ccagtatatg ttaaatatgt cctacatata 2820
catttagaca accaccattt gttaagtatt tgctctagga cagagtttgg atttgtttat 2880
gtttgctcaa aaggagaccc atgggctctc caggggtgcac tgagtcaatc tagtcctaaa 2940
aagcaatctt attattaact ctgtatgaca gaatcatgtc tggaactttt gttttctgct 3000
ttctgtcaag tataaacttc actttgatgc tgtacttgca aaatcacatt ttctttctgg 3060
aaattccggc agtgtacctt gactgctagc taccctgtgc cagaaaagcc tcattcgttg 3120
tgcttgaacc cttgaatgcc accagctgtc atcactacac agccctccta agaggcttcc 3180
tgagaggttc gagattcaga tgccctggga gatcccagag tttcctttcc ctcttgacca 3240
tattctggtg tcaatgacaa ggagtacctt ggctttgcca catgtcaagg ctgaagaaac 3300
agtgtctcca acagagctcc ttgtgttatc tgtttgtaca tgtgcatttg tacagtaatt 3360
gggtgtgacag tgttctttgt gtgaattaca ggcaagaatt gtggctgagc aaggcacata 3420
gtctactcag tctattccta agtcctaact cctccttggtg gtgttggtt tgtaaggcac 3480
tttatccctt ttgtctcatg tttcatcgta aatggcatag gcagagatga tacctaattc 3540
tgcatttgat tgtcactttt tgtacctgca ttaatttaat aaaatattct tatttatttt 3600
gttacttggt acaccagcat gtccattttc ttgtttattt tgtgtttaat aaaatgttca 3660
gtttaacatc ccagtggaga aagttaaaaa a 3691

```

<210> 10

<211> 3691

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

ttttttaact ttctccactg ggatgttaaa ctgaacattt tattaaacac aaaataaaca 60
agaaaatgga catgctggtg taccaagtaa caaaataaat aagaatattt tattaaatta 120
atgcaggtac aaaaagtgc aatcaaatgc agaattaggt atcatctctg cctatgccat 180
ttacgatgaa acatgagaca aaagggataa agtgccttac aaatccaaca ccacaaggag 240
gagttaggac ttaggaatag actgagtaga ctatgtgcct tgctcagcca caattcttgc 300

```

ctgtaattca caciaagaac actgtcacac caattactgt acaaatgcac atgtacaaac	360
agataacaca aggagctctg ttggagacac tgtttcttca gccttgacat gtggcaaagc	420
caaggtactc cttgtcattg acaccagaat atggccaaga gggaaaggaa actctgggat	480
ctcccagggc atctgaatct cgaaacctcc aggaagcctc ttaggagggc tgtgtagtga	540
tgacagctgg tggcattcaa gggttcaagc acaacgaatg aggccttttct ggcacagggt	600
agctagcagt caaggtacac tgccggaatt tccagaaaga aaatgtgatt ttgcaagtac	660
agcatcaaag tgaagtttat acttgacaga aagcagaaaa caaaagttcc agacatgatt	720
ctgtcataca gagttaataa taagattgct ttttaggact agattgactc agtgcaccct	780
ggagagccca tgggtctcct tttgagcaaa cataaacaaa tccaaactct gtcctagagc	840
aaataactta caaatggtgg ttgtctaaat gtatatgtag gacatattta acatatactg	900
gatcatatga aagataatga aaagctatgg gaaagataac ttagaaacaa agaaggcatg	960
gatcctcagc cctgggaact tcaaattcat tccatctgct atataagaaa cactaaaata	1020
aataaaaaata gcaaagtaca cagcagacat acaatgtggt actatttagg aaaaaattt	1080
taaaaatacg tgcttttaac atacatttcc aaatgtagac tatctttaga agaacatatg	1140
aatgaaaggc agtagcagtt gcttctggaa aggaaacttg aatggcttgg aggatgaagt	1200
ggagattttc caaccatctc ccatgggatc ttttgaattt tgaatcatgg aaaggatatga	1260
atttaaaatt tagtggcatt taaatagaaa agacagaact gttaaacaat accagacact	1320
atataaacia gcattagatt atatggcaaa ggcaaatacag gaataaatat aatgctagaa	1380
aaggaattcc agtggtattt ttcagggtta ttttaagtac cgacctctct ttgtaaatga	1440
aaattactct gattattaag atgtttaagt atatccaacc gtcccagacc acattggcct	1500
atttcctcct cttggcaaca ctgctcgggt tttcccctcg catcatcctt atgctatgac	1560
actggactaa attgtaataa tacattttct tgtaaatctc ctattatac tatgagctcc	1620
ttgaggacag gtactttgtc ttgctcacat ctgtagattc aatgcctggc acagcgattg	1680
atattgcaag ggcacttaat aaatggtttt tgaataaaaag aattgcttaa agtaaaatat	1740
agctgtaaat tgtattataa aaggacagtg ggtggcagtc tgaggctctgc tatttactgg	1800
tttgggcaag ttacttaatc tgtttgcttc ctgagctgta cgatgggtaa aataatagtg	1860

gttatcacaa caggggtggtt acagcgatga aatgagatta tgtgtgtagg ctaccacata	1920
attgtaaagc tgatatttaa atggaacaga tactgcacag acacttgagg tctgagaata	1980
agattaggtc aaccagagta ttaatgggtt aaataaaggt gacatcctat gcaaccaacg	2040
gtttgatctt tatgcttcca atgtatactt gtagttatag aggagaccaa gcaccttaca	2100
aatactccat gttttactag atgtgagcaa atcattaagc agcaagttta gtttggcgac	2160
aaaattgtaa catctactac aatatatctt caaaagaaat cattcacaac cacactcaca	2220
tgacaagaag acctcacaga ctcaaaataa ataggaaaaa ctcatacata aatactgtcc	2280
cgttccaaca ctgagactct cagtcatgca gaaaacaaat tgaggcattg agtggaggca	2340
aagggcactt ctgcaggaac tgaccctcaa attagggatt ctcaaccctgt cttcctagga	2400
tgagcaatgg atgatttgct tggaggctcc ttgttcagaa gtatcctttc tccctgtcac	2460
aggcgtcgat gagccctca ggcatttgaa agtatcaagg tctccctcca ggctccctgt	2520
ttgactccat ctttcttcat tctcctcctc tgctttcgcc aggttccatt ttcagtgtt	2580
gggcctttta agtcccacat tgcttgcac ccacgggccc attccttcct cttgtcacgc	2640
tcagccccga tgaaccctta aaccacaggt tgagaatccc tgcttgaaga tcagaagttc	2700
caatgctgga ttacgtctcc tccaaatgtg tatcactttg cttctttgag tttgtatctt	2760
ggatgccaca ttttttcaca tccatcattc tcccttttct taaacggaag atgaatgtca	2820
gtgctacacc aaggcataat aagatggctc ccagaattac caagtgagtc ctttcatttg	2880
gaggatgtgc cagaggtagt tctgggatga ccaattcagc tgtatggttt tcctcaggat	2940
ctaattctct aaaagtgcag tagaaaatct cattagttgt tgtgttgatt ctcagtgtgc	3000
tggtcacatt gaaaagcttc tcctctctct tggaattggg ggtggtggtc ttaccactca	3060
ggacttgatg gtcaactgct gtccagatga cttcggcctt ggggtagccc tcagcctgac	3120
atgtcagttc atgttcagag gtgactggat ccacaaccaa aattcttttg ttgattttgt	3180
tgtatggggc attgactttc acagtaattc gcttgtagtc ggcaccacca tagctgatca	3240
tgcagcggta caccctgca tcctgcaatt tcacatctgt gatctgaagt gcagcatttc	3300
ccaggagag ctggtccttc aacagccggg cctctgtct gtagctacta tgctgaacct	3360
tcaggctctc ctctccatgc acaaattgaa taatgttctt atcctccatt tcccaataga	3420

caattagtgc agccaggtct aattgttttt ctactgggaa tttgcattca attgtcatat 3480
 tgctaccata ctctaccaca tataggtcct tgggaaccgt gacagtaa at gcgttcagca 3540
 aatgccagta ggtcatgaat ataaagacag caaatatcct catctttctg gaatgccctg 3600
 caggcgggaca gaagcgcggc tggcgcgag cctcggaag ctgctgcagaa ctggggccgc 3660
 gcgggacgcg ccagctgctc agcgttgccg c 3691

<210> 11
 <211> 753
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 ctcgagggcg caacgctgag cagctggcgc gtcccgcgcg gcccagttc tgcgcagctt 60
 cccgaggctc cgcaccagcc gcgcttctgt ccgcctgcag ggcattccag aaagatgagg 120
 atatttgctg tctttatatt catgacctac tggcatttgc tgaacgcccc atacaacaaa 180
 atcaacacaaa gaattttggt tgtggatcca gtcacctctg aacatgaact gacatgtcag 240
 gctgagggct accccaaggc cgaagtcac tggacaagca gtgaccatca agtcctgagt 300
 ggtaagacca ccaccaccaa ttccaagaga gaggagaagc ttttcaatgt gaccagcaca 360
 ctgagaatca acacaacaac taatgagatt ttctactgca cttttaggag attagatcct 420
 gaggaaaacc atacagctga attggctcatc ccagaactac ctctggcaca tcctccaaat 480
 gaaaggactc acttggtaat tctgggagcc atcttattat gccttggtgt agcactgaca 540
 ttcatcttcc gtttaagaaa agggagaatg atggatgtga aaaaatgtgg catccaagat 600
 aaaaactcaa agaagcaaag tgatacacat ttggaggaga cgtaatccag cattggaact 660
 tctgatcttc aagcagggat tctcaacctg tggtttaggg gttcatcggg gctgagcgtg 720
 acaagaggaa ggaatgggcc cgtgggcggc cgc 753

<210> 12
 <211> 1418
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 ctcgagtcca gcattggaac ttctgatctt caagcaggga ttctcaacct gtggtttagg 60

```

ggttcatcgg ggctgagcgt gacaagagga aggaatgggc ccgtgggatg caggcaatgt      120
gggacttaaa aggcccaagc actgaaaatg gaacctggcg aaagcagagg aggagaaatga      180
agaaagatgg agtcaaacag ggagcctgga gggagacctt gatactttca aatgcctgag      240
gggctcatcg acgcctgtga cagggagaaa ggatacttct gaacaaggag cctccaagca      300
aatcatccat tgctcatcct aggaagacgg gttgagaatc cctaatttga gggtcagttc      360
ctgcagaagt gccctttgcc tccactcaat gcctcaattt gttttctgca tgactgagag      420
tctcagtggt ggaacgggac agtatttatg tatgagtttt tcctatttat tttgagtctg      480
tgaggctctt ttgtcatgtg agtgtggttg tgaatgattt cttttgaaga tatattgtag      540
tagatgttac aattttgtcg ccaaactaaa cttgctgctt aatgatttgc tcacatctag      600
taaaacatgg agtatttgta aggtgcttgg tctcctctat aactacaagt atacattgga      660
agcataaaga tcaaaccggt ggttgcatag gatgtcacct ttatttaacc cattaatact      720
ctggttgacc taatcttatt ctgagacctc aagtgtctgt gcagtatctg ttccatttaa      780
atatcagctt tacaattatg tggtagccta cacacataat ctcatctcat cgctgtaacc      840
accctgttgt gataaccact attattttac ccatcgtaca gctgaggaag caaacagatt      900
aagtaacttg ccaaaccag taaatagcag acctcagact gccaccact gtccttttat      960
aatacaattt acagctatat ttacttttaa gcaattcttt tattcaaaaa ccatttatta     1020
agtgcccttg caatatcaat cgctgtgccg ggcattgaat ctacagatgt ggcaagacaa     1080
agtacctgtc ctcaaggagc tcatagtata atgaggagat taacaagaaa atgtattatt     1140
acaatttagt ccagtgtcat agcataagga tgatgagagg ggaaaacccg agcagtgttg     1200
ccaagaggag gaaataggcc aatgtggtct gggacggttg gatatactta aacatcttaa     1260
taatcagagt aattttcatt taaaagaga ggtcgggtact taaaataacc ctgaaaaata     1320
aactggaat tccttttcta gcattatatt tattcctgat ttgcctttgc catataatct     1380
aatgcttggt tatatagtgt ctggtattgt gcggccgc                                1418

```

```

<210> 13
<211> 1419
<212> ADN
<213> Homo sapiens

```

<400> 13

ctcgagctga aaaataacac tggaattcct tttctagcat tataatttatt cctgatttgc	60
ctttgccata taatctaatag cttgtttata tagtgtctgg tattgtttaa cagttctgtc	120
ttttctatatt aaatgccact aaattttaaa ttcatacctt tccatgattc aaaattcaaa	180
agatcccatg ggagatgggt ggaaaatctc cacttcatcc tccaagccat tcaagtttcc	240
tttccagaag caactgctac tgcctttcat tcatatgttc ttctaaagat agtctacatt	300
tggaatatgta tgttaaaagc acgtatTTTTT aaaattTTTTT tcctaaatag taacacattg	360
tatgtctgct gtgtactttg ctatTTTTTat ttatTTTTtagt gtttcttata tagcagatgg	420
aatgaatttg aagtccccag ggctgaggat ccatgccttc tttgtttcta agttatcttt	480
cccatagctt ttcattatct ttcatatgat ccagtatatg ttaaatatgt cctacatata	540
catttagaca accaccattt gttaagtatt tgctctagga cagagtttgg atttgtttat	600
gtttgctcaa aaggagaccc atgggctctc caggggtgcac tgagtcaatc tagtcctaaa	660
aagcaatctt attattaact ctgtatgaca gaatcatgtc tggaactttt gttttctgct	720
ttctgtcaag tataaaacttc actttgatgc tgtacttgca aaatcacatt ttctttctgg	780
aaattccggc agtgtacctt gactgctagc taccctgtgc cagaaaagcc tcattcgttg	840
tgcttgaacc cttgaatgcc accagctgtc atcactacac agccctccta agaggcttc	900
tggaggtttc gagattcaga tgccctggga gatcccagag tttcctttcc ctcttggcc	960
tattctggtg tcaatgacaa ggagtacctt ggctttgcc	1020
catgtcaagg ctgaagaaac	1080
agtgctcca acagagctcc ttgtgttatc tgtttgtaca tgtgcatttg tacagtaatt	1140
ggtgtgacag tgttctttgt gtgaattaca ggcaagaatt gtggctgagc aaggcacata	1200
gtctactcag tctattccta agtcctaact cctccttggtg gtgttggtt tgtaaggcac	1260
tttatccctt ttgtctcatg tttcatcgta aatggcatag gcagagatga tacctaattc	1320
tgcatttgat tgtcactttt tgtacctgca ttaatttaaat aaaatattct tatttatttt	1380
gttacttggt acaccagcat gtccattttc ttgtttattt tgtgtttaat aaaatgttca	1440
gtttaacatc ccagtggaga aagttaaaaa agcggccgc	1499

<210> 14

<211> 16

<212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả của trình tự chưa biết:
 Peptit RFGF"

<400> 14
 Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Chưa biết

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả của trình tự chưa biết:
 Peptit tương tự RFGF"

<400> 15
 Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10

<210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Virus suy giảm miễn dịch ở người

<400> 16
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
 1 5 10

<210> 17
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Drosophila sp.

<400> 17
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

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

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 18
 gaagcuuuuc aaugugacca a 21

 <210> 19
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 19
 uuggucacau ugaaaagcuu cuc 23

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

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 20
 gaagcuuuuc aaugugacca a 21

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

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 21
 uuggucacau ugaaaagcuu cuc 23

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

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 22
 gaagcuuuuc aaugugacca a 21

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

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 23
 uuggucacau ugaaaagcuu cuc 23

 <210> 24
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 24
 agcuuuucaa ugugaccagc a 21

 <210> 25
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 25
 ugcuggucac auugaaaagc uuc 23

 <210> 26
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 26
 agcuuuucaa ugugaccagc a 21

 <210> 27
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 27
 ugcuggucac auugaaaagc uuc 23

 <210> 28
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 28
 agcuuuucaa ugugaccagc a 21

 <210> 29
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 29
 ugcuggucac auugaaaagc uuc 23

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

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 30
 gcuuuucaau gugaccagca a 21

 <210> 31
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 31
 uugcugguca cauugaaaag cuu 23

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

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 32
 gcuuuucaau gugaccagca a 21

 <210> 33
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 33
 uugcugguca cauugaaaag cuu 23

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

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 34
 gcuuuucaau gugaccagca a 21

 <210> 35
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 35
 uugcugguca cauugaaaag cuu 23

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

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 36
 cacacugaga aucaacacaa a 21

 <210> 37
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 37
 uuuguguuga uucucagugu gcu 23

 <210> 38
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 38
 ccaaaugaaa ggacucacuu a 21

 <210> 39
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 39
 uaagugaguc cuuucuuug gag 23

 <210> 40
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 40
 uacacauuug gaggagacgu a 21

 <210> 41
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 41
 uacgucuccu ccaaaugugu auc 23

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

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 42
 uacacauuug gaggagacgu a 21

 <210> 43
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 43
 uacgucuccu ccaaaugugu auc 23

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

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 44
 uacacauuug gaggagacgu a 21

 <210> 45
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 45
 uacgucuccu ccaaaugugu auc 23

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

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 46
 acacauuugg aggagacgua a 21

 <210> 47
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 47
 uuacgucucc ucctaaugug uau 23

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

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 48
 acacauuugg aggagacgua a 21

 <210> 49
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 49
 uuacgucucc ucctaaugug uau 23

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

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 50
 acacauuugg aggagacgua a 21

 <210> 51
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 51
 uuacgucucc uccaaaugug uau 23

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

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 52
 cacauuugga ggagacguua u 21

 <210> 53
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 53
 auuacgucuc cuccaaaugu gua 23

 <210> 54
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 54
 cacauuugga ggagacguaa u 21

 <210> 55
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 55
 auuacgucuc cuccaaaugu gua 23

 <210> 56
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 56
 cacauuugga ggagacguaa u 21

 <210> 57
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 57
 auuacgucuc cuccaaaugu gua 23

 <210> 58
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 58
 gagaccuuga uacuuucaaa u 21

 <210> 59
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 59
 auuugaaagu aucaaggucu ccc 23

 <210> 60
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 60
 uaauuugagg gucaguuccu a 21

 <210> 61
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 61
 uaggaacuga ccucuaaaau agg 23

 <210> 62
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 62
 uuccuauuuu uuuugagucu a 21

 <210> 63
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 63
 uagacucaaaa auaaaauagga aaa 23

 <210> 64
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 64
 uuccuauuuu uuuugagucu a 21

 <210> 65
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 65
 uagacucaaaa auaaaauagga aaa 23

 <210> 66
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 66
 uuccuauuuu uuuugagucu a 21

 <210> 67
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 67
 uagacucaaa auaaaauagga aaa 23

 <210> 68
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 68
 uccuauuuau uuugagucug u 21

 <210> 69
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 69
 acagacucaa aaauaaauagg aaa 23

 <210> 70
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 70
 uccuauuuau uuugagucug u 21

 <210> 71
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 71
 acagacucuaa aaauaaauagg aaa 23

 <210> 72
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 72
 uugaagauau auuguaguag a 21

 <210> 73
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 73
 ucuacuacaa uauaucuuc a 23

 <210> 74
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 74
 auuguaguag auguacaa u 21

 <210> 75
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 75
 aauguuaaca ucuacuacaa uau 23

 <210> 76
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 76
 guauuuguaa ggugcuuggu a 21

 <210> 77
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 77
 uaccaagcac cuuacaaaua cuc 23

 <210> 78
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 78
 aagcauaaaag aucaaaccgu u 21

 <210> 79
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 79
 aacgguuuga ucuuuauugcu ucc 23

 <210> 80
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 80
 ccuuuaauua acccauuauu a 21

 <210> 81
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 81
 uauuaauggg uuaaaauaaag gug 23

 <210> 82
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 82
 aggaagcaaa cagauuaagu a 21

 <210> 83
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 83
 uacuuaaucu guuugcuucc uca 23

 <210> 84
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 84
 caggcauuga aucuacagau a 21

 <210> 85
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 85
 uaucuguaga uucaaugccu ggc 23

 <210> 86
 <211> 21
 <212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 86

ugauucaaaa uucaaaagau a

21

<210> 87

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 87

uauuuuuga auuuugaauc aug

23

<210> 88

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 88

ucuaaagaua gucuacauuu a

21

<210> 89

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 89

uaaauguaga cuauuuuag aag

23

<210> 90

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 90

ggaaaugauau guuaaaagca a

21

<210> 91

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 91

uugcuuuuuaa cauacauuuc caa

23

<210> 92

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 92

uguuuucugc uuucugucuaa a

21

<210> 93

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 93

uuugacagaa agcagaaaac aaa

23

<210> 94

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 94

uuucugucaaa guauaaacuu a

21

<210> 95

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 95

uaaguuuaua cuugacagaa agc

23

<210> 96

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 96

uucugucaag uauaaacuuc a

21

<210> 97

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 97

ugaaguuuau acuugacaga aag

23

<210> 98

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 98

guacuugcaa aaucacauuu u

21

<210> 99

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 99

aaaaugugau uuugcaagua cag

23

<210> 100

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 100

uucuuugugu gaauuacagg a

21

<210> 101

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 101

uccuguaauu cacacaaaga aca

23

<210> 102

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 102

ugugguguug gauuuguaag a

21

<210> 103

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 103

uccuacaaau ccaacaccac aag

23

<210> 104

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 104

ucccuuuugu cucauguuuc a

21

<210> 105

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 105

ugaaacauga gacaaaaggg aua

23

<210> 106

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 106

cugcauuuga uugucacuuu u

21

<210> 107

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 107

aaaagugaca aucaaaugca gaa

23

<210> 108

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 108

uaccugcauu aaauuaauaa a

21

<210> 109

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 109

uuuauuaaaau uaaugcaggu aca

23

<210> 110

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 110

uaccugcauu aaauuaauaa a

21

<210> 111

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 111

uuuauuaaaau uaaugcaggu aca

23

<210> 112

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 112

uaccugcauu aaauuaauaa a

21

<210> 113

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 113

uuuauuaaaau uaaugcaggu aca

23

<210> 114

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 114

accugcauua auuuauaaaa a

21

<210> 115

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 115

uuuuauaaaa uuaaugcagg uac

23

<210> 116

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 116

accugcauua auuuauaaaa a

21

<210> 117

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 117

uuuuauaaaa uuaaugcagg uac

23

<210> 118

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 118

accugcauua auuuauaaaa a

21

<210> 119

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 119

uuuuauuaaa uuaaugcagg uac

23

<210> 120

<211> 22

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (1)..(1)

<223> Nucleotit mất một bazơ được đảo đoạn

<400> 120

ngaagcuuuu caaugugacc aa

22

<210> 121

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 121

uuggucacau ugaaaagcuu cuc

23

<210> 122
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 122
 gaagcuuuuc aaugugacca a

21

<210> 123
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 123
 uuggucacau ugaaaagcuu cuc

23

<210> 124
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 124
 gaagcuuuuc aaugugacca a

21

<210> 125
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 125

uuggucacau ugaaaagcuu cuc

23

<210> 126

<211> 22

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (1)..(1)

<223> Nucleotit mất một bazơ được đảo đoạn

<400> 126

nagcuuuuca augugaccag ca

22

<210> 127

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 127

ugcuggucac auugaaaagc uuc

23

<210> 128

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 128

agcuuuucau ugugaccagc a

21

<210> 129

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

```

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 129
ugcuggucac auugaaaagc uuc
23

<210> 130
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 130
agcuuuucaa ugugaccagc a
21

<210> 131
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 131
ugcuggucac auugaaaagc uuc
23

<210> 132
<211> 22
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<220>
<221> bazơ được cải biến
<222> (1)..(1)
<223> Nucleotit mất một bazơ được đảo đoạn

<400> 132
ngcuuuucaa ugugaccagc aa
22

```

<210> 133
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 133
 uugcugguca cauugaaaag cuu

23

<210> 134
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 134
 gcuuuucaau gugaccagca a

21

<210> 135
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 135
 uugcugguca cauugaaaag cuu

23

<210> 136
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 136
 gcuuuucaau gugaccagca a

21

<210> 137
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 137
 uugcugguca cauugaaaag cuu

23

<210> 138
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 138
 cacacugaga aucaacacaa a

21

<210> 139
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 139
 uuuguguuga uucucagugu gca

23

<210> 140
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 140
 ccaaaugaaa ggacucacuu a

21

<210> 141
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 141
 uaagugaguc cuuucuuug gag

23

<210> 142
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (1)..(1)
 <223> Nucleotit mất một bazơ được đảo đoạn

<400> 142
 nuacacauuu ggaggagacg ua

22

<210> 143
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 143
 uacgucuccu ccaaaugugu auc

23

<210> 144
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 144
 uacacauuug gaggagacgu a 21

 <210> 145
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 145
 uacgucuccu ccaaagugugu auc 23

 <210> 146
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 146
 uacacauuug gaggagacgu a 21

 <210> 147
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 147
 uacgucuccu ccaaagugugu auc 23

 <210> 148
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (1)..(1)
 <223> Nucleotit mất một bazơ được đảo đoạn

<400> 148
 nacacauuug gaggagacgu aa

22

<210> 149
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 149
 uuacgucucc uccaaaugug uau

23

<210> 150
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 150
 acacauuugg aggagacgua a

21

<210> 151
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 151
 uuacgucucc uccaaaugug uau

23

<210> 152
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 152
 acacauuugg aggagacgua a

21

<210> 153
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 153
 uuacgucucc uccaaaugug uau

23

<210> 154
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (1)..(1)
 <223> Nucleotit mất một bazơ được đảo đoạn

<400> 154
 ncacauuugg aggagacgua au

22

<210> 155
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 155
 auuacgucuc cuccaaaugu gua 23

 <210> 156
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 156
 cacauuugga ggagacguua u 21

 <210> 157
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 157
 auuacgucuc cuccaaaugu gua 23

 <210> 158
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 158
 cacauuugga ggagacguua u 21

 <210> 159
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>

<221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 159
 auuacgucuc cuccaaaugu gua 23

 <210> 160
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 160
 gagaccuuga uacuuucaaa u 21

 <210> 161
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 161
 auuugaaagu aucaaggucu ccc 23

 <210> 162
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 162
 uaauuugagg gucaguuccu a 21

 <210> 163
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>

<221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 163
 uaggaacuga ccucaaauu agg 23

<210> 164
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (1)..(1)
 <223> Nucleotit mất một bazơ được đảo đoạn

 <400> 164
 nuuccuauuu auuuugaguc ua 22

<210> 165
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 165
 uagacucaaa auaaauagga aaa 23

<210> 166
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 166
 uuccuauuuu auuuugagucu a 21

<210> 167
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 167
 uagacucaaaa auaaaauagga aaa

23

<210> 168
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 168
 uuccuauuuu uuuugagucu a

21

<210> 169
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 169
 uagacucaaaa auaaaauagga aaa

23

<210> 170
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 170
 uccuauuuuau uuugagucug u

21

<210> 171
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 171
 acagacucuaa aaauaaauagg aaa

23

<210> 172
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 172
 uccuauuuau uuugagucug u

21

<210> 173
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 173
 acagacucuaa aaauaaauagg aaa

23

<210> 174
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 174
 uugaagauau auuguaguag a

21

<210> 175
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 175
 ucuacuacaa uauaucuua aaa

23

<210> 176
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 176
 auuguaguag auguuacaau u

21

<210> 177
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 177
 aauuguaaca ucuacuacaa uau

23

<210> 178
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 178
 guauuuguaa ggugcuuggu a

21

<210> 179
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 179
 uaccaagcac cuuacaaaua cuc

23

<210> 180
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 180
 aagcauaaag aucaaaccgu a

21

<210> 181
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 181
 aacgguuuga ucuuuauugcu uca

23

<210> 182
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 182
 ccuuuauuuu acccauuau a

21

<210> 183
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 183
 uauuaauggg uaaaauaaag gug 23

 <210> 184
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 184
 aggaagcaaa cagauuaagu a 21

 <210> 185
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 185
 uacuuaaucu guuugcuucc uca 23

 <210> 186
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

 <400> 186
 caggcauuga aucuacagau a 21

<210> 187
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 187
 uaucuguaga uucaaugccu ggc

23

<210> 188
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 188
 ugauucaaaa uucaaaagau a

21

<210> 189
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 189
 uaucuuuuga auuuugaauc aug

23

<210> 190
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 190
 ucuaaagaua gucuacauuu a

21

<210> 191
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 191
 uaaauaguaga cuaucuuuag aag

23

<210> 192
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 192
 ggaaauguaa guuaaaagca a

21

<210> 193
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 193
 uugcuuuuaa cauacauuuc caa

23

<210> 194
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 194
 uguuuucugc uuucugucac a

21

<210> 195
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 195
 uuugacagaa agcagaaaac aaa

23

<210> 196
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 196
 uuucugucaa guauaaacuu a

21

<210> 197
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 197
 uaaguuuaua cuugacagaa agc

23

<210> 198
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 198
 uucugucaag uauaaacuuc a

21

<210> 199
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 199
 ugaaguuuau acuugacaga aag

23

<210> 200
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 200
 guacuugcaa aaucacauuu u

21

<210> 201
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 201
 aaaaugugau uuugcaagua cag

23

<210> 202
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 202
 uucuuugugu gaauuacagg a

21

<210> 203
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 203
 uccuguaauu cacacaaaga aca

23

<210> 204
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 204
 ugugguguug gauuuguaag a

21

<210> 205
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 205
 ucuuacaaau ccaacaccac aag

23

<210> 206
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 206
 uccuuuuugu cucauguuuc a

21

<210> 207
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 207
 ugaaacauga gacaaaaggg aua

23

<210> 208
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 208
 cugcauuuga uugucacuuu u

21

<210> 209
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 209
 aaaagugaca aucaaaugca gaa

23

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

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<220>
 <221> bazơ được cải biến
 <222> (1)..(1)

<223> Nucleotit mất một bazơ được đảo đoạn

<400> 210

nuaccugcau uaauuuuaaua aa

22

<210> 211

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 211

uuuauuaaaau uaaugcaggu aca

23

<210> 212

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 212

uaccugcauu aaauuaauaa a

21

<210> 213

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 213

uuuauuaaaau uaaugcaggu aca

23

<210> 214

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 214

uaccugcauu aaauuaauaa a

21

<210> 215

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 215

uuuauuaaa uaaugcaggu aca

23

<210> 216

<211> 22

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<220>

<221> bazơ được cải biến

<222> (1)..(1)

<223> Nucleotit mất một bazơ được đảo đoạn

<400> 216

naccugcauu aaauuaauaa aa

22

<210> 217

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 217

uuuauuaaaa uaaugcagg uac

23

<210> 218

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

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 218
 accugcauua auuuauaaaa a

21

<210> 219
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 219
 uuuuauuauaaa uuaaugcagg uac

23

<210> 220
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 220
 accugcauua auuuauaaaa a

21

<210> 221
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: oligonucleotit tổng hợp"

<400> 221
 uuuuauuauaaa uuaaugcagg uac

23

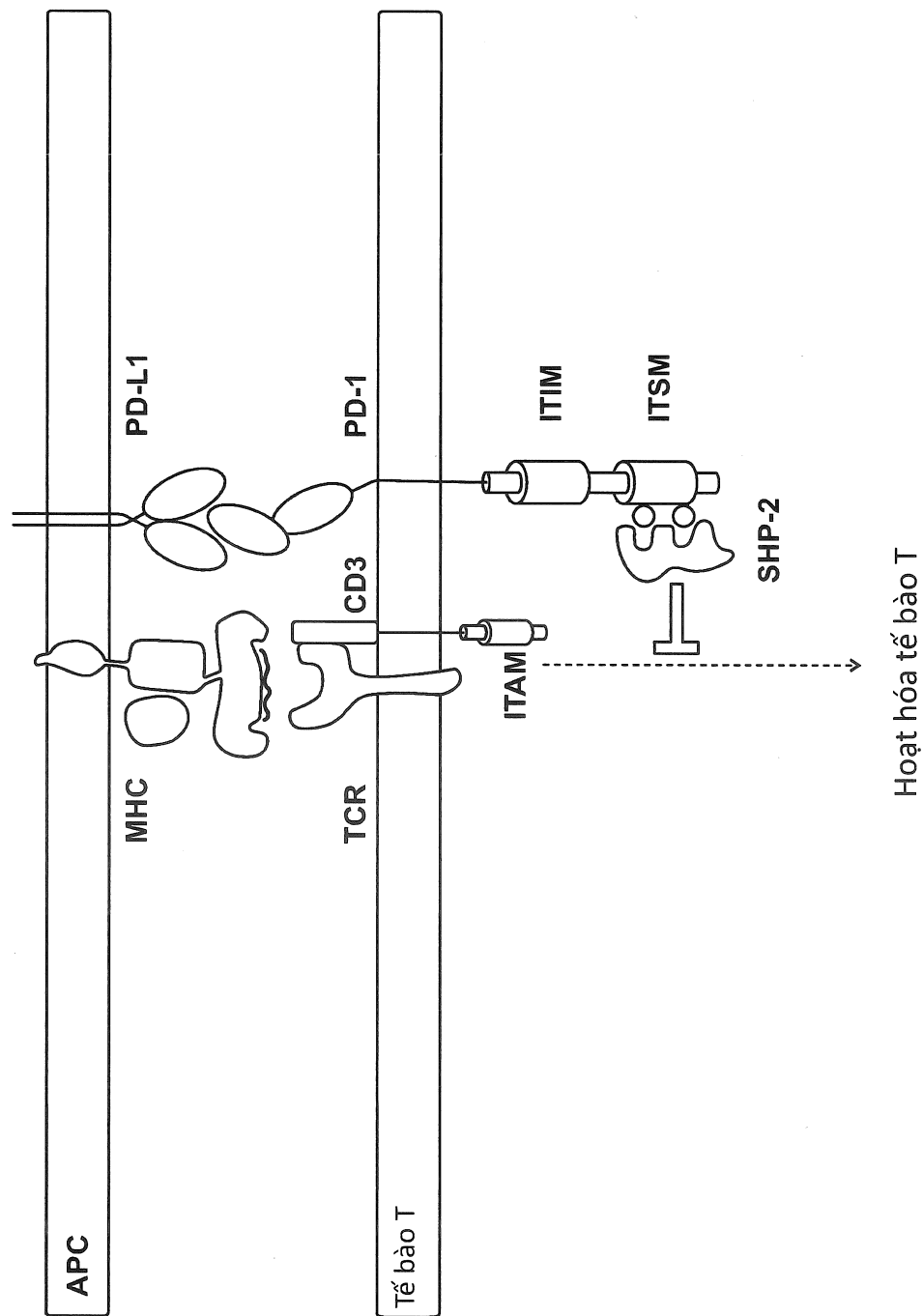


FIG. 1