(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) **1-0047667**

(51)[2022.01] **C12N 15/11**; A61P 1/16; A61P 3/06; C12N 15/113; C07H 15/04; A61K 47/54; A61P 31/20

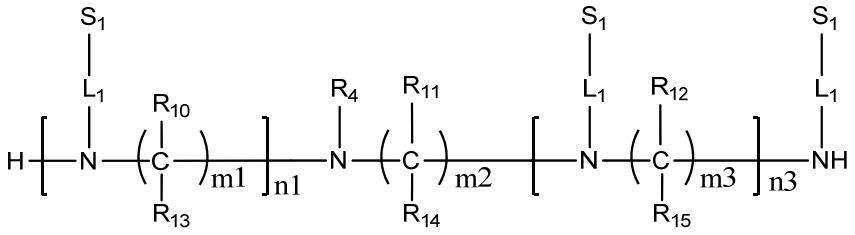
(13) **B**

(21) 1-2020-03777
(22) 29/11/2018
(86) PCT/CN2018/118224 29/11/2018
(87) WO2019/128611 04/07/2019
(30) 201711479058.9 29/12/2017 CN; 201811165363.5 30/09/2018 CN
(45) 25/06/2025 447
(43) 25/12/2020 393A
(73) SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD. (CN)
168 Yuanfeng Road, Yushan Town, Kunshan, Jiangsu 215300, China
(72) ZHANG, Hongyan (SE); YANG, Zhiwei (US); CAO, Liqiang (CN); WAN, Liangyi (CN).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) HỢP CHẤT NHẮM ĐÍCH TẾ BÀO GAN VÀ THỂ TIẾP HỢP TƯƠNG ỨNG CỦA CHÚNG

(21) 1-2020-03777

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất để tạo thành thể tiếp hợp với hoạt chất như oligonucleotit có cấu trúc được thể hiện bằng công thức (321). Sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp tương ứng. Thể tiếp hợp theo sáng chế có thể nhắm đích đặc hiệu các tế bào gan, nhờ đó giải quyết một cách hiệu quả các vấn đề liên quan đến việc phân phối thuốc oligonucleotit *in vivo*, và có độc tính thấp và hiệu suất phân phối ưu việt trong khi vẫn duy trì độ ổn định cao cho oligonucleotit được phân phối. Sáng chế cũng đề cập đến kit chứa thể tiếp hợp này.



Công thức (321)

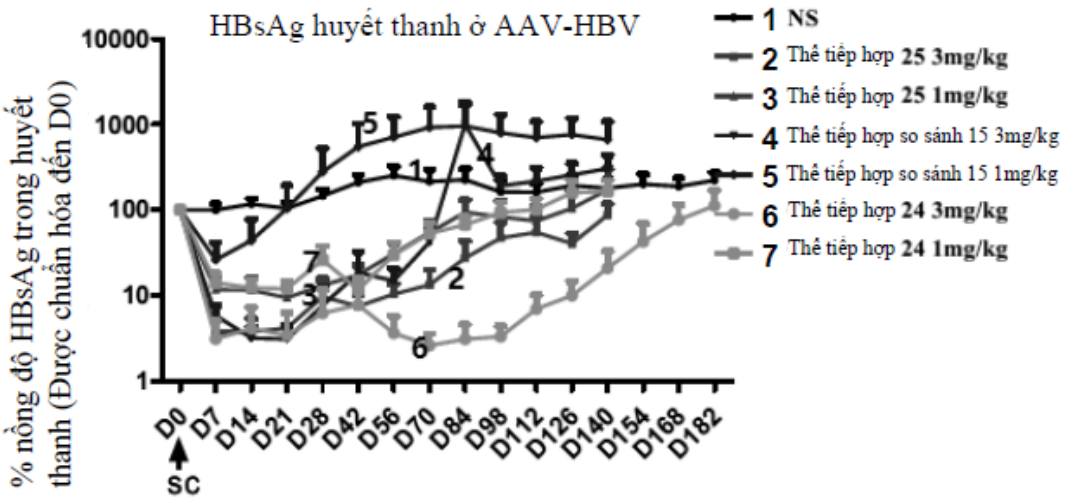


Fig. 16

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

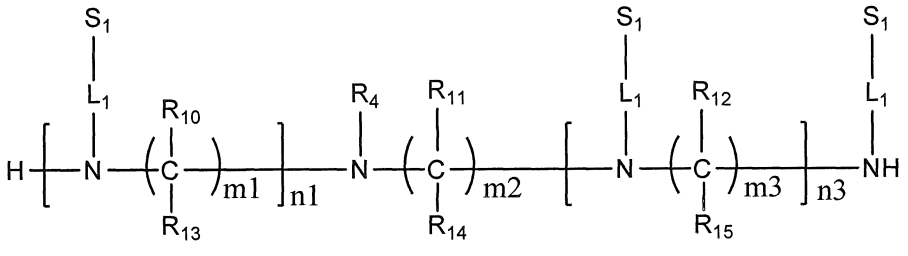
Sáng chế đề cập đến hợp chất nhắm đích tế bào gan và thể tiếp hợp tương ứng của chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hệ thống phân phối là một trong các kỹ thuật chính để phát triển thuốc ARN nhỏ. Một loại hệ thống phân phối ARN nhỏ là kỹ thuật phân phối tiếp hợp được nhắm đích là tế bào gan.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất có cấu trúc được thể hiện bởi công thức (321):



Công thức (321)

trong đó,

n1 là số nguyên nằm trong khoảng 1-3, và n3 là số nguyên nằm trong khoảng 0-4;

mỗi trong số m1, m2, và m3 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng 2-10;

mỗi trong số R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} độc lập được chọn từ H, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} haloalkyl, và C_1-C_{10} alkoxy;

R_4 là gốc có khả năng liên kết với thuốc có hoạt tính hoặc hoạt chất qua liên kết cộng hóa trị;

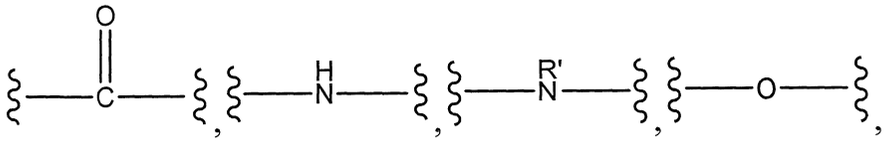
mỗi L_1 là alkylen mạch thẳng có độ dài từ 1 đến 70 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ bao

gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, $S(O)_2$, C_2-C_{10} alkenylen, C_2-C_{10} alkynylen, C_6-C_{10} arylen, C_3-C_{18} heteroxyclylen, và C_5-C_{10} heteroarylen, và trong đó L_1 tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ bao gồm: C_1-C_{10} alkyl, C_6-C_{10} aryl, C_5-C_{10} heteroaryl, C_1-C_{10} haloalkyl, -OC_1-C_{10} alkyl, -OC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-OH, -OC_1-C_{10} haloalkyl, -SC_1-C_{10} alkyl, -SC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-SH, -SC_1-C_{10} haloalkyl, halo, -OH, -SH, $-NH_2$, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2, -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -NH(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkylphenyl), -NH(C_1-C_{10} alkylphenyl), xyano, nitro, $-CO_2H$, -C(O)OC_1-C_{10} alkyl, -CON(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -CONH(C_1-C_{10} alkyl), $-CONH_2$, -NHC(O)(C_1-C_{10} alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C_1-C_{10} alkyl, -C(O)C_1-C_{10} alkylphenyl, -C(O)C_1-C_{10} haloalkyl, -OC(O)C_1-C_{10} alkyl, $-SO_2$(C_1-C_{10} alkyl), $-SO_2$(phenyl), $-SO_2$(C_1-C_{10} haloalkyl), $-SO_2NH_2$, $-SO_2NH$(C_1-C_{10} alkyl), $-SO_2NH$(phenyl), $-NHSO_2$(C_1-C_{10} alkyl), $-NHSO_2$(phenyl), và $-NHSO_2$(C_1-C_{10} haloalkyl);

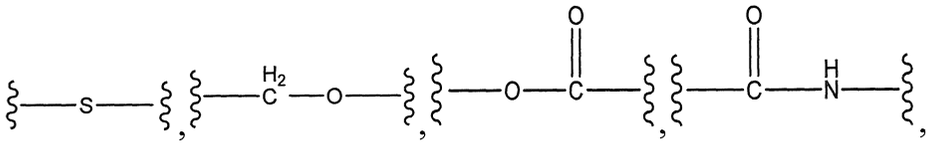
mỗi S_1 độc lập là M_1, trong đó hydroxyl có hoạt tính bất kỳ, nếu có, được bảo vệ bằng nhóm bảo vệ hydroxyl;

mỗi M_1 độc lập được chọn từ phối tử có khả năng liên kết với thụ thể bề mặt tế bào.

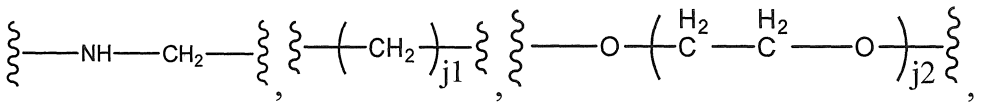
Theo một số phương án, mỗi L_1 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nhóm A1-A26 và tổ hợp bất kỳ của chúng:



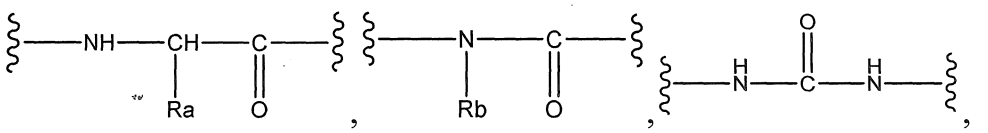
(A1) (A2) (A3) (A4)



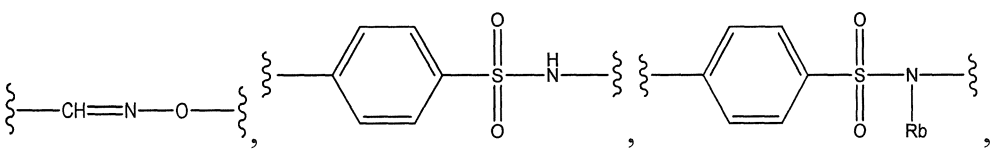
(A5) (A6) (A7) (A8)



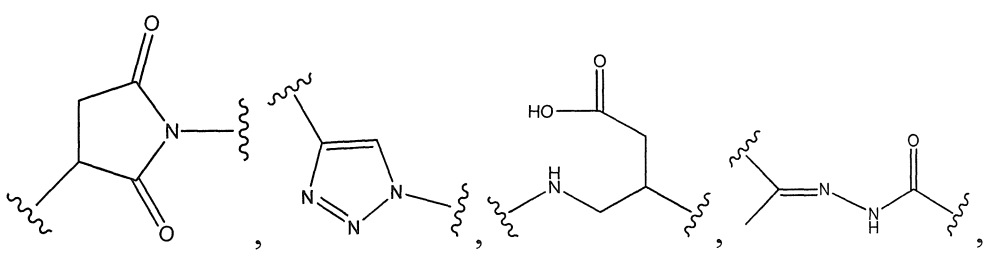
(A9) (A10) (A11)



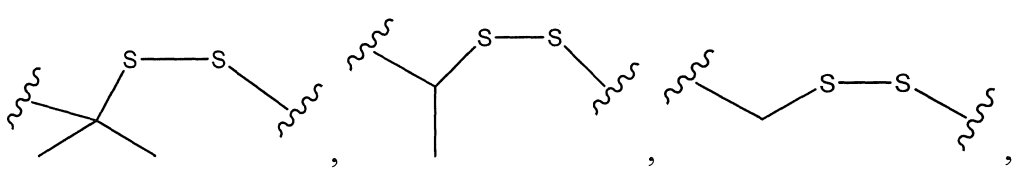
(A12) (A13) (A14)



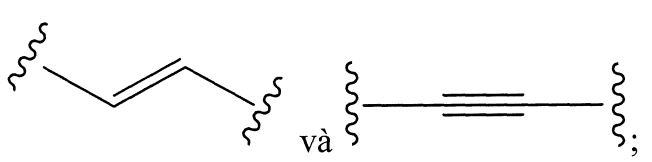
(A15) (A16) (A17)



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



(A22) (A23) (A24)



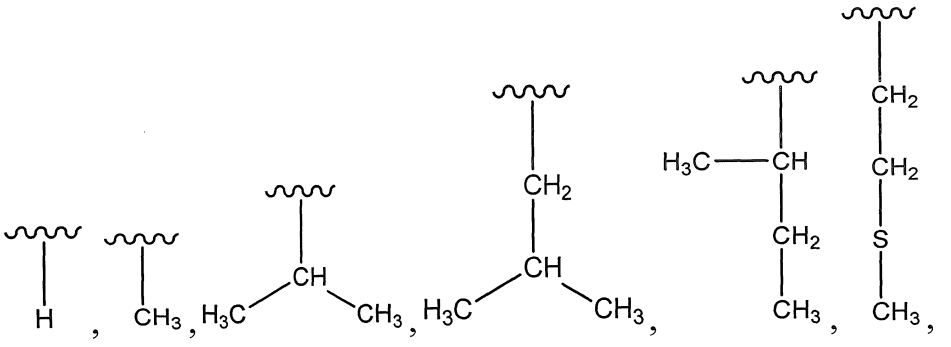
(A25) và (A26);

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

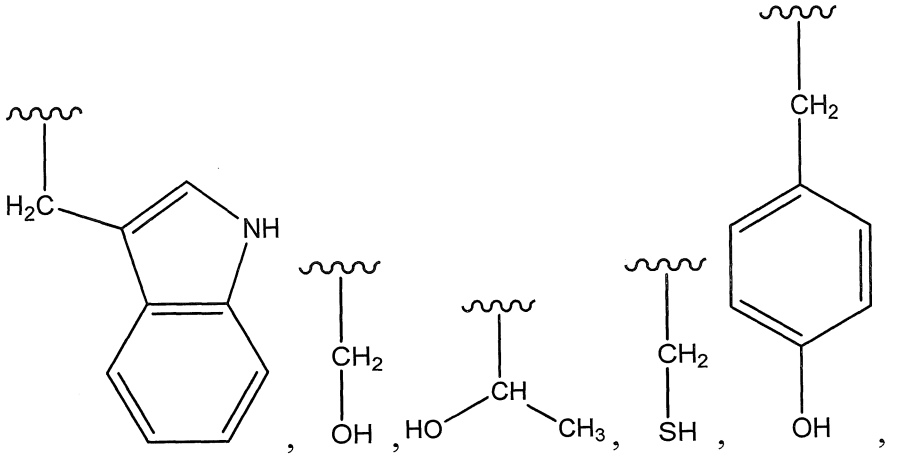
mỗi j2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng 1-20;

mỗi R' độc lập là C_1-C_{10} alkyl;

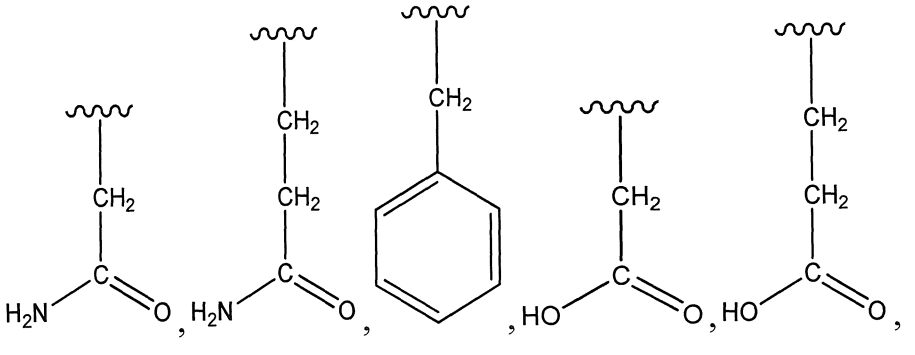
mỗi Ra độc lập được chọn từ nhóm bao gồm A27-A45 và tổ hợp bất kỳ của chúng:



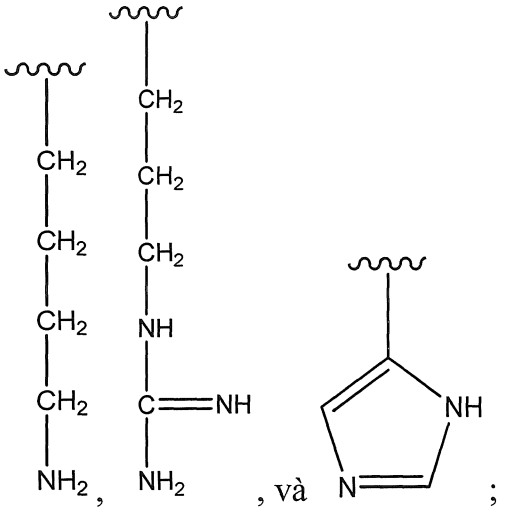
(A27) (A28) (A29) (A30) (A31) (A32)



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



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

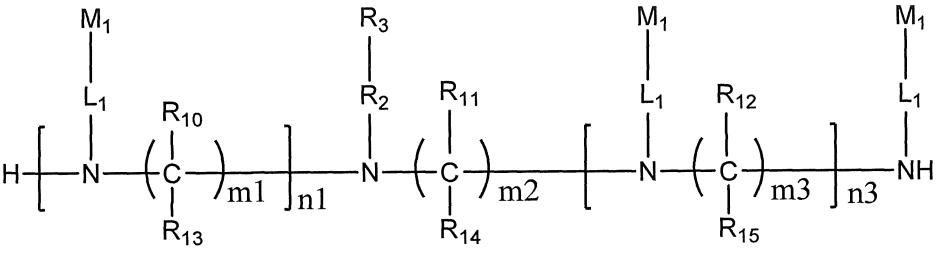


(A43) (A44) (A45)

mỗi Rb độc lập là C_1-C_{10} alkyl; và

là vị trí mà ở đó một nhóm được gắn với phần còn lại của phân tử.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp có cấu trúc được thể hiện bằng công thức (1):



Công thức (1),

trong đó,

n1 là số nguyên nằm trong khoảng 1-3, và n3 là số nguyên nằm trong khoảng 0-4;

mỗi trong số m1, m2, và m3 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng 2-10;

mỗi trong số R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} độc lập được chọn từ H, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} haloalkyl, và C_1-C_{10} alkoxy;

R_3 là thuốc có hoạt tính;

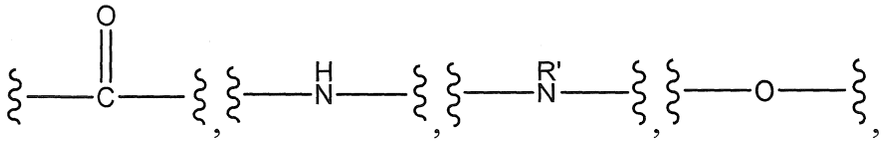
R_2 là alkylen mạch thẳng có độ dài từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, $S(O)_2$, C_2-C_{10} alkenylen, C_2-C_{10} alkynylen, C_6-C_{10} arylen, C_3-C_{18} heteroxyclylen, và C_5-C_{10} heteroarylen,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

mỗi L_1 độc lập là alkylen mạch thẳng có độ dài từ 1 đến 70 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, $S(O)_2$, C_2-C_{10} alkenylen, C_2-C_{10} alkynylen, C_6-C_{10} arylen, C_3-C_{18} heteroxyclylen, và C_5-C_{10} heteroarylen, và trong đó L_1 tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ bao gồm: C_1-C_{10} alkyl, C_6-C_{10} aryl, C_5-C_{10} heteroaryl, C_1-C_{10} haloalkyl, -OC_1-C_{10} alkyl, -OC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-OH, -OC_1-C_{10} haloalkyl, -SC_1-C_{10} alkyl, -SC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-SH, -SC_1-C_{10} haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH_2, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2, -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -NH(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkylphenyl), -NH(C_1-C_{10} alkylphenyl), xyano, nitro, -CO_2H, -C(O)OC_1-C_{10} alkyl, -CON(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -CONH(C_1-C_{10} alkyl), -$CONH_2$, -NHC(O)(C_1-C_{10} alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C_1-C_{10} alkyl, -C(O)C_1-C_{10} alkylphenyl, -C(O)C_1-C_{10} haloalkyl, -OC(O)C_1-C_{10} alkyl, -SO_2(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2(phenyl), -SO_2(C_1-C_{10} haloalkyl), -SO_2NH_2, -SO_2NH(C_1-C_{10} alkyl),

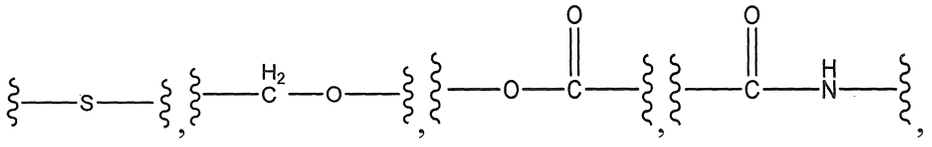
-SO_2NH(phenyl), -$NHSO_2$(C_1-C_{10} alkyl), -$NHSO_2$(phenyl), và -$NHSO_2$(C_1-C_{10} haloalkyl);

mỗi M_1 được chọn từ một trong các phối tử có khả năng liên kết với thụ thể bề mặt tế bào.

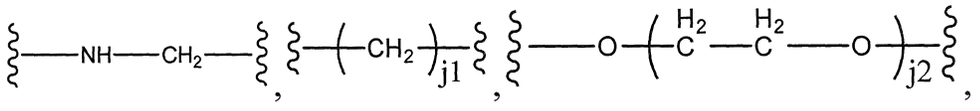
Theo một số phương án, mỗi L_1 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm nhóm A1-A26 và tổ hợp bất kỳ của chúng:



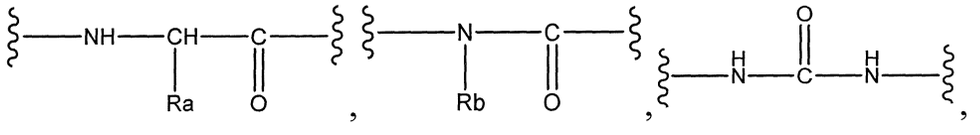
(A1) (A2) (A3) (A4)



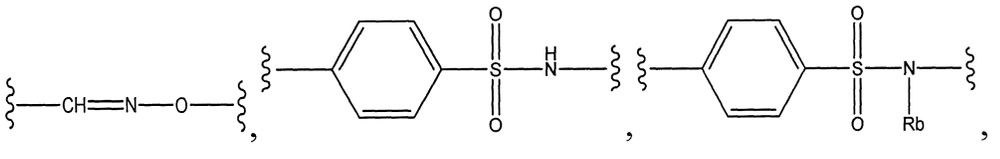
(A5) (A6) (A7) (A8)



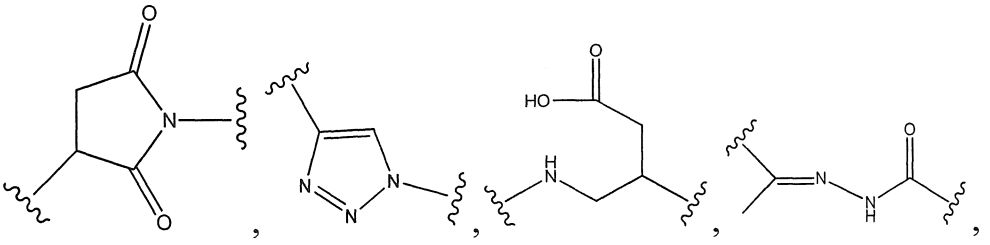
(A9) (A10 (A11)



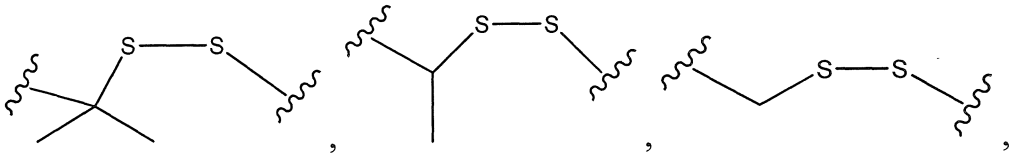
(A12) (A13) (A14)



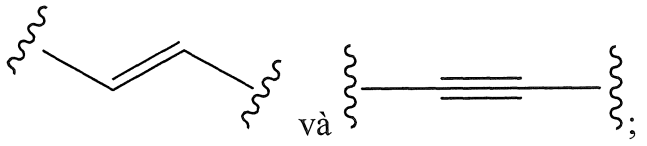
(A15) (A16) (A17)



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



(A22) (A23) (A24)



và ;

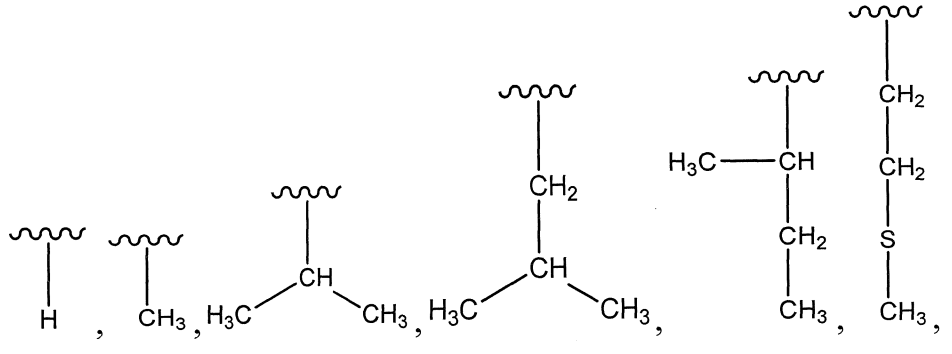
(A25) (A26)

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

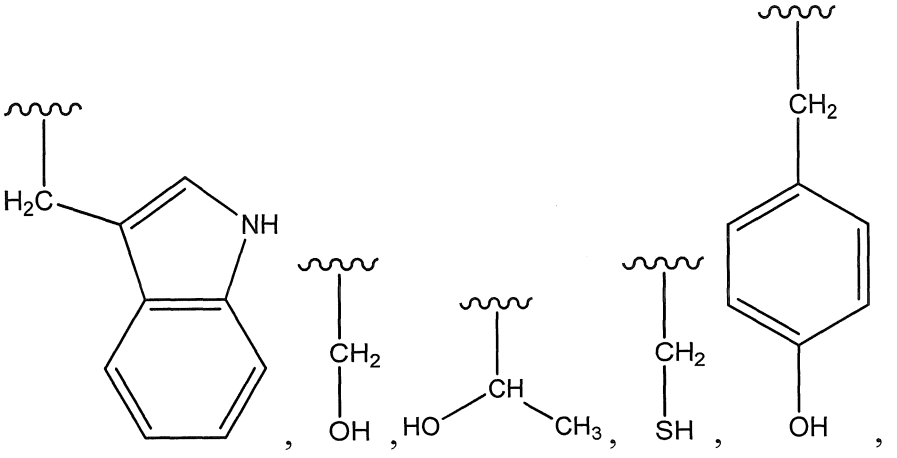
mỗi j2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng 1-20;

mỗi R' độc lập là C_1-C_{10} alkyl;

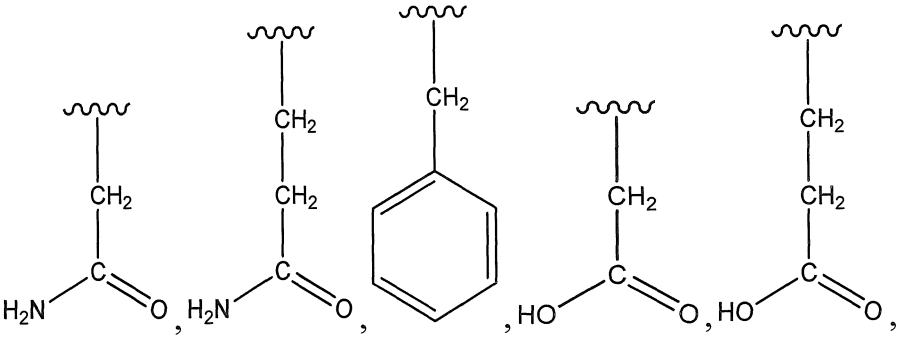
mỗi Ra độc lập được chọn từ nhóm bao gồm A27-A45 và tổ hợp bất kỳ của chúng:



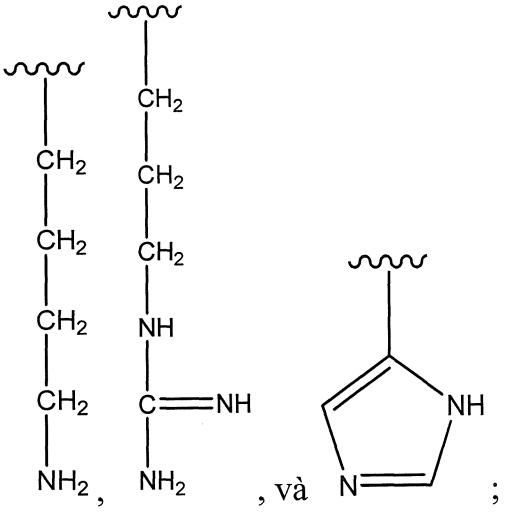
(A27) (A28) (A29) (A30) (A31) (A32)



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



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



(A43) (A44) (A45)

mỗi Rb độc lập là C_1-C_{10} alkyl; và

~~~ là vị trí mà ở đó một nhóm được gắn với phần còn lại của phân tử.
~~~

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc sử dụng thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này để bào chế thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh lý hoặc bệnh do sự biểu hiện của gen đặc hiệu ở tế bào gan gây ra.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị ở đối tượng cần điều trị tình trạng bệnh lý hoặc bệnh do sự biểu hiện của gen đặc hiệu ở tế bào gan gây ra, bao gồm việc cho đối tượng này dùng thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này với lượng có tác dụng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự biểu hiện của gen đặc hiệu ở tế bào gan, bao gồm việc tiếp xúc thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kit chứa thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Dấu hiệu và ưu điểm bổ sung của sáng chế sẽ được minh họa chi tiết sau đây.

Tài liệu kết hợp để tham khảo

Tất cả các công bố, patent, và đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế nêu trong bản mô tả này được kết hợp vào đây để tham khảo ở cùng phạm vi như thể mỗi công bố, patent, hoặc đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế riêng rẽ được kết hợp cụ thể và riêng rẽ để tham khảo.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Dấu hiệu mới của sáng chế được nêu cùng với đặc điểm như trong phần yêu cầu bảo hộ kèm theo. Có thể hiểu rõ hơn về các dấu hiệu và ưu điểm của sáng chế dựa vào phần mô tả chi tiết dưới đây mà nêu các phương án minh họa, trong đó vận dụng các nguyên tắc của sáng chế, và các hình vẽ kèm theo gồm:

Fig. 1A và Fig. 1B thể hiện kết quả bán định lượng của thử nghiệm độ ổn định của thể tiếp hợp siARN ở Tritosom *in vitro*.

Fig. 2A và Fig. 2B thể hiện kết quả bán định lượng của thử nghiệm độ ổn định của thể tiếp hợp siARN thử nghiệm ở huyết tương người *in vitro*.

Fig. 3A và Fig. 3B thể hiện kết quả bán định lượng của thử nghiệm độ ổn định của thể tiếp hợp siARN thử nghiệm ở huyết tương khỉ *in vitro*.

Fig. 4-Fig. 11 là profin trao đổi chất theo thời gian thể hiện nồng độ PK/TK trong huyết tương hoặc mô đối với: Thể tiếp hợp 24 ở huyết tương chuột cống với liều lượng 10 mg/kg (Fig. 4); Thể tiếp hợp 24 ở gan và thận chuột cống với liều lượng 10 mg/kg (Fig. 5); Thể tiếp hợp 24 ở huyết tương chuột cống với liều lượng 50 mg/kg (Fig. 6); Thể tiếp hợp 24 ở gan và thận chuột cống với liều lượng 50 mg/kg (Fig. 7); Thể tiếp hợp 25 ở huyết tương chuột cống với liều lượng 10 mg/kg (Fig. 8); Thể tiếp hợp 25 ở gan và thận chuột cống với liều lượng 10 mg/kg (Fig. 9); Thể tiếp hợp 25 ở huyết tương chuột cống với liều lượng 50 mg/kg (Fig. 10); Thể tiếp hợp 25 ở gan và thận chuột cống với liều lượng 50 mg/kg (Fig. 11).

Fig. 12A, Fig. 12B, Fig. 12C, và Fig. 12D thể hiện việc xác định giá trị IC_{50} của thể tiếp hợp 24 trong ức chế sự biểu hiện của GSCM so với GSSM, PSCM và PSSM, một cách tương ứng.

Fig. 13-Fig. 15 thể hiện sự ức chế của HBV mARN bằng thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này *in vivo*.

Fig. 16 thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian đối với sự biểu hiện HBsAg ở huyết thanh chuột nhắt chuyển gen HBV bởi thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Fig. 17 thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian đối với sự biểu hiện HBV ADN ở huyết thanh chuột cống chuyển gen HBV bởi thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Fig. 18 thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian đối với sự biểu hiện HBsAg ở huyết thanh chuột nhắt chuyển gen HBV bởi thể tiếp hợp 25 được bộc lộ trong bản mô tả này.

Fig. 19 thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian đối với sự biểu hiện HBsAg ở mô hình M-Tg bởi thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Fig. 20 thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian đối với sự biểu hiện HBsAg ở mô hình M-Tg bởi thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Fig. 21 thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian đối với sự biểu hiện HBsAg ở mô hình HBV-Tg bản sao 1.28 bởi thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Fig. 22-Fig. 24 thể hiện sự ức chế trên mARN đích với mARN ngoài đích của thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Fig. 25-Fig. 27 thể hiện sự ức chế của HBV mARN bởi thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này *in vivo*.

Fig. 28 thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian đối với sự biểu hiện HBsAg ở huyết thanh chuột nhắt chuyển gen HBV bởi thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Fig. 29 thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian đối với sự biểu hiện HBsAg ở huyết thanh chuột nhắt chuyển gen HBV bởi thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Fig. 30 thể hiện sự ức chế của HBV mARN ở D85 bởi thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này *in vivo*.

Fig. 31 thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian đối với sự biểu hiện HBsAg ở huyết thanh chuột nhắt chuyển gen HBV bởi thể tiếp hợp 43.

Fig. 32 thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian đối với sự biểu hiện HBV ADN ở huyết thanh chuột nhắt chuyển gen HBV bởi thể tiếp hợp 43.

Fig. 33 và Fig. 34 thể hiện độ ổn định của thể tiếp hợp 167 dịch tiêu lysosom có nguồn gốc từ người và chuột cống.

Fig. 35 thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian đối với sự biểu hiện HBsAg ở mô hình HBV-Tg bản sao 1.28 bởi thể tiếp hợp 168.

Fig. 36 thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian đối với sự biểu hiện HBeAg ở mô hình HBV-Tg bản sao 1.28 bởi thể tiếp hợp 168.

Fig. 37 thể hiện sự ức chế phụ thuộc thời gian đối với sự biểu hiện HBV ADN ở mô hình HBV-Tg bản sao 1.28 bởi thể tiếp hợp 168.

Fig. 38A và Fig. 38B thể hiện tỷ lệ ức chế sự biểu hiện ANGPTL mARN ở D14 và D28.

Fig. 39A và Fig. 39B thể hiện tỷ lệ ức chế lipit trong máu, được thể hiện bằng tổng cholesterol (CHO) và triglyxerit (TG) ở huyết thanh, bởi thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Fig. 40A và Fig. 40B thể hiện tỷ lệ ức chế phụ thuộc thời gian của lipit trong máu, được thể hiện bằng tổng cholesterol (CHO) và triglyxerit (TG) ở huyết thanh, bởi thể tiếp hợp 115.

Fig. 41A và Fig. 41B thể hiện tỷ lệ ức chế phụ thuộc thời gian của lipit trong máu, được thể hiện bằng tổng cholesterol (CHO) và triglyxerit (TG) ở huyết thanh, bởi các thể tiếp hợp 115 và 111.

Fig. 42A, Fig. 42B, Fig. 42C và Fig. 42D thể hiện tỷ lệ ức chế phụ thuộc thời gian của lipit trong máu, được thể hiện bằng tổng cholesterol (CHO) và triglyxerit (TG) ở huyết thanh, bởi thể tiếp hợp 111 ở các liều lượng khác nhau.

Fig. 43A và Fig. 43B thể hiện tỷ lệ ức chế phụ thuộc thời gian của lipit trong máu, được thể hiện bằng tổng cholesterol (CHO) và triglyxerit (TG) ở huyết thanh, bởi các thể tiếp hợp 25 và 169; và Fig. 43C thể hiện tỷ lệ ức chế sự biểu hiện ANGPTL mARN.

Fig. 44A thể hiện tỷ lệ ức chế sự biểu hiện APOC3 trong gan ở D14, và Fig. 44B và Fig. 44C thể hiện tỷ lệ ức chế của lipit trong máu, được thể hiện bằng tổng cholesterol (CHO) và triglyxerit (TG) ở huyết thanh, bởi thể tiếp hợp 144 ở các liều lượng khác nhau.

Fig. 45A và Fig. 45B thể hiện tỷ lệ ức chế của lipit trong máu, được thể hiện bằng tổng cholesterol (CHO) và triglyxerit (TG) ở huyết thanh, bởi thể tiếp hợp 170 ở các liều lượng khác nhau.

Fig. 46A, Fig. 46B, Fig. 46C và Fig. 46D thể hiện tỷ lệ ức chế của lipit trong máu, được thể hiện bằng tổng cholesterol (CHO) và triglyxerit (TG) ở huyết thanh, bởi thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án chi tiết của sáng chế được mô tả chi tiết như dưới đây. Cần hiểu rằng các phương án chi tiết được mô tả trong bản mô tả này chỉ được sử dụng để minh họa và giải thích sáng chế và không nhằm giới hạn sáng chế ở khía cạnh bất kỳ.

Định nghĩa

Trong ngữ cảnh của sáng chế, trừ khi được mô tả khác đi, các chữ in hoa C, G, U, và A chỉ thành phần bazơ của nucleotit; chữ in thường m chỉ rằng nucleotit liền kề bên trái của chữ m là nucleotit cải biến bằng 2'-metoxy; chữ in thường f chỉ rằng nucleotit liền kề bên trái của chữ f là nucleotit cải biến bằng 2'-flo; chữ in thường s chỉ liên kết phosphorothioat giữa hai nucleotit liền kề hai bên của chữ s; P1 chỉ rằng nucleotit liền kề bên phải của P1 là 5'-phosphat nucleotit hoặc nucleotit được cải biến bởi chất tương tự 5'-phosphat, đặc biệt là nucleotit được cải biến bởi vinyl phosphat (được thể hiện bằng chữ VP trong các ví dụ dưới đây), 5'-phosphat nucleotit (được thể hiện bằng chữ P trong các ví dụ dưới đây) hoặc nucleotit được cải biến bởi 5'-thiophosphat (được thể hiện bằng chữ P trong các ví dụ dưới đây).

Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ "bổ sung" và "bổ sung ngược" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này, và có nghĩa đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này, cụ thể là, mỗi bazơ ở một sợi được cặp bổ sung với một sợi khác trong phân tử axit nucleic sợi kép. Trong ADN, adenin bazơ purin (A) luôn được cặp với thymin bazơ pyrimidin (T) (hoặc uraxil (U) ở ARN); và guanin bazơ purin (G) luôn được cặp với xytosin bazơ pyrimidin (C). Mỗi cặp bazơ chứa purin và pyrimidin. Trong khi adenin trong sợi luôn được cặp thymin (hoặc uraxil) trong một sợi khác, và guanin được cặp với xytosin, các sợi này được coi là bổ sung; và trình tự bazơ của sợi có thể được suy luận từ trình tự của sợi bổ sung của nó. Tương ứng, "sự ghép đôi sai" dùng để chỉ bazơ ở vị trí tương ứng không có mặt trong cặp bổ sung trong axit nucleic sợi kép.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, trừ khi được mô tả khác đi, "về cơ bản bổ sung ngược" dùng để chỉ rằng không có nhiều hơn 3 cặp ghép đôi sai ở hai trình tự nucleotit. "Hầu như bổ sung ngược" dùng để chỉ rằng không có nhiều hơn 1 cặp ghép đôi sai ở hai trình tự nucleotit. "Bổ sung ngược hoàn toàn" dùng để chỉ không có sự ghép đôi sai ở hai trình tự nucleotit.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, "sự khác nhau nucleotit" giữa một trình tự nucleotit và một trình tự nucleotit khác dùng để chỉ sự thay đổi về bazơ của nucleotit ở cùng vị trí giữa đó. Ví dụ, trong trường hợp mà bazơ nucleotit ở trình tự thứ hai là A còn bazơ ở cùng vị trí đó trong trình tự thứ nhất là U, C, G hoặc T, thì coi như sự khác nhau nucleotit tồn tại ở vị trí giữa 2 trình tự đó. Theo một số phương án, trong khi nucleotit ở một vị trí được thay thế bằng nucleotit mất đi hoặc chất tương tự nucleotit, thì cũng coi như có sự khác nhau nucleotit ở vị trí đó.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, đặc biệt là trong phần mô tả về phương pháp chuẩn bị phân tử tiếp hợp hoặc thể tiếp hợp siARN được mô tả theo sáng chế, trừ khi được mô tả khác đi, “monome nucleosit” hoặc “monome nucleosit” dùng để chỉ, theo trình tự ARN được chuẩn bị, “phosphoramidit ARN không được cải biến hoặc được cải biến”, hoặc “các phosphoramidit ARN không được cải biến hoặc được cải biến” lần lượt được sử dụng trong quy trình còn được gọi là “quy trình tổng hợp phosphoramidit pha rắn” đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này để tổng hợp ARN. Các phosphoramidit ARN còn được gọi là nucleosit phosphoramidit ở nơi khác. Tất cả các monome nucleosit được sử dụng theo sáng chế đều có bán trên thị trường.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, gạch ngang ("-") không nằm giữa hai chữ cái hoặc ký hiệu được sử dụng để chỉ điểm gắn cho phần tử thế. Ví dụ, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2 được gắn qua C_1-C_{10} alkyl.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "tùy ý" hoặc "một cách tùy ý" có nghĩa là sự kiện hoặc hoàn cảnh được mô tả sau đó có thể hoặc không thể xảy ra, và phần mô tả bao gồm trường hợp trong đó sự kiện hoặc hoàn cảnh xảy ra và trường hợp trong đó nó không xảy ra. Ví dụ, "alkyl được thế tùy ý" bao gồm cả "alkyl" và "alkyl được thế" như được định nghĩa dưới đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng, với nhóm bất kỳ chứa một hoặc nhiều phần tử thế, nhóm này không

nhằm đưa phần thế hoặc nhóm thế bất kỳ mà không thực tế về mặt không gian, không khả thi về mặt tổng hợp và/hoặc không ổn định về mặt bản chất vào.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "alkyl" dùng để chỉ mạch thẳng và mạch nhánh có số nguyên tử cacbon được chỉ định, thường nằm trong khoảng từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon, ví dụ nằm trong khoảng từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, như nằm trong khoảng từ 1 đến 8 hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Ví dụ C_1-C_6 alkyl bao gồm cả alkyl mạch thẳng và nhánh có trong khoảng từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Khi gốc alkyl có số cacbon cụ thể được đặt tên, thì tất cả các phiên bản mạch nhánh và thẳng có số cacbon đó đều được dự định là được bao gồm; vì vậy, ví dụ, "butyl" có nghĩa là bao gồm n-butyl, sec-butyl, isobutyl và t-butyl; "propyl" bao gồm n-propyl và isopropyl. Alkylen là một nhóm nhỏ của alkyl, dùng để chỉ gốc giống như alkyl, nhưng có hai điểm gắn.

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

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "alkynyl" dùng để chỉ nhóm alkyl mạch thẳng hoặc nhánh không no có ít nhất một liên kết ba cacbon-cacbon thu được bằng cách loại bỏ hai phân tử của hydro ra khỏi các nguyên tử cacbon liền kề của alkyl gốc. Nhóm alkynyl thông thường bao gồm, nhưng không giới hạn ở, etynyl; propynyl như prop-1-yn-1-yl, prop-2-yn-1-yl; butynyl như but-1-yn-1-yl, but-1-yn-3-yl, but-3-yn-1-yl; và dạng tương tự. Theo một số phương án nhất định, nhóm alkynyl có từ 2 đến 20 nguyên

tử cacbon và theo các phương án khác, nằm trong khoảng từ 2 đến 10, nằm trong khoảng từ 2 đến 8, hoặc nằm trong khoảng từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon. Alkynylen là một nhóm nhỏ của alkynyl, đề cập đến gốc giống như alkynyl, nhưng có hai điểm gắn.

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

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "aryl" dùng để chỉ gốc thu được từ hệ vòng hydrocacbon đơn vòng hoặc đa vòng thơm bằng cách loại bỏ nguyên tử hydro khỏi nguyên tử cacbon của vòng. Hệ vòng hydrocacbon đơn vòng hoặc đa vòng thơm chỉ chứa hydro và cacbon từ sáu đến mười tám nguyên tử cacbon, trong đó ít nhất một trong các vòng của hệ vòng là hoàn toàn không no, tức là, nó chứa hệ $(4n + 2)$ π–electron được định vị, vòng theo học thuyết Hückel. Nhóm aryl bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhóm như phenyl, fluorenyl, và naphtyl. Arylen là một nhóm nhỏ của aryl, đề cập đến gốc giống như aryl, nhưng có hai điểm gắn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "xycloalkyl" dùng để chỉ vòng carboxyclic không thơm, thường có từ 3 đến 7 nguyên tử cacbon vòng. Vòng này có thể no hoặc có một hoặc nhiều liên kết đôi cacbon-cacbon. Các ví dụ về nhóm xycloalkyl bao gồm xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclopentenyl, xyclohexyl, và xyclohexenyl, cũng như nhóm vòng cầu và lồng như norbornan.

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

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "haloalkyl" dùng để chỉ alkyl như được định nghĩa ở trên có số nguyên tử cacbon cụ thể, được thế bằng 1 hoặc nhiều nguyên tử halogen, lên đến số nguyên tử halogen cho phép tối đa. Các ví dụ về haloalkyl bao gồm, nhưng không giới hạn ở, triflometyl, diflometyl, 2-floetyl, và penta-floetyl.

"Heteroxyclyl" dùng để chỉ gốc vòng không thơm có từ 3 đến 18 cạnh ổn định chứa từ hai đến mười hai nguyên tử cacbon và từ một đến sáu nguyên tử khác loại được chọn từ nitơ, oxy và lưu huỳnh. Trừ khi được nêu cụ thể khác đi trong bản mô tả, gốc heteroxyclyl là hệ vòng một vòng, hai vòng, ba vòng hoặc bốn vòng, có thể bao gồm hệ vòng ngưng tụ hoặc cầu. Các nguyên tử khác loại trong gốc heteroxyclyl có thể tùy ý được oxy hóa. Một hoặc nhiều nguyên tử nitơ, nếu có mặt, tùy ý là bậc bốn. Gốc heteroxyclyl là no một phần hoặc hoàn toàn. Heteroxyclyl này có thể được gắn vào phần còn lại của phân tử qua nguyên tử bất kỳ của (các) vòng. Các ví dụ về gốc heteroxyclyl này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dioxolanyl, thienyl[1,3]dithianyl, decahydroisoquinolyl, imidazolinyl, imidazolidinyl, isothiazolidinyl, isoxazolidinyl, morpholinyl, octahydroindolyl, octahydroisoindolyl, 2-oxopiperazinyl, 2-oxopiperidinyl, 2-oxopyrrolidinyl, oxazolidinyl, piperidinyl, piperazinyl, 4-piperidonyl, pyrolidinyl, pyrazolidinyl, quinuclidinyl, thiazolidinyl, tetrahydrofuryl, trithianyl, tetrahydropyranyl, thiomorpholinyl, thiamorpholinyl, 1-oxo-thiomorpholinyl, và 1,1-dioxo-thiomorpholinyl.

"Heteroaryl" dùng để chỉ gốc thu được từ gốc vòng thơm từ 3 đến 18 cạnh mà chứa từ hai đến mười bảy nguyên tử cacbon và từ một đến sáu nguyên tử khác loại được chọn từ nitơ, oxy và lưu huỳnh. Như được sử dụng trong bản mô tả này, gốc heteroaryl có thể là hệ vòng một vòng, hai vòng, ba vòng hoặc bốn vòng, trong đó ít nhất một trong các vòng của hệ vòng là hoàn toàn không no, tức là, nó chứa hệ $(4n + 2)$ π–electron được định vị, vòng theo học thuyết Hückel. Heteroaryl bao gồm hệ vòng ngưng tụ hoặc cầu. (Các) nguyên tử khác loại trong gốc heteroaryl tùy ý được oxy hóa. Một hoặc nhiều nguyên tử nitơ, nếu có mặt, tùy ý là bậc bốn. Heteroaryl này được gắn vào phần còn lại của phân tử qua nguyên tử bất kỳ của (các) vòng. Các ví dụ về heteroaryl bao gồm, nhưng không giới hạn ở, azepinyl, acridinyl, benzimidazolyl, benzindolyl, 1,3-benzodioxolyl, benzofuranyl, benzooxazolyl, benzo[d]thiazolyl, benzothiadiazolyl, benzo[*b*][1,4]dioxepinyl, benzo[b][1,4]oxazinyl, 1,4-benzodioxanyl, benzonaphtofuranyl, benzoxazolyl, benzodioxolyl, benzodioxinyl, benzopyranyl, benzopyranonyl, benzofuranyl, benzofuranonyl, benzothienyl (benzothiophenyl), benzothieno[3,2-d]pyrimidinyl, benzotriazolyl, benzo[4,6]imidazo[1,2-a]pyridinyl,

carbazolyl, xinnolinyl, xyclopenta[d]pyrimidinyl, 6,7-dihydro-5H-xyclopenta[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidinyl, 5,6-dihydrobenzo[h]quinazolinyl, 5,6-dihydrobenzo[h]xinnolinyl, 6,7-dihydro-5H-benzo[6,7]xyclohepta[1,2-c]pyridazinyl, dibenzofuranyl, dibenzothiophenyl, furanyl, furanonyl, furo[3,2-c]pyridinyl, 5,6,7,8,9,10-hexahydroxycloocta[d]pyrimidinyl, 5,6,7,8,9, 10-hexahydroxycloocta[d]pyridazinyl, 5,6,7,8,9,10-hexahydroxycloocta[d]pyridinyl, isothiazolyl, imidazolyl, indazolyl, indolyl, indazolyl, isoindolyl, indolinyl, isoindolinyl, isoquinolyl, indolizinyl, isoxazolyl, 5,8-methano-5,6,7,8-tetrahydroquinazolinyl, naphthyridinyl, 1,6-naphthyridinonyl, oxadiazolyl, 2-oxoazepinyl, oxazolyl, oxiranyl, 5,6,6a,7,8,9,10,10a-octahydrobenzo[h]quinazolinyl, 1-phenyl-1*H*-pyrrolyl, phenazinyl, phenothiazinyl, phenoxazinyl, phtalazinyl, pteridinyl, purinyl, pyrolyl, pyrazolyl, pyrazolo[3,4-d]pyrimidinyl, pyridinyl, pyrido[3,2-d]pyrimidinyl, pyrido[3,4-d]pyrimidinyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, pyridazinyl, pyrolyl, quinazolinyl, quinoxalinyl, quinolinyl, isoquinolinyl, tetrahydroquinolinyl, 5,6,7,8-tetrahydroquinazolinyl, 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidinyl, 6,7,8,9-tetrahydro-5H-xycloheptа [4,5]thieno[2,3-d]pyrimidinyl, 5,6,7,8-tetrahydropyrido[4,5-c]pyridazinyl, thiazolyl, thiadiazolyl, triazolyl, tetrazolyl, triazinyl, thieno[2,3-d]pyrimidinyl, thieno[3,2-d]pyrimidinyl, thieno[2,3-c]pridinyl, và thiophenyl (tức là thienyl).

Các nhóm bảo vệ hydroxyl khác nhau có thể được sử dụng theo sáng chế. Nói chung, nhóm bảo vệ làm cho các nhóm chức hóa học trơ với điều kiện phản ứng cụ thể, và có thể được thêm vào và xóa khỏi các nhóm chức đó trong phân tử mà gần như là không làm hỏng phần còn lại của phân tử. Nhóm bảo vệ hydroxyl đại diện được bộc lộ trong tài liệu Beaucage, et al., *Tetrahedron* 1992, 48, 2223-2311, và cả trong tài liệu Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis,* Chapter 2, 2d ed, John Wiley & Sons, New York, 1991, mỗi tài liệu được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Theo một số phương án, nhóm bảo vệ ổn định trong điều kiện bazơ nhưng có thể được loại bỏ trong điều kiện axit. Theo một số phương án, các ví dụ không loại trừ về nhóm bảo vệ hydroxyl mà có thể được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm dimetoxytrityl

(DMT), monometoxytrityl, 9-phenylxanthen-9-yl (Pixyl) và 9-(p-metoxyphenyl)xanthen-9-yl (Mox). Theo một số phương án, các ví dụ không loại trừ về nhóm bảo vệ hydroxyl mà có thể được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm Tr (trityl), MMTr (4-metoxytrityl), DMTr (4,4'-dimetoxytrityl), và TMTr (4,4',4"-trimetoxytrityl).

Thuật ngữ "đối tượng", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ động vật bất kỳ, ví dụ, động vật có vú hoặc thú có túi. Đối tượng theo sáng chế bao gồm nhưng không giới hạn ở người, động vật linh trưởng không phải người (ví dụ, khỉ redut hoặc các loại khỉ macaca khác), chuột nhắt, lợn, ngựa, lừa, bò, cừu, chuột cống và gia cầm.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "việc điều trị" hoặc "điều trị", hoặc "làm dịu" hoặc "cải thiện" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này. Các thuật ngữ này dùng để chỉ cách tiếp cận để có được kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm nhưng không giới hạn ở lợi ích trị liệu. "Lợi ích trị liệu" có nghĩa là loại bỏ hẳn hoặc cải thiện các rối loạn cơ bản đang được điều trị. Ngoài ra, lợi ích trị liệu đạt được với việc loại bỏ hẳn hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng sinh lý liên quan đến rối loạn cơ bản để thấy rõ sự cải thiện ở bệnh nhân, mặc dù bệnh nhân này vẫn có thể bị rối loạn cơ bản.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "việc ngăn ngừa" và "ngăn ngừa" được sử dụng thay thế cho nhau. Các thuật ngữ này dùng để chỉ cách tiếp cận để có được kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm nhưng không giới hạn ở lợi ích dự phòng. Với "lợi ích dự phòng", thể tiếp hợp hoặc chế phẩm có thể được sử dụng cho bệnh nhân có nguy cơ phát triển bệnh cụ thể, hoặc bệnh nhân báo cáo một hoặc nhiều triệu chứng sinh lý của bệnh, mặc dù việc chẩn đoán bệnh này có thể chưa được thực hiện.

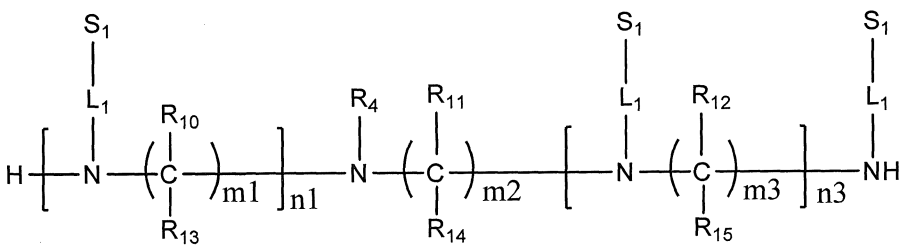
Phân tử tiếp hợp

Theo một khía cạnh, được bộc lộ trong bản mô tả này là phân tử tiếp hợp để phân phối hoạt chất hoặc thuốc có hoạt tính. Theo một số phương án, phân tử tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này hữu ích để nhắm đích đặc hiệu mô. Theo một số phương án, phân tử tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này liên kết với bề mặt thụ thể tế bào. Đối với mục đích này, bất kỳ bề mặt thụ thể tế bào hoặc dấu ấn sinh học hoặc một phần của chúng được dự kiến là phù hợp. Theo một số phương án, phân tử tiếp hợp được bộc lộ

trong bản mô tả này liên kết đặc hiệu với thụ thể duy nhất với mô nhất định, và nhờ đó đạt được sự nhắm đích đặc hiệu mô. Theo một số phương án, phân tử tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này nhắm đích đặc hiệu bề mặt thụ thể tế bào gan, và vì vậy nhắm đích đặc hiệu mô gan. Theo một số phương án, phân tử tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này nhắm đích đặc hiệu thụ thể bề mặt tế bào mà là duy nhất với tế bào gan. Theo một số phương án, phân tử tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này nhắm đích đặc hiệu thụ thể asialoglycoprotein bề mặt gan (ASGPR).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "hoạt chất" được sử dụng thay thế cho thuật ngữ "thuốc có hoạt tính", cả hai đều đề cập đến phân tử có khả năng được phân phối bằng phân tử tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, hoạt chất là chất mà mong muốn phân phối nó đến tế bào gan. Các chất này được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm nhưng không giới hạn ở nucleotit chức năng, như oligonucleotit chức năng, đặc biệt là các chất được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến phân tử tiếp hợp có cấu trúc được thể hiện bằng công thức (321):



Công thức (321)

trong đó:

n1 là số nguyên nằm trong khoảng 1-3, và n3 là số nguyên nằm trong khoảng 0-4;

mỗi trong số m1, m2, và m3 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng 2-10; mỗi trong số R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} độc lập được chọn từ H, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} haloalkyl, và C_1-C_{10} alkoxy;

R_4 là gốc có khả năng liên kết với thuốc có hoạt tính hoặc hoạt chất qua liên kết cộng hóa trị;

mỗi L_1 là alkylen mạch thẳng dài từ 1 đến 70 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, $S(O)_2$, C_2-C_{10} alkenylen, C_2-C_{10} alkynylen, C_6-C_{10} arylen, C_3-C_{18} heteroxyclylen, và C_5-C_{10} heteroarylen, và trong đó L_1 tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ bao gồm: C_1-C_{10} alkyl, C_6-C_{10} aryl, C_5-C_{10} heteroaryl, C_1-C_{10} haloalkyl, -OC_1-C_{10} alkyl, -OC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-OH, -OC_1-C_{10} haloalkyl, -SC_1-C_{10} alkyl, -SC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-SH, -SC_1-C_{10} haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH_2, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2, -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -NH(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkylphenyl), -NH(C_1-C_{10} alkylphenyl), xyano, nitro, -CO_2H, -C(O)OC_1-C_{10} alkyl, -CON(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -CONH(C_1-C_{10} alkyl), -$CONH_2$, -NHC(O)(C_1-C_{10} alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C_1-C_{10} alkyl, -C(O)C_1-C_{10} alkylphenyl, -C(O)C_1-C_{10} haloalkyl, -OC(O)C_1-C_{10} alkyl, -SO_2(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2(phenyl), -SO_2(C_1-C_{10} haloalkyl), -SO_2NH_2, -SO_2NH(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2NH(phenyl), -NHSO_2(C_1-C_{10} alkyl), -NHSO_2(phenyl), và -NHSO_2(C_1-C_{10} haloalkyl);

mỗi S_1 độc lập là M_1, trong đó hydroxyl có hoạt tính bất kỳ, nếu có, được bảo vệ bằng nhóm bảo vệ hydroxyl;

mỗi M_1 độc lập được chọn từ phối tử có khả năng liên kết với thụ thể bề mặt tế bào.

Theo một số phương án, n1 có thể là số nguyên nằm trong khoảng 1-3, và n3 có thể là số nguyên nằm trong khoảng 0-4 để đảm bảo rằng có ít nhất 2 nhóm S_1 ở phân tử tiếp hợp. Theo một số phương án, n1+n3 $\geqslant$ 2, sao cho số phối tử M_1 ở thể tiếp hợp tạo ra bằng phân tử tiếp hợp có thể ít nhất là 3, nhờ đó cho phép phối tử M_1 liên kết với thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt tế bào gan một cách thuận lợi hơn, mà có thể tạo điều kiện cho việc nhập bào của thể tiếp hợp vào tế bào. Các thí nghiệm đã chỉ ra rằng khi số phối tử M_1 lớn hơn 3, thì tính khả thi của việc liên kết phối tử M_1 với thụ thể

asialoglycoprotein trên bề mặt tế bào gan không tăng đáng kể. Do đó, theo các khía cạnh khác nhau như tổng hợp thuận tiện, chi phí kết cấu/xử lý và hiệu quả phân phối, theo một số phương án, n1 là số nguyên nằm trong khoảng 1-2, n3 là số nguyên nằm trong khoảng 0-1, và n1+n3 = 2-3.

Theo một số phương án, khi mỗi trong số m1, m2, và m3 độc lập được chọn từ số nguyên nằm trong khoảng 2-10, thì tin rằng vị trí lập thể giữa nhiều phối tử M_1 trong thể tiếp hợp tạo ra bằng phân tử tiếp hợp có thể hợp để liên kết phối tử M_1 với thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt tế bào gan. Để khiến cho phân tử tiếp hợp được đề cập theo sáng chế đơn giản hơn, thuận tiện hơn trong việc tổng hợp và/hoặc giảm chi phí, theo một số phương án của sáng chế, mỗi trong số m1, m2 và m3 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng 2-5, theo một số phương án, m1 = m2 = m3.

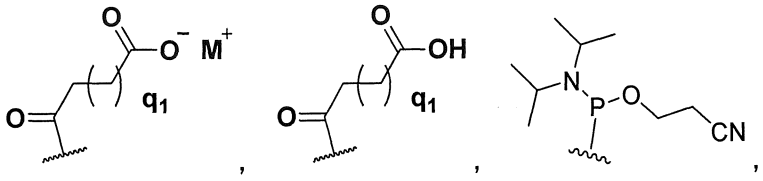
Có thể được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này là với mỗi trong số R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, và R_{15} độc lập được chọn từ H, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} haloalkyl, và C_1-C_{10} alkoxy, mục đích của sáng chế có thể đạt được mà không thay đổi các thuộc tính của phân tử tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, mỗi trong số R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, và R_{15} độc lập được chọn từ H, metyl và etyl. Theo một số phương án, tất cả R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, và R_{15} đều là H.

R_4 là gốc có khả năng liên kết với hoạt chất cần được phân phối bằng phân tử tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, R_4 là gốc có khả năng liên kết với oligonucleotit cần được phân phối bằng phân tử tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, R_4 là gốc có khả năng liên kết với oligonucleotit qua liên kết cộng hóa trị. Theo một số phương án, R_4 là gốc có khả năng liên kết với oligonucleotit qua liên kết phosphodieste. Theo một số phương án, R_4 được chọn để đạt được liên kết với nguyên tử N trên khung chính nitơ và tạo vị trí phản ứng thích hợp để tổng hợp thể tiếp hợp oligonucleotit. Trong ngữ cảnh của sáng chế, "khung chính nitơ" dùng để chỉ cấu trúc mạch trong đó nguyên tử cacbon mà R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, và R_{15} được gắn vào và nguyên tử N được liên kết với nhau. Theo một số phương án, R_4 là gốc mà có thể được gắn vào nguyên tử N trên khung chính nitơ theo cách thích hợp. Theo một số phương án, R_4 chứa vị trí liên kết với nguyên tử N trên khung chính nitơ và nhóm

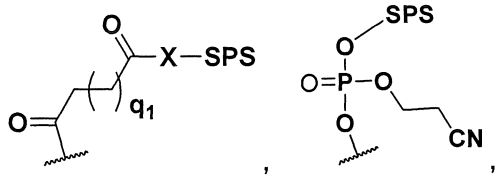
chức bất kỳ mà có thể được tiếp hợp với oligonucleotit qua liên kết phosphodieste bằng cách phản ứng.

Theo một số phương án, R_4 chứa nhóm chức thứ nhất mà có thể phản ứng với nhóm trên oligonucleotit hoặc nucleotit để tạo ra liên kết phosphat este, và nhóm chức thứ hai mà có thể tạo ra liên kết cộng hóa trị với nhóm hydroxy hoặc nhóm amino, hoặc giá đỡ pha rắn được liên kết qua liên kết cộng hóa trị. Theo một số phương án, nhóm chức thứ nhất là phosphoramidit, hydroxy hoặc hydroxyl được bảo vệ. Theo một số phương án, nhóm chức thứ hai là phosphoramidit, carboxyl hoặc muối carboxylat. Theo một số phương án, nhóm chức thứ hai là giá đỡ pha rắn được gắn vào phần còn lại của phân tử qua liên kết cộng hóa trị được tạo ra với nhóm hydroxy hoặc nhóm amino. Theo một số phương án, giá đỡ pha rắn được liên kết qua liên kết phosphoeste, liên kết carboxyl este, hoặc liên kết amido. Theo một số phương án, giá đỡ pha rắn là nhựa.

Theo một số phương án, nhóm chức thứ nhất bao gồm hydroxy, $-OR_k$ hoặc nhóm được thể hiện bằng công thức (C3); và/hoặc nhóm chức thứ hai bao gồm nhóm được thể hiện bằng công thức (C1), (C2), (C3), (C1'), hoặc (C3'):



(C1) (C2) (C3)



(C1') (C3')

trong đó q_1 là số nguyên nằm trong khoảng 1-4, X là O hoặc NH, M^+ là cation, R_k là nhóm bảo vệ hydroxy, SPS là giá đỡ pha rắn, và ∿∿∿ là vị trí mà nhóm được gắn theo cách cộng hóa trị.

Theo một số phương án, nhóm chức thứ nhất bao gồm nhóm phosphoramidit, như nhóm được thể hiện bằng công thức (C3). Nhóm phosphoramidit có thể ghép đôi

với hydroxy ở vị trí bất kỳ trên nucleotit, như 2'- hoặc 3'- hydroxy, và tạo ra liên kết phosphodieste bằng cách oxy hóa, để phân tử tiếp hợp tiếp hợp với oligonucleotit. Vì vậy ngay cả khi nhóm chức thứ hai không tồn tại, phân tử tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này sẽ có thể được tiếp hợp với nucleotit. Trong trường hợp này, phân tử tiếp hợp phù hợp để phản ứng với hydroxy trên nucleotit cuối của trình tự nucleotit, và tạo thành liên kết phosphodieste bằng cách oxy hóa sau đó, nhờ đó phân tử tiếp hợp theo sáng chế tiếp hợp với oligonucleotit.

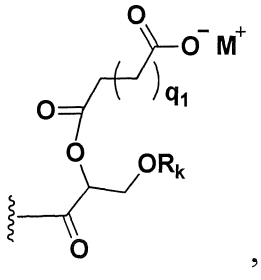
Theo một số phương án, nhóm chức thứ nhất bao gồm nhóm hydroxy được bảo vệ. Theo một số phương án, nhóm chức thứ hai bao gồm nhóm phản ứng với giá đỡ pha rắn để tạo ra phân tử tiếp hợp chứa giá đỡ pha rắn. Theo một số phương án, nhóm chức thứ hai bao gồm carboxyl, carboxylat hoặc phosphoramidit, như nhóm chức được thể hiện bằng công thức (C1), (C2) hoặc (C3). Carboxyl hoặc carboxylat có thể phản ứng qua este hóa hoặc amit hóa với nhóm hydroxy hoặc amino trên giá đỡ pha rắn, như nhựa, để tạo ra phân tử tiếp hợp chứa giá đỡ pha rắn được liên kết qua liên kết carboxylat este hoặc liên kết amido. Phosphoramidit có thể ghép đôi với nhóm hydroxy trên giá đỡ pha rắn đa năng, như nhựa, và tạo ra phân tử tiếp hợp chứa giá đỡ pha rắn được liên kết qua liên kết phosphodieste bằng cách oxy hóa sau đó. Theo đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này bằng phân tử tiếp hợp. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước đầu tiên là liên kết phân tử tiếp hợp với giá đỡ pha rắn bằng phản ứng ngưng tụ hoặc ghép đôi, và sau đó thêm monome nucleosit vào theo phương pháp tổng hợp phosphoramidit pha rắn, nhờ đó tạo ra thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này chứa phân tử tiếp hợp theo sáng chế được tiếp hợp với oligonucleotit. Theo một số phương án, trong quá trình tổng hợp phosphoramidit pha rắn, nhóm chức thứ nhất được giải bảo vệ, sau đó ghép đôi với nhóm phosphoramidit trên nucleosit trong điều kiện ghép đôi.

Theo một số phương án, R^4 chứa nhóm chức thứ nhất và nhóm chức thứ hai, trong đó nhóm chức thứ nhất bao gồm nhóm hydroxy hoặc hydroxy được bảo vệ, và nhóm chức thứ hai bao gồm liên kết carboxylat este, liên kết amido hoặc liên kết phosphodieste, hoặc giá đỡ pha rắn được liên kết qua liên kết carboxylat este, liên kết amido hoặc liên kết phosphodieste. Theo một số phương án, nhóm chức thứ hai là gốc được thể hiện

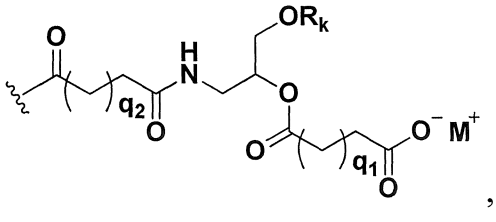
bằng công thức (C1') hoặc (C3'). Theo một số phương án, khi nhóm chức thứ hai chứa giá đỡ pha rắn, thì phân tử tiếp hợp chứa giá đỡ pha rắn đó hữu ích để điều chế thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này bằng phân tử tiếp hợp. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước cho phân tử tiếp hợp chứa giá đỡ pha rắn phản ứng với monome nucleosit theo phương pháp tổng hợp phosphoramidit pha rắn, nhờ đó tạo ra phân tử tiếp hợp theo sáng chế được tiếp hợp với oligonucleotit. Theo một số phương án, phân tử tiếp hợp chứa giá đỡ pha rắn có thể được điều chế nội bộ từ phân tử tiếp hợp với carboxyl, carboxylat hoặc phosphoramidit bằng cách cho phân tử tiếp hợp này phản ứng với giá đỡ pha rắn. Theo một số phương án, phân tử tiếp hợp này có thể được cung cấp bởi nhà cung cấp.

Theo một số phương án, carboxylat có thể được thể hiện bằng $–COO^-M^+$, trong đó M^+ là cation như cation kim loại, cation amoni NH_4^+ hoặc cation amoni hữu cơ. Theo một số phương án, cation kim loại có thể là cation kim loại kiềm, như K^+ hoặc Na^+. Để tăng độ hòa tan và tạo điều kiện cho phản ứng, theo một số phương án, cation amoni hữu cơ là cation amoni được tạo ra bởi cation amin bậc ba hoặc amoni bậc bốn, như cation amoni được tạo ra bằng trietylamin hoặc N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, carboxylat là trietylamin carboxylat hoặc N,N-diisopropyletylamin carboxylat.

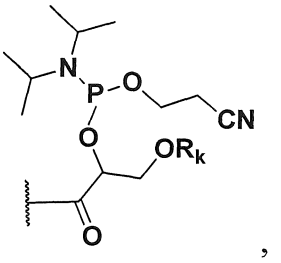
Theo một số phương án của sáng chế, R_4 là nhóm được thể hiện bằng công thức (B9), (B10), (B9'), (B10'), (B11), (B12), (B11') hoặc (B12'):



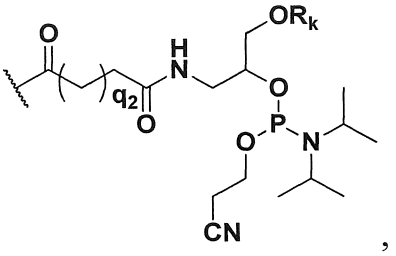
(B9)



(B10)

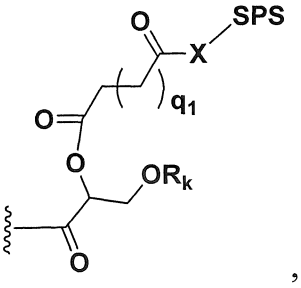


,

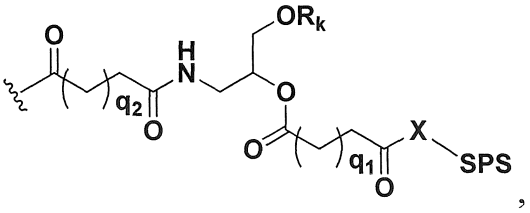


,

(B9') (B10')

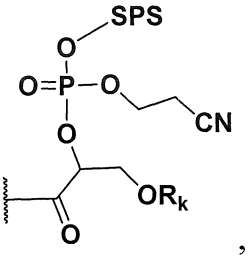


,

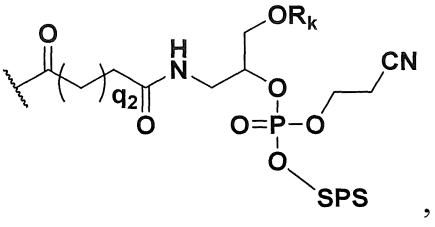


,

(B11) (B12)



,



,

(B11') (B12')

trong đó q_1 là số nguyên nằm trong khoảng 1-4, q_2 là số nguyên nằm trong khoảng 1-10, X là O hoặc NH, M^+ là cation, R_k là nhóm bảo vệ hydroxy, SPS là giá đỡ pha rắn, và ~~~ là vị trí ở đó nhóm được gắn theo cách cộng hóa trị. Theo một số phương án, q_1 là 1 hoặc 2. Theo một số phương án, q_2 là số nguyên nằm trong khoảng 1-5. Theo một số phương án, R_4 chứa nhóm được thể hiện bằng công thức (B9) hoặc (B10). Theo một số phương án, R_4 chứa nhóm được thể hiện bằng công thức (B11) hoặc (B12).

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

L_1 là alkylen mạch thẳng dài từ 1 đến 70 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, $S(O)_2$, C_2-C_{10} alkenylen, C_2-C_{10} alkynylen, C_6-C_{10} arylen, C_3-C_{18} heteroxyclylen, và C_5-C_{10} heteroarylen, và trong đó L_1 tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ bao gồm: C_1-C_{10} alkyl, C_6-C_{10} aryl, C_5-C_{10} heteroaryl, C_1-C_{10} haloalkyl, -OC_1-C_{10} alkyl, -OC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-OH, -OC_1-C_{10} haloalkyl, -SC_1-C_{10} alkyl, -SC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-SH, -SC_1-C_{10} haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH_2, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2, -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -NH(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkylphenyl), -NH(C_1-C_{10} alkylphenyl), xyano, nitro, -CO_2H, -C(O)OC_1-C_{10} alkyl, -CON(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -CONH(C_1-C_{10} alkyl), -$CONH_2$, -NHC(O)(C_1-C_{10} alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C_1-C_{10} alkyl, -C(O)C_1-C_{10} alkylphenyl, -C(O)C_1-C_{10} haloalkyl, -OC(O)C_1-C_{10} alkyl, -SO_2(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2(phenyl), -SO_2(C_1-C_{10} haloalkyl), -SO_2NH_2, -SO_2NH(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2NH(phenyl), -NHSO_2(C_1-C_{10} alkyl), -NHSO_2(phenyl), và -NHSO_2(C_1-C_{10} haloalkyl). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng, dù L_1 được định nghĩa là alkylen mạch thẳng để thuận tiện, nhưng nó có thể không phải là nhóm mạch thẳng hoặc được đặt tên khác đi, như amin hoặc alkenyl như là kết quả của sự thay thế và/hoặc thế ở trên. Đối với mục đích của sáng chế trong bản mô tả này, độ dài của L_1 là số nguyên tử trong mạch nối hai điểm gắn. Đối với mục đích này, vòng thu được từ việc thay thế nguyên tử cacbon của alkylen mạch thẳng, như heteroxyclylen hoặc heteroarylen, được tính là một nguyên tử.

Theo một số phương án, L_1 được sử dụng để liên kết phối tử M_1 (hoặc nhóm S_1 tương ứng) với nguyên tử N trên khung chính nitơ, nhờ đó đem đến chức năng nhắm đích gan cho thể tiếp hợp theo sáng chế. Theo một số phương án, L_1 chứa công thức bất kỳ trong số các công thức A1-A26, và tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một số phương án, L_1 là bất kỳ trong số A1, A4, A5, A6, A8, A10, A11, A13, và tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, L_1 là tổ hợp của ít nhất hai trong số A1, A4, A8, A10, và A11; Theo một số phương án, L_1 là tổ hợp của ít nhất hai nhóm trong số A1, A8, và A10.

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

Theo một số phương án theo sáng chế, do đó, j1 là số nguyên nằm trong khoảng 2-10, và theo một số phương án là số nguyên nằm trong khoảng 3-5; j2 là số nguyên nằm trong khoảng 2-10, và theo một số phương án là số nguyên nằm trong khoảng 3-5; R' là C_1-C_4 alkyl, và theo một số phương án là một trong số metyl, etyl, và isopropyl. Ra là một trong số A27, A28, A29, A30, và A31, và theo một số phương án là A27 hoặc A28; Rb là C_1-C_5 alkyl, và theo một số phương án là một trong số metyl, etyl, isopropyl, và butyl. Theo một số phương án, j1, j2, R', Ra, và Rb của A1-A26 lần lượt được chọn để đạt được liên kết giữa phối tử M_1 và nguyên tử N trên khung chính nitơ trong thể tiếp hợp oligonucleotit tạo ra bằng phân tử tiếp hợp, và giúp cho vị trí lập thể giữa các phối tử M_1 thích hợp hơn để liên kết phối tử M_1 với thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt của tế bào gan.

Mỗi M_1 độc lập được chọn từ phối tử có khả năng liên kết với thụ thể bề mặt tế bào. Theo một số phương án, ít nhất một M_1 là phối tử có khả năng liên kết với thụ thể bề mặt tế bào gan. Theo một số phương án, ít nhất một M_1 là phối tử có khả năng liên kết với thụ thể bề mặt tế bào động vật có vú. Theo một số phương án, ít nhất một M_1 là phối tử có khả năng liên kết với thụ thể bề mặt tế bào gan người. Theo một số phương án, ít nhất một M_1 là phối tử có khả năng liên kết với thụ thể asialoglycoprotein bề mặt gan (ASGPR).

Theo một số phương án, M_1 có thể là phối tử bất kỳ trong số các phối tử có ái lực với thụ thể asialoglycoprotein (ASGP-R) trên bề mặt của tế bào gan động vật có vú. Các loại phối tử này đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, ít nhất một M_1 là sacarit. Theo một số phương án, mỗi M_1 là sacarit. Theo một số phương án, ít nhất một M_1 là monosacarit, disacarit, trisacarit hoặc polysacarit. Theo một số phương án, mỗi M_1 là monosacarit, disacarit, trisacarit hoặc polysacarit. Theo một số phương án, ít nhất một M_1 là sacarit được cải biến. Theo một số phương án, mỗi M_1 là sacarit được cải biến. Theo một số phương án, mỗi M_1 độc

lập được chọn từ polysacarit, polysacarit được cải biến, monosacarit hoặc dẫn xuất monosacarit. Theo một số phương án, mỗi hoặc ít nhất một M_1 có thể độc lập được chọn từ nhóm bao gồm glucoza và dẫn xuất của nó, mannoza và dẫn xuất của nó, galactoza và dẫn xuất của nó, xyloza và dẫn xuất của nó, riboza và dẫn xuất của nó, fucoza và dẫn xuất của nó, lactoza và dẫn xuất của nó, maltoza và dẫn xuất của nó, arabinoza và dẫn xuất của nó, fructoza và dẫn xuất của nó, và axit sialic.

Theo một số phương án, mỗi hoặc ít nhất một M_1 có thể độc lập được chọn từ nhóm bao gồm D-mannopyranoza, L-mannopyranoza, D-arabinoza, D-xylofuranoza, L-xylofuranoza, D-glucoza, L-glucoza, D-galactoza, L-galactoza, α-D-mannofuranoza, β-D-mannofuranoza, α-D-mannopyranoza, β-D-mannopyranoza, α-D-glucopyranoza, β-D-glucopyranoza, α-D-glucofuranoza, β-D-glucofuranoza, α-D-fructofuranoza, α-D-fructopyranoza, α-D-galactopyranoza, β-D-galactopyranoza, α-D-galactofuranoza, β-D-galactofuranoza, glucosamin, axit sialic, galactosamin, N-axetylgalactosamin, N-trifloaxetylgalactosamin, N-propionylgalactosamin, N-n-butyrylgalactosamin, N-isobutyrylgalactosamin, 2-amino-3-O-[(R)-1-carboxyetyl]-2-deoxy-β-D-glucopyranoza, 2-deoxy-2-metylamino-L-glucopyranoza, 4,6-dideoxy-4-formamido-2,3-di-O-metyl-D-mannopyranoza, 2-deoxy-2-sulfoamino-D-glucopyranoza, axit N-glycolyl-α-neuraminic, 5-thio-β-D-glucopyranoza, metyl 2,3,4-tris-O-axetyl-1-thio-6-O-trityl-α-D-glucopyranosit, 4-thio-β-D-galactopyranoza, etyl 3,4,6,7-tetra-O-axetyl-2-deoxy-1,5-dithio-α-D-glucoheptopyranosit, 2,5-anhydro-D-allononitril, riboza, D-riboza, D-4-thioriboza, L-riboza, L-4-thioriboza. Theo một số phương án, ít nhất một M_1 là N-axetylgalactosamin (GalNAc). Theo một số phương án, mỗi M_1 là N-axetylgalactosamin (GalNAc). Sự chọn lọc phối tử có thể được tìm thấy, ví dụ, theo bản mô tả của CN105378082A, được kết hợp trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

CN105378082A bộc lộ hợp chất chứa oligonucleotit được cải biến và nhóm tiếp hợp, trong đó nhóm tiếp hợp chứa ít nhất một nhóm liên kết phốt pho hoặc nhóm liên kết trung tính, cũng như một hoặc nhiều phối tử. Mỗi phối tử được chọn từ nhóm bao gồm polysacarit, polysacarit được cải biến, mannoza, galactoza, dẫn xuất mannoza, dẫn xuất galactoza, D-mannopyranoza, L-mannopyranoza, D-arabinoza, D-xylofuranoza, L-

xylofuranoza, D-glucoza, L-glucoza, D-galactoza, L-galactoza, α-D-mannofuranoza, β-D-mannofuranoza, α-D-mannopyranoza, β-D-mannopyranoza, α-D-glucopyranoza, β-D-glucopyranoza, α-D-glucofuranoza, β-D-glucofuranoza, α-D-fructofuranoza, α-D-fructopyranoza, α-D-galactopyranoza, β-D-galactopyranoza, α-D-galactofuranoza, β-D-galactofuranoza, glucosamin, axit sialic, α-D-galactosamin, N-axetylgalactosamin, 2-amino-3-O-[(R)-1-carboxyetyl]-2-deoxy-β-D-glucopyranoza, 2-deoxy-2-metylamino-L-glucopyranoza, 4,6-dideoxy-4-formamido- 2,3-di-O-metyl-D-mannopyranoza, 2-deoxy-2-sulfoamino-D-glucopyranoza, axit N-glycolyl-α-neuraminic, 5-thio-β-D-glucopyranoza, metyl 2,3,4-tris-O-axetyl-1-thio-6-O-trityl-α-D-glucopyranosit, 4-thio-β-D-galactopyranoza, etyl 3,4,6,7-tetra-O-axetyl-2-deoxy-1,5-dithio-α-D-glucoheptopyranosit, 2,5-anhydro-D-allononitril, riboza, D-riboza, D-4-thioriboza, L-riboza và L-4-thioriboza. Được cho rằng hợp chất này có thể làm giảm số lượng hoặc hoạt tính phiên mã axit nucleic trong tế bào.

WO2016077321A1 bộc lộ một số siARN nhắm đích đặc hiệu gen HBV và phương pháp phân phối nó, và độ ổn định huyết thanh của siARN được tăng cường bằng cách biến đổi nucleotit của nó. Tài liệu này cũng bộc lộ thể tiếp hợp siARN, và đặc biệt là bộc lộ cả một số thể tiếp hợp siARN.

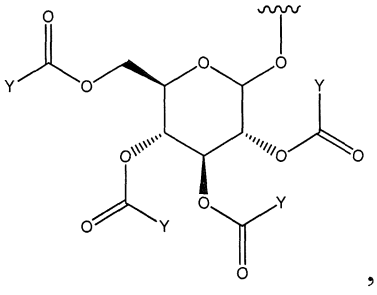
WO2016168286A1 bộc lộ một số siARN nhắm đích đặc hiệu gen ANGPTL3 và phương pháp phân phối nó, và độ ổn định huyết thanh của siARN được tăng cường bằng cách biến đổi nucleotit của nó. Tài liệu này cũng bộc lộ thể tiếp hợp siARN.

N-axetylgalactosamin (GalNAc) là phối tử liên kết với thụ thể asialoglycoprotein bề mặt gan (ASGPR). ASGPR là thụ thể nội tiết được biểu hiện đặc hiệu bởi tế bào gan. Gần đây, N-axetylgalactosamin (GalNAc) đã được sử dụng như phân tử nhắm đích để phân phối thuốc ARN nhỏ đến gan. Ví dụ, Alnylam Pharmaceuticals, Inc. đầu tiên báo cáo rằng siARN dựa trên công nghệ tiếp hợp GalNAc tạo ra hoạt tính can thiệp ở chuột nhắt (Nair et al., J. Am. Chem. Soc., 2014, 136, 16958-16961). Bài báo đó báo cáo rằng siARN tiếp hợp với ba cụm GalNAc có hoạt tính phân phối tốt cả *in vitro* và *in vivo*. Qua thí nghiệm *in vivo* trên chuột nhắt được tiêm dưới da, ED_{50} của một liều được xác định là 1 mg/kg khi một liều tiêm là ít hơn 1 ml. Trong thử nghiệm sử dụng lâu dài, hoạt

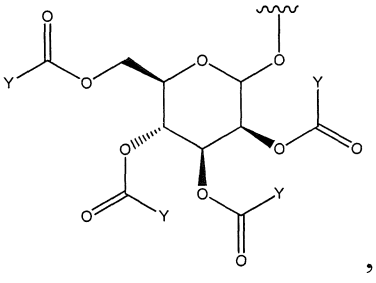
tính can thiệp ổn định trong tối đa 9 tháng được cho là có thể đạt được bằng cách tiêm dưới da mỗi tuần một lần.

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

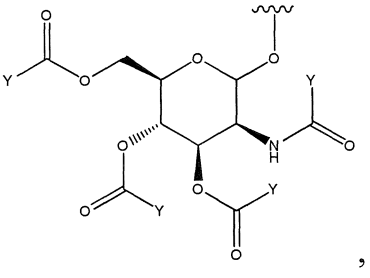
Theo một số phương án, mỗi S_1 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm các công thức A46-A54:



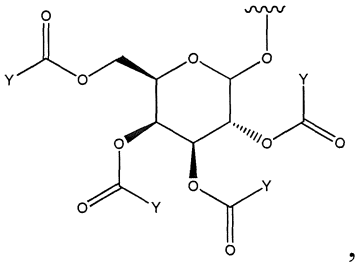
(A46)



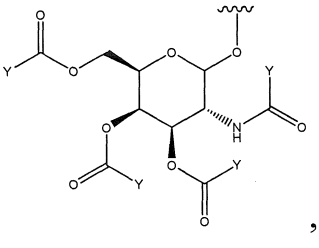
(A47)



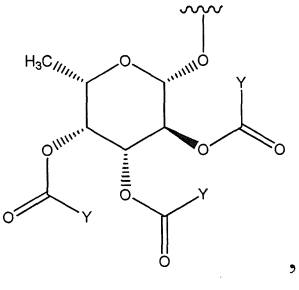
(A48)



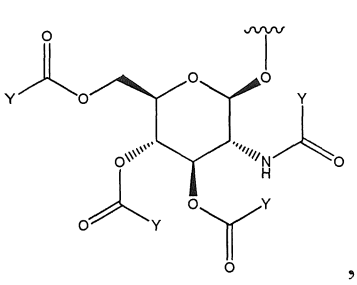
(A49)



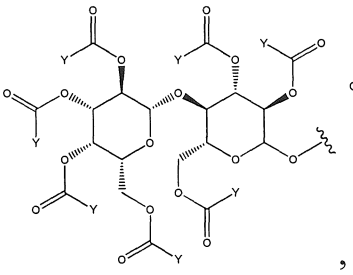
(A50)



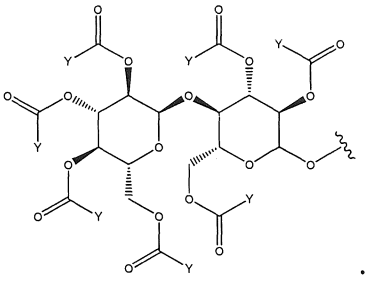
(A51)



(A52)



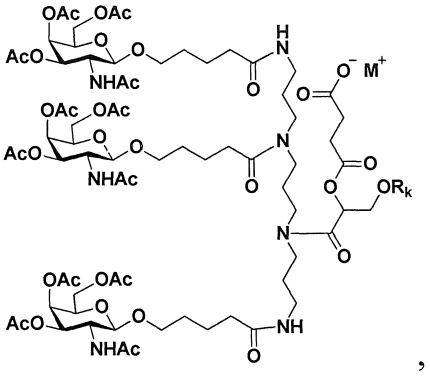
(A53)



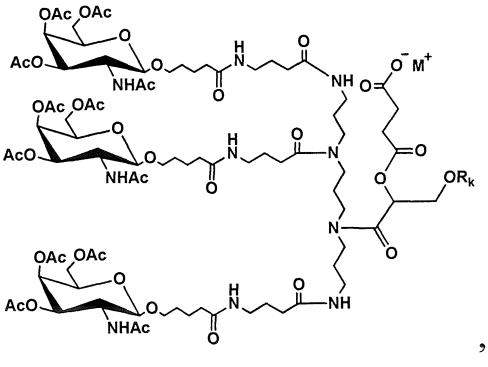
(A54)

Theo một số phương án, S_1 là A49 hoặc A50. Theo một số phương án, Y độc lập trong mỗi lần xuất hiện là một trong số metyl, triflometyl, diflometyl, monoflometyl, triclometyl, diclometyl, monoclometyl, etyl, n-propyl, isopropyl, phenyl, halophenyl, và alkylphenyl. Để đơn giản hóa phân tử tiếp hợp theo sáng chế, theo một số phương án, Y là metyl.

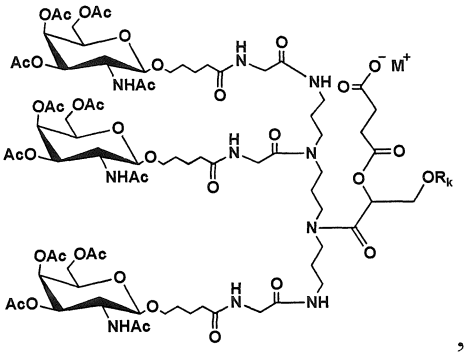
Theo một số phương án, phân tử tiếp hợp theo sáng chế có cấu trúc được thể hiện bằng các công thức (403), (404), (405), (406), (407), (408), (409), (410), (411), (412), (413), (414), (415), (416), (417), (418), (419), (420), (421), hoặc (422):



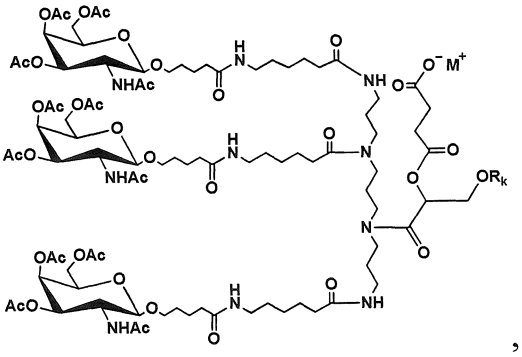
(403)



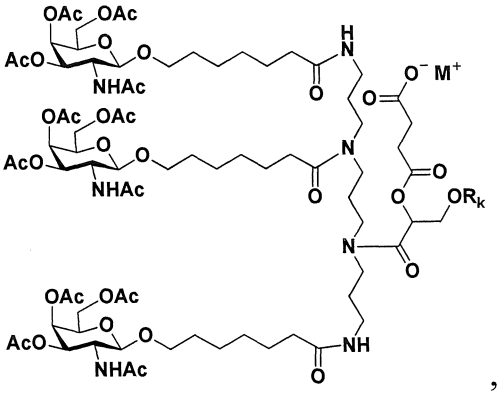
(404)



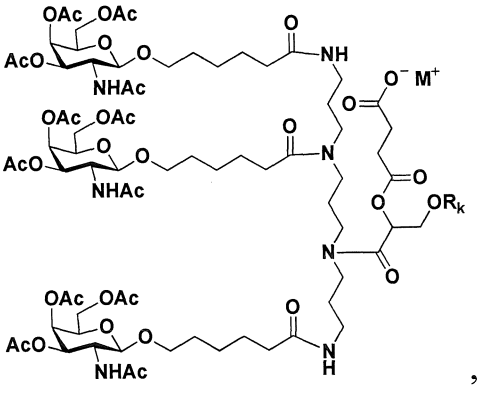
(405)



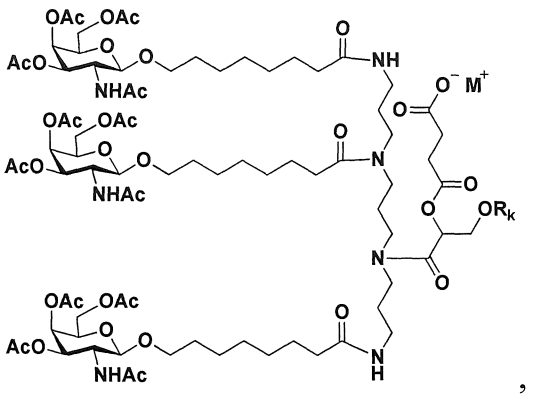
(406)



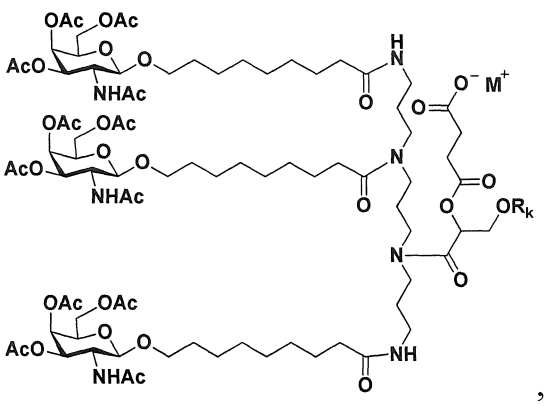
(407)



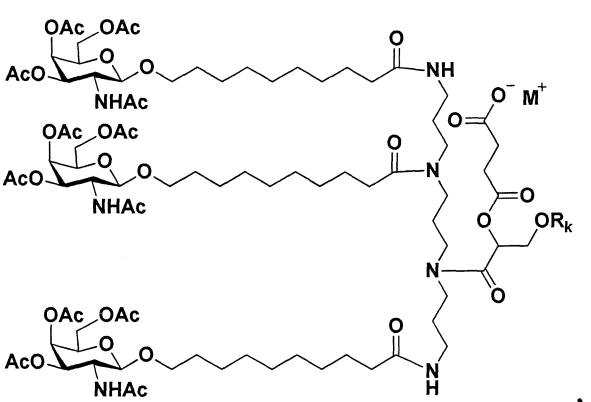
(408)



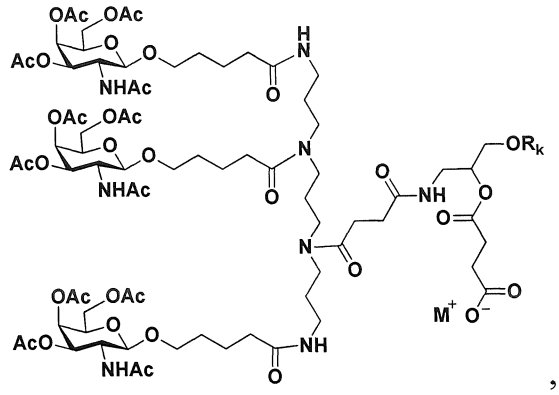
(409)



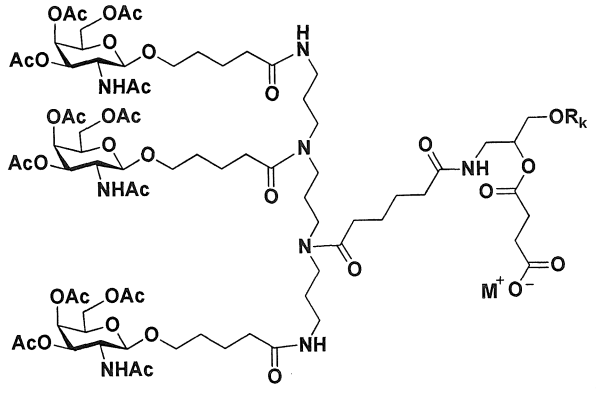
(410)



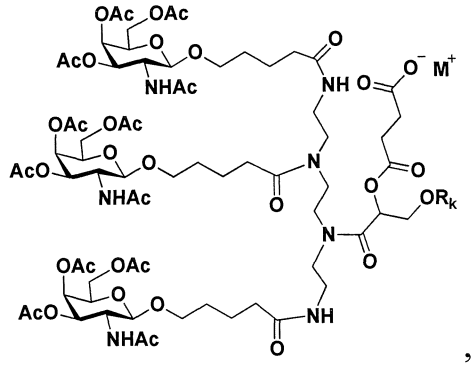
(411)



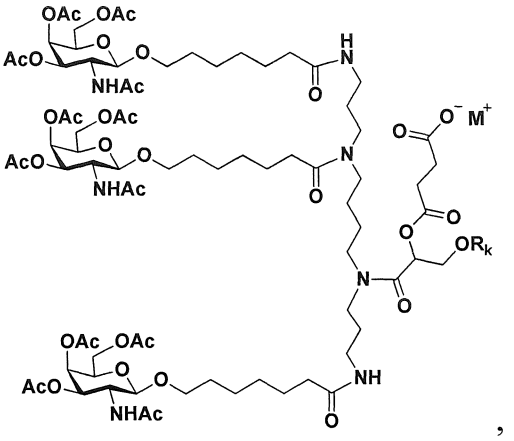
(412)



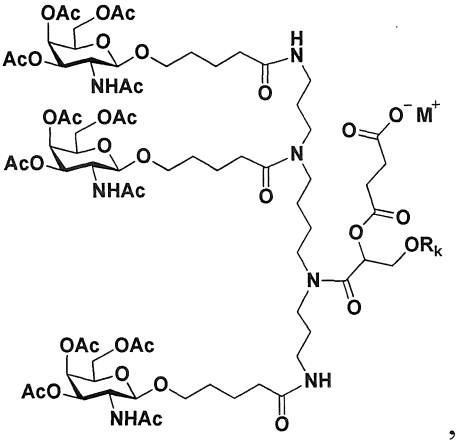
(413)



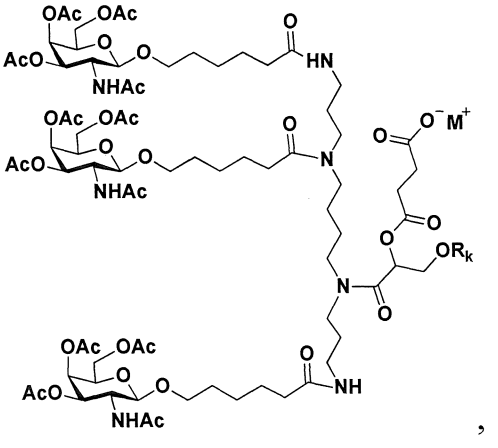
(414)



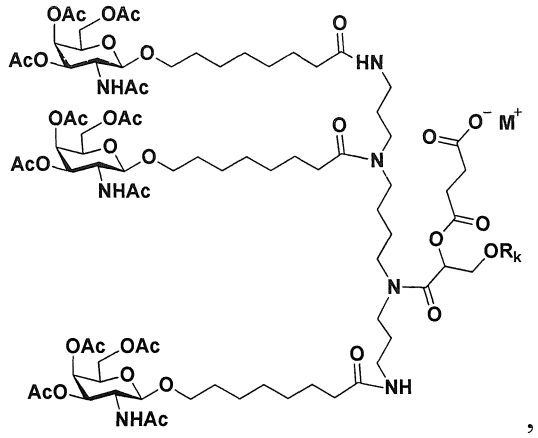
(415)



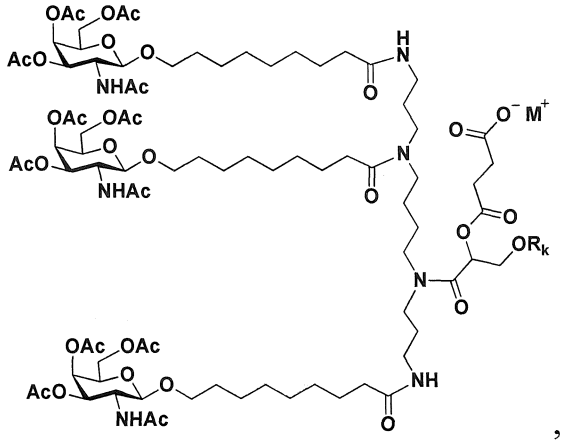
(416)



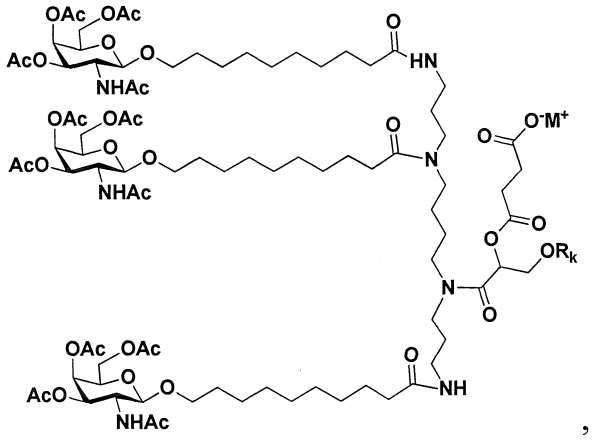
(417)



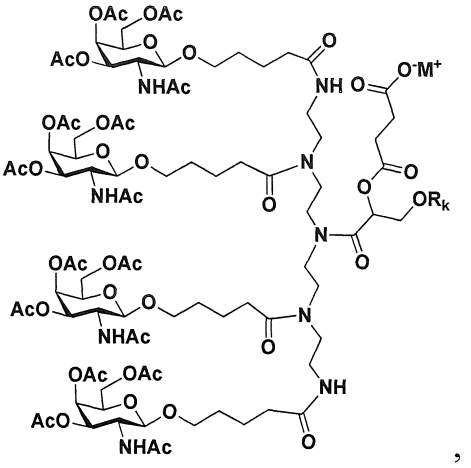
(418)



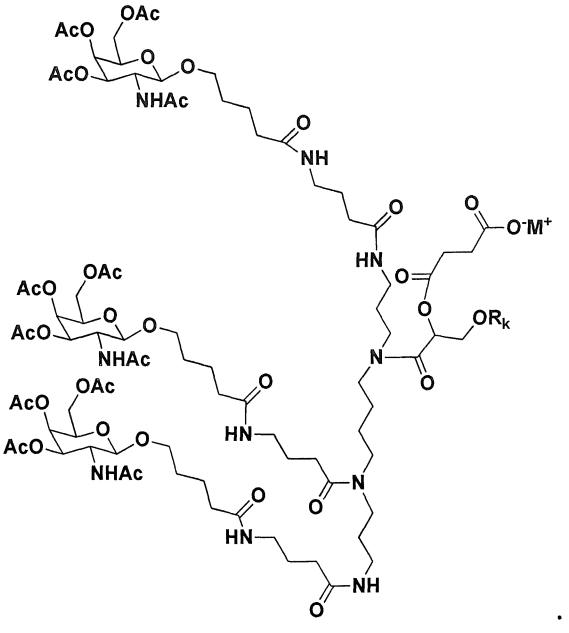
(419)



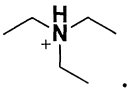
(420)



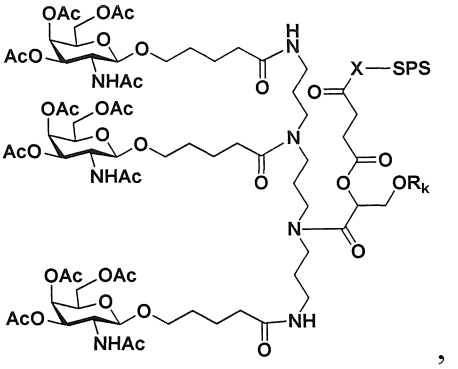
(421)



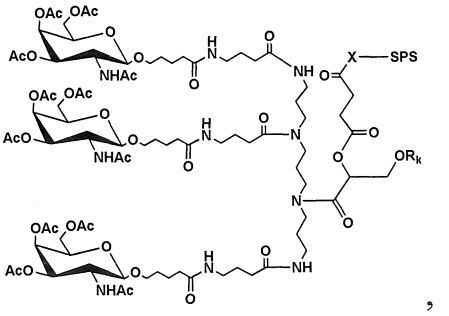
(422)

Trong các công thức từ (403) đến (422) ở trên, X là O hoặc NH, R_k là nhóm bảo vệ hydroxy, và M^+ là cation kim loại, cation amoni, cation được tạo ra từ amin bậc ba, hoặc cation amoni bậc bốn. Theo một số phương án, M^+ là  .

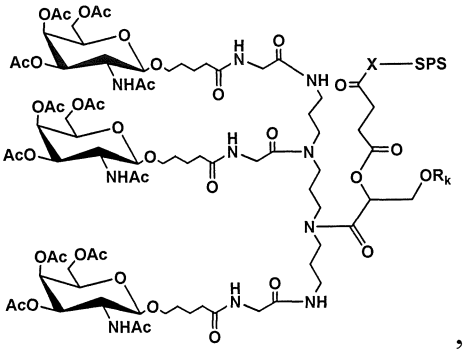
Theo một số phương án, phân tử tiếp hợp theo sáng chế có cấu trúc được thể hiện bằng các công thức (423), (424), (425), (426), (427), (428), (429), (430), (431), (432), (433), (434), (435), (436), (437), (438), (439), (440), (441), hoặc (442):



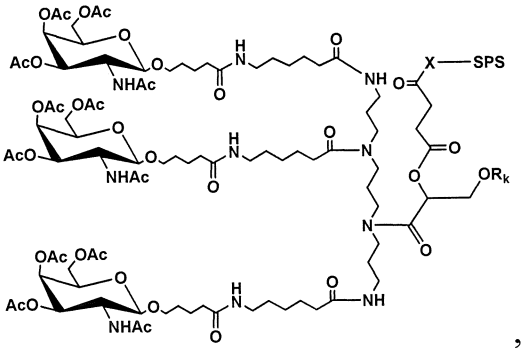
(423)



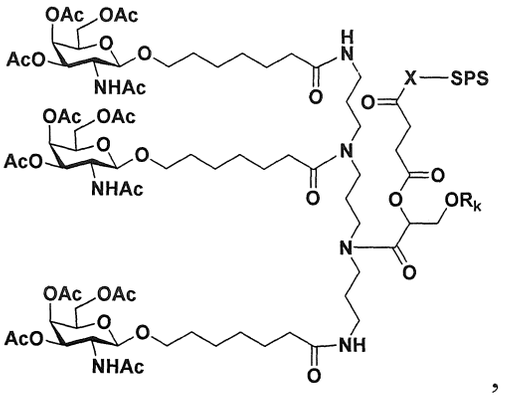
(424)



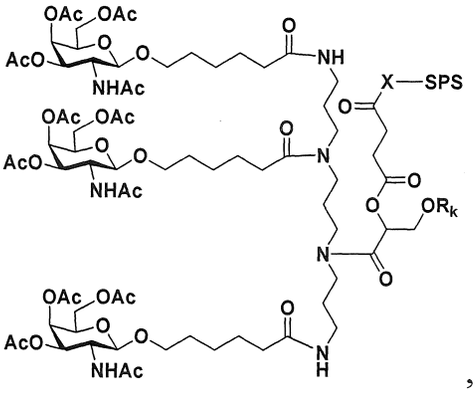
(425)



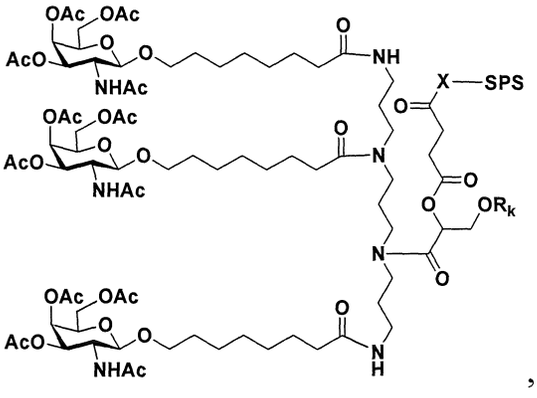
(426)



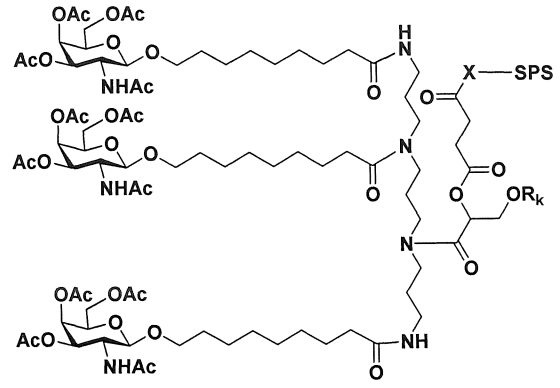
(427)



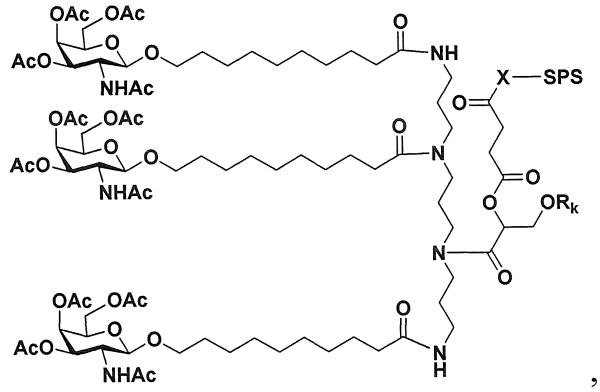
(428)



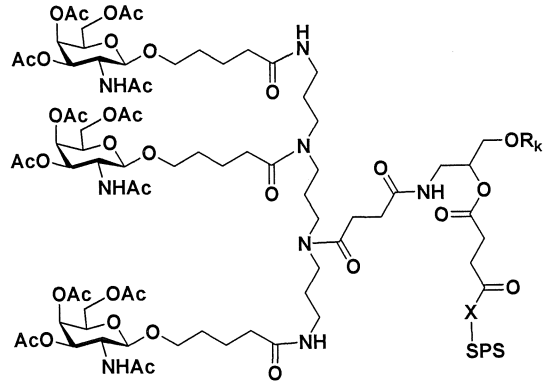
(429)



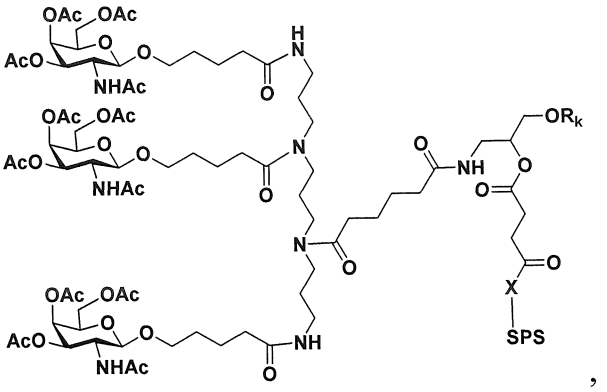
(430)



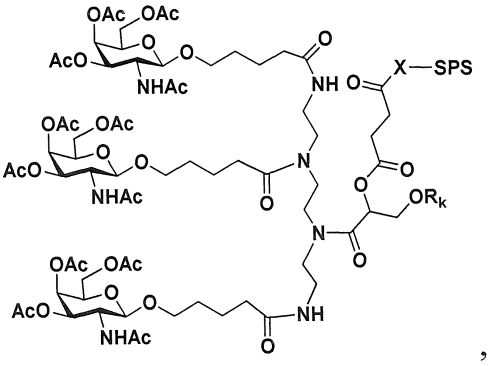
(431)



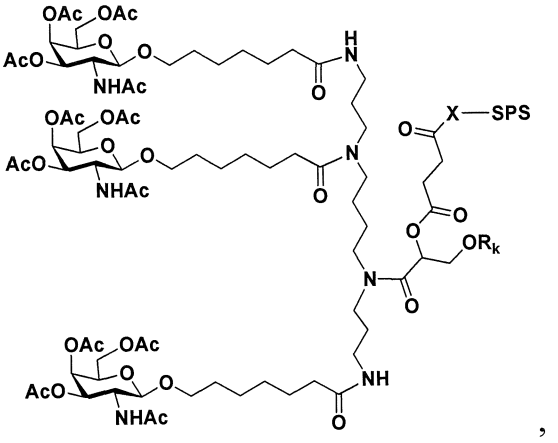
(432)



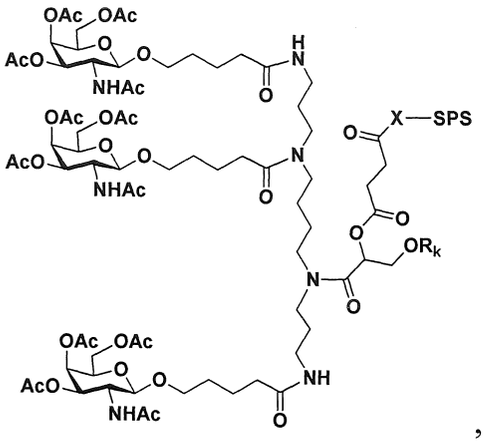
(433)



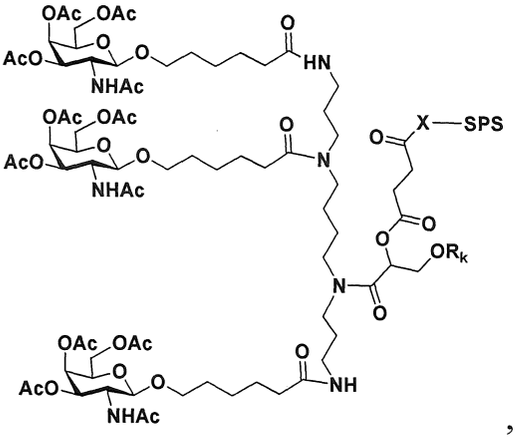
(434)



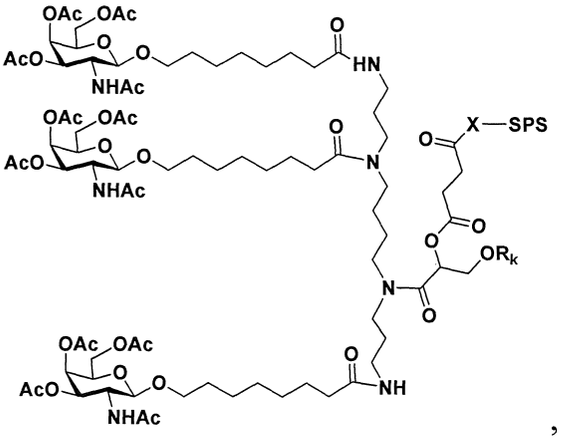
(435)



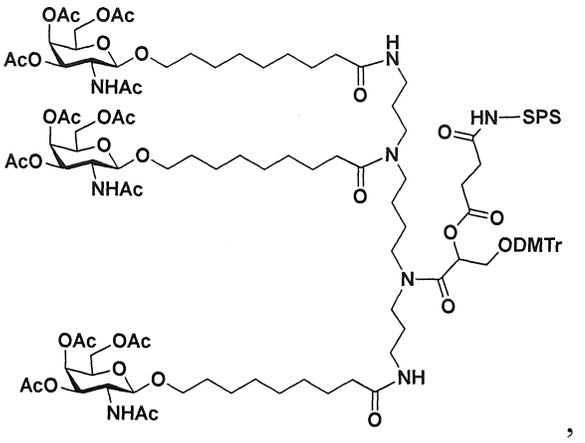
(436)



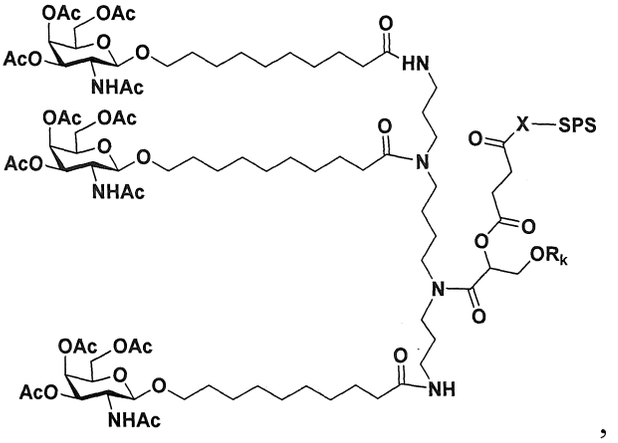
(437)



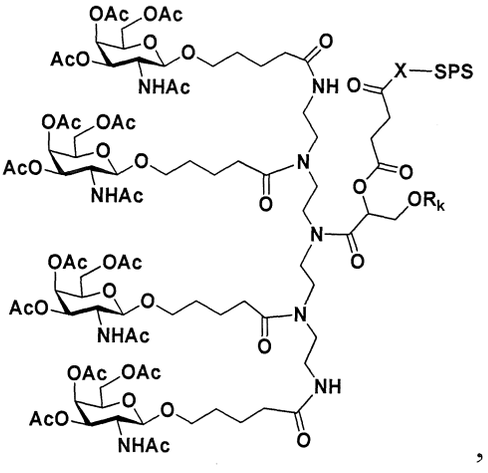
(438)


OAc OAc
AcO
O
NHAc
H
N
O
HN—SPS
ODMTr
NH

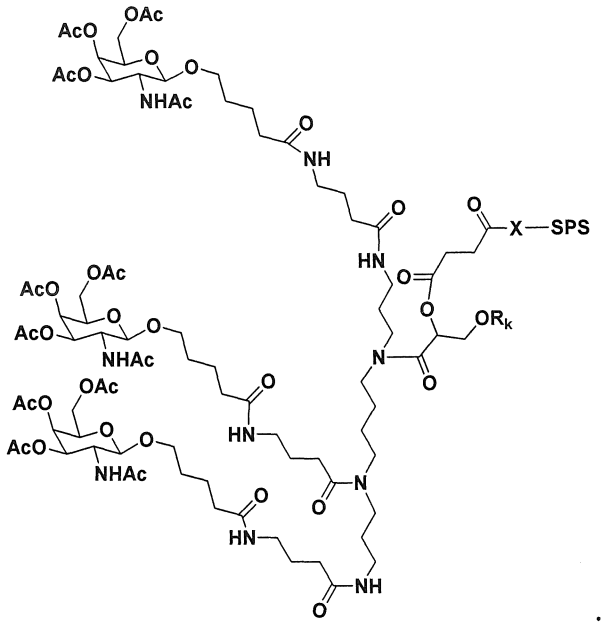
(439)


OAc OAc
AcO
O
NHAc
HN
X—SPS
ORk
NH

(440)


OAc OAc
AcO
O
NHAc
NH
X—SPS
ORk

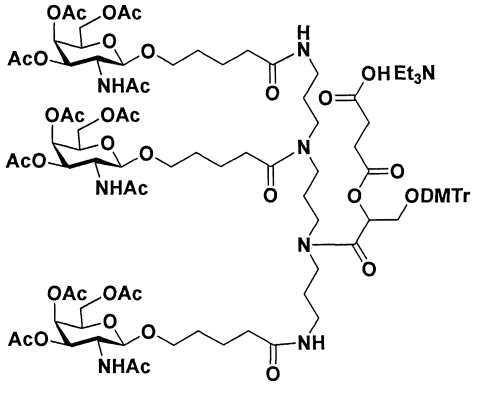
(441)



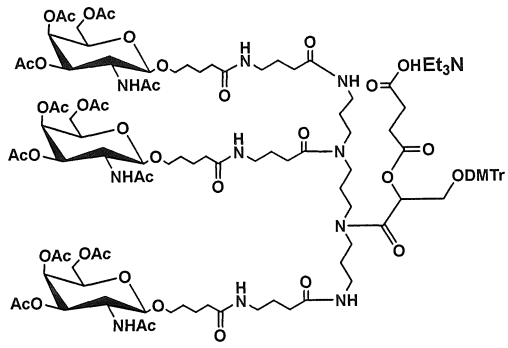
(442)

Trong các công thức từ (423) đến (442) ở trên, X là O hoặc NH, R_k là nhóm bảo vệ hydroxy, và SPS là giá đỡ pha rắn.

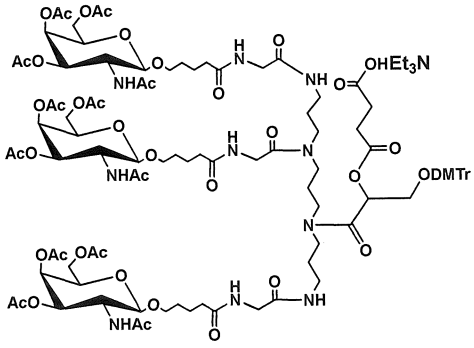
Theo một số phương án, phân tử tiếp hợp theo sáng chế có cấu trúc được thể hiện bằng các công thức (503), (504), (505), (506), (507), (508), (509), (510), (511), (512), (513), (514), (515), (516), (517), (518), (519), (520), (521), hoặc (522):



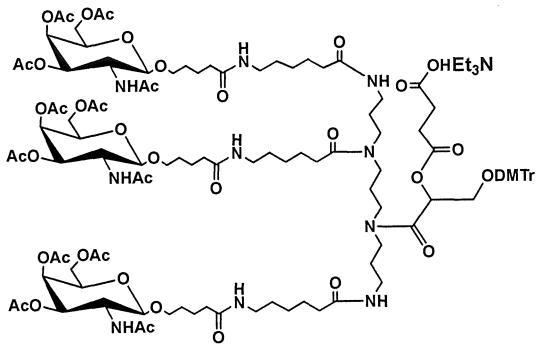
(503)



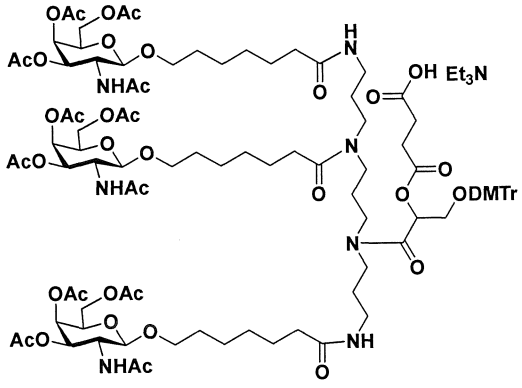
(504)



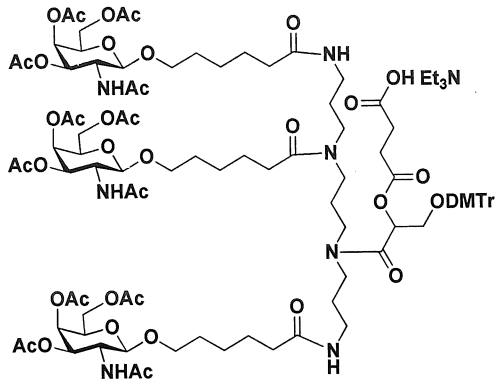
(505)



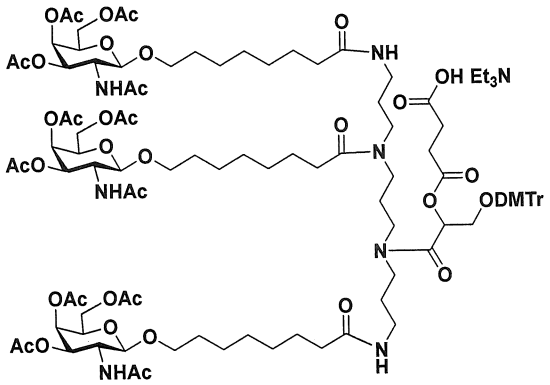
(506)



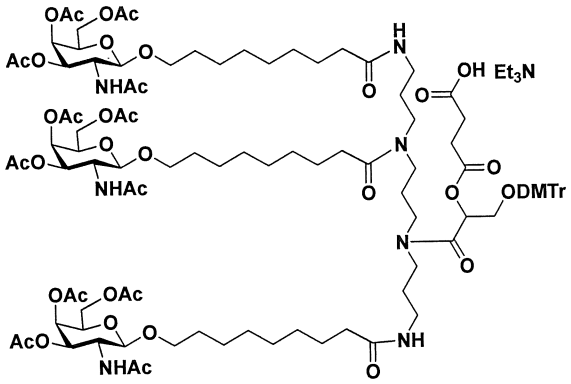
(507)


OAc OAc
AcO
NHAc
NH
OH Et3N
ODMTr

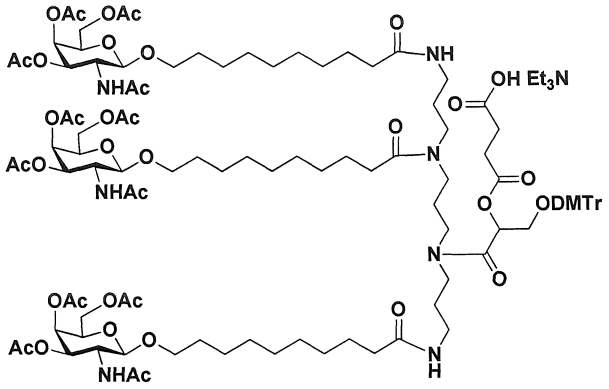
(508)


OAc OAc
AcO
NHAc
NH
OH Et3N
ODMTr

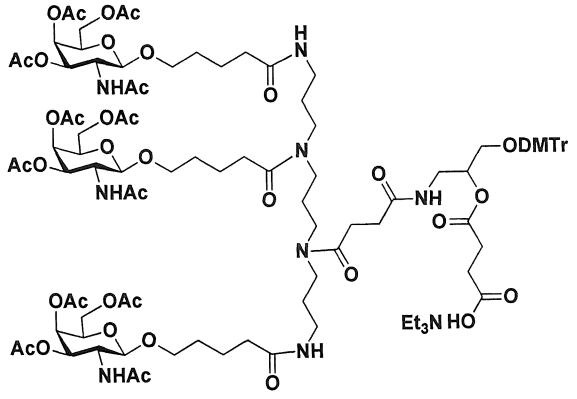
(509)


OAc OAc
AcO
NHAc
NH
OH Et3N
ODMTr

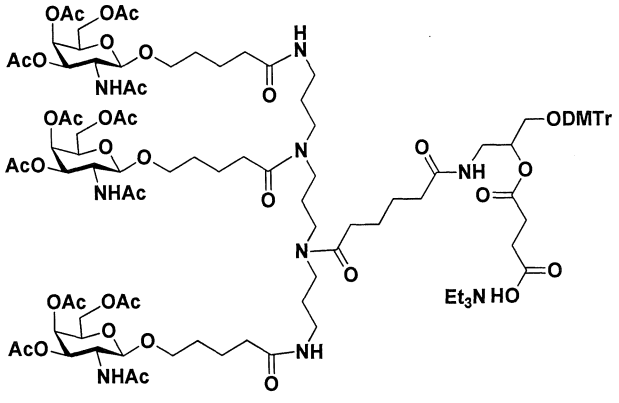
(510)



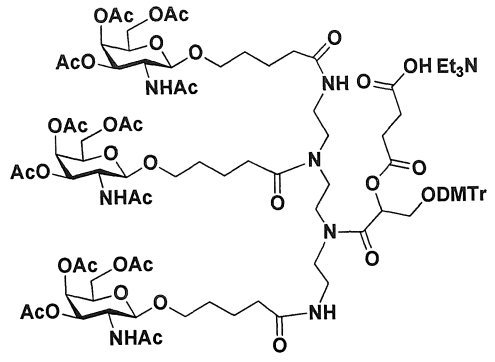
(511)



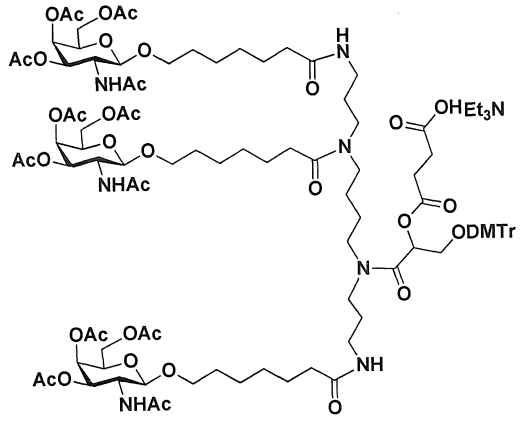
(512)



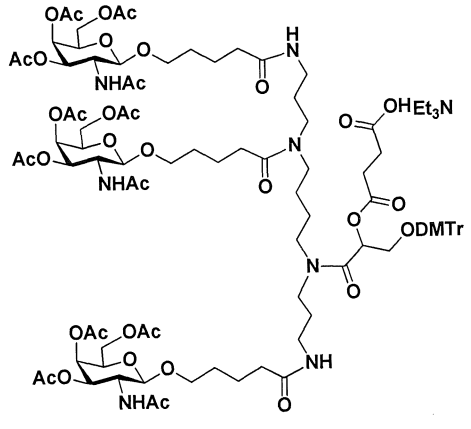
(513)



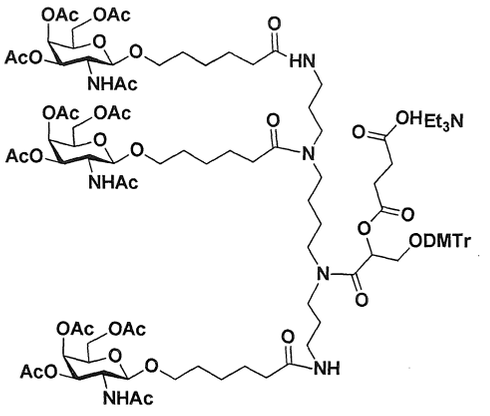
(514)



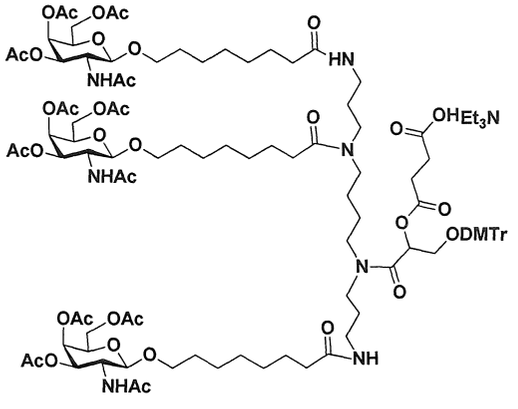
(515)



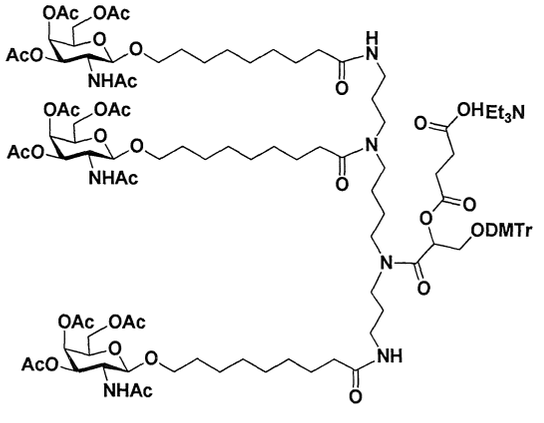
(516)



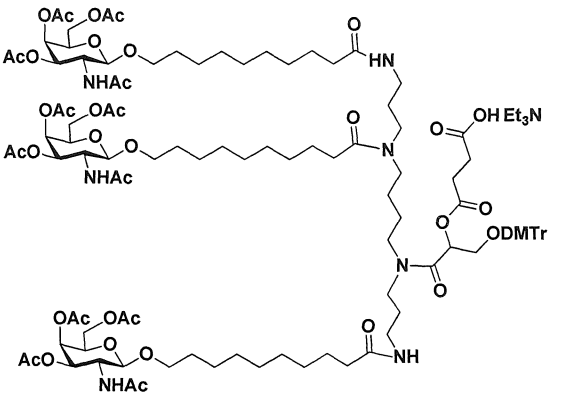
(517)



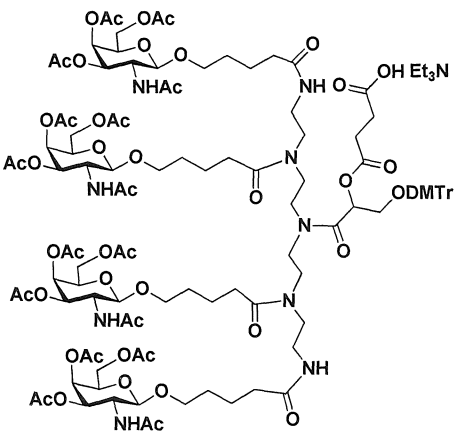
(518)



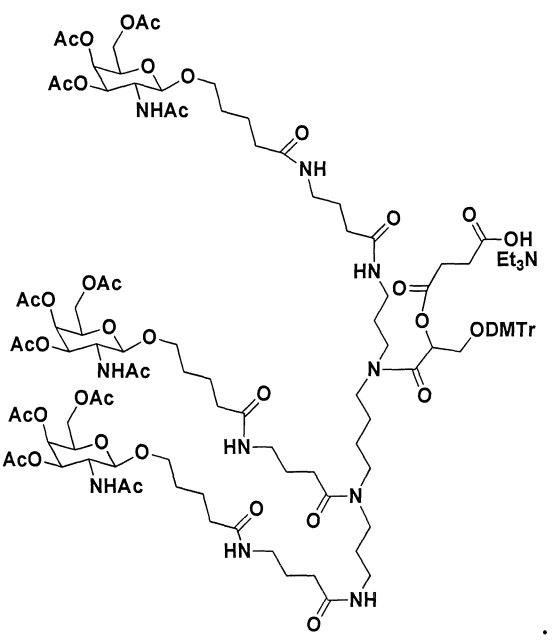
(519)



(520)

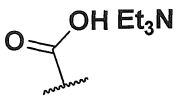


(521)



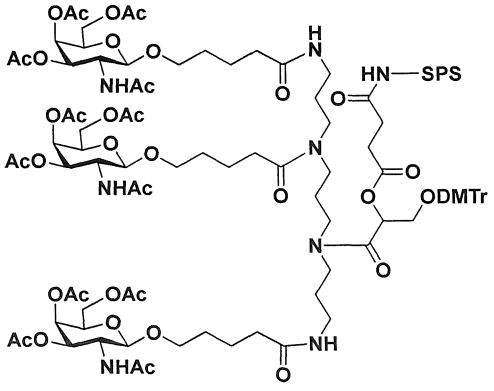
(522)

Trong các công thức (503)-(522) ở trên, DMTr là 4,4'-dimetoxytrityl. Cấu trúc

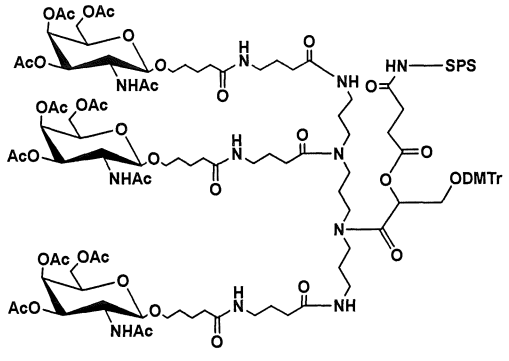


là muối được tạo ra bằng axit carboxylic tương ứng và trietylamin.

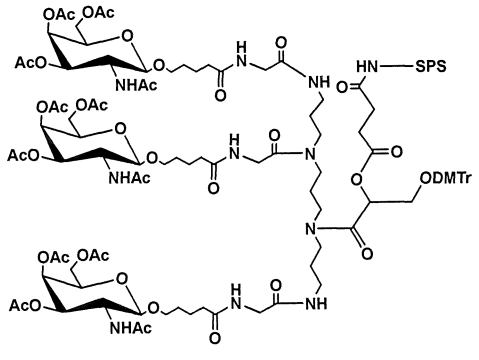
Theo một số phương án, phân tử tiếp hợp theo sáng chế có cấu trúc được thể hiện bằng các công thức (523), (524), (525), (526), (527), (528), (529), (530), (531), (532), (533), (534), (535), (536), (537), (538), (539), (540), (541), hoặc (542):



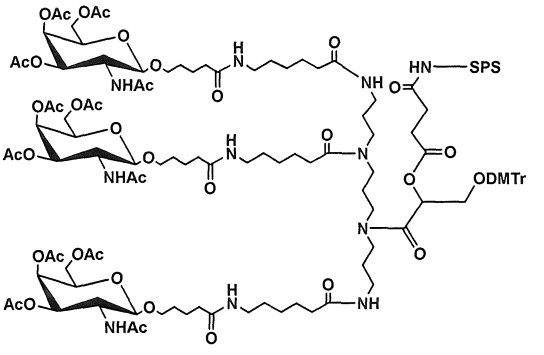
(523)



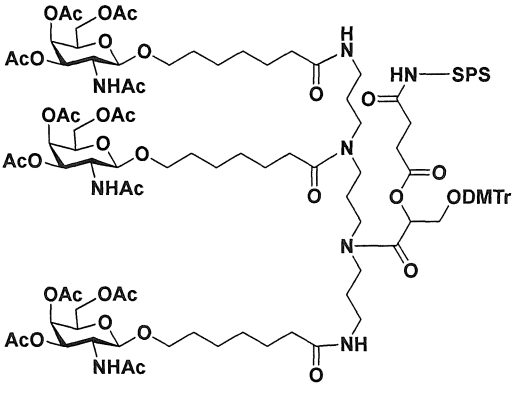
(524)



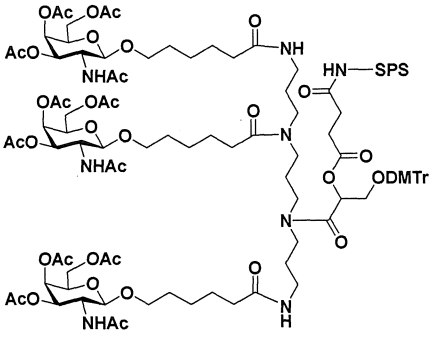
(525)



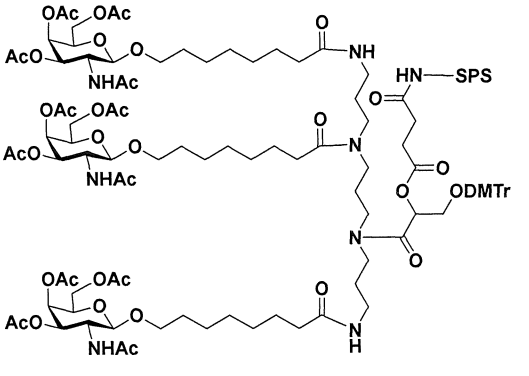
(526)



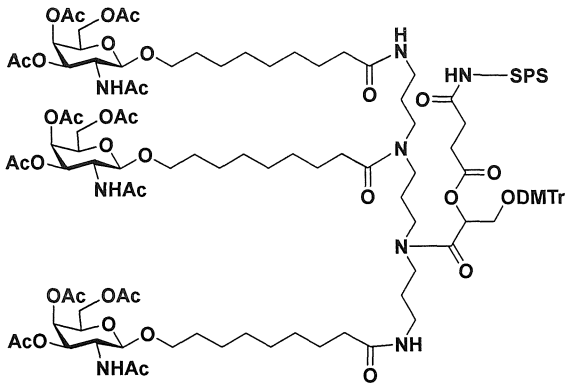
(527)



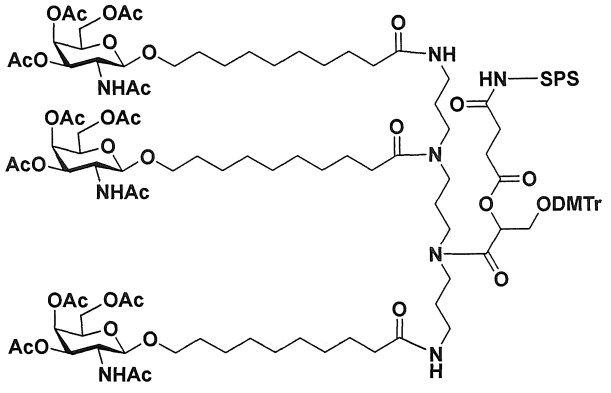
(528)



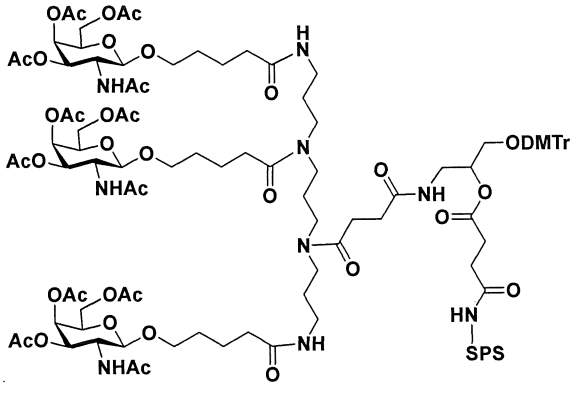
(529)


OAc OAc
AcO
O
NHAc
H
N
HN—SPS
ODMTr
NH

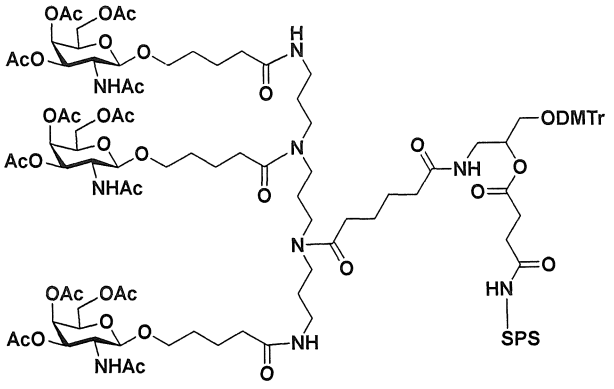
(530)


OAc OAc
AcO
O
NHAc
NH
HN—SPS
ODMTr
N

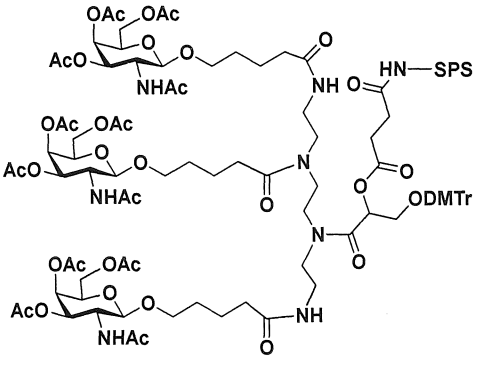
(531)


OAc OAc
AcO
O
NHAc
H
N
ODMTr
NH
HN
SPS

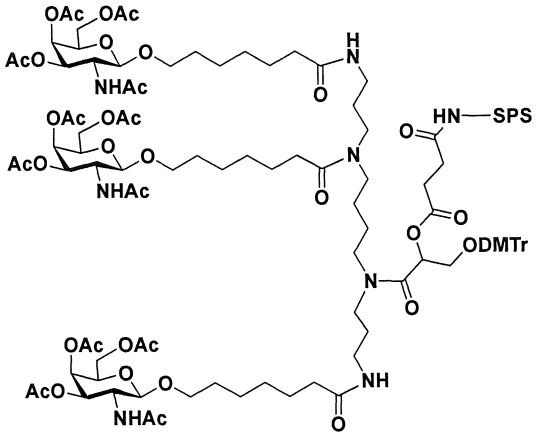
(532)



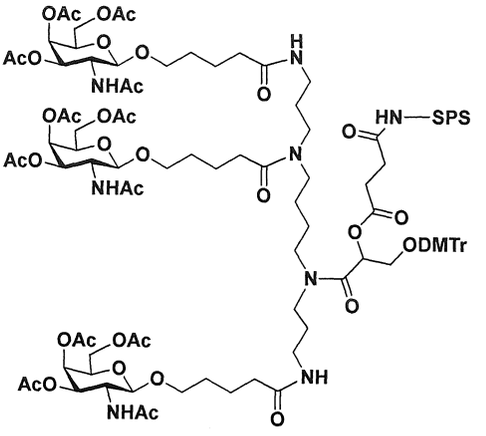
(533)



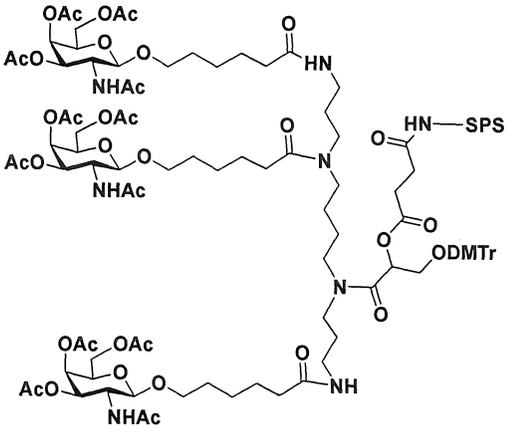
(534)



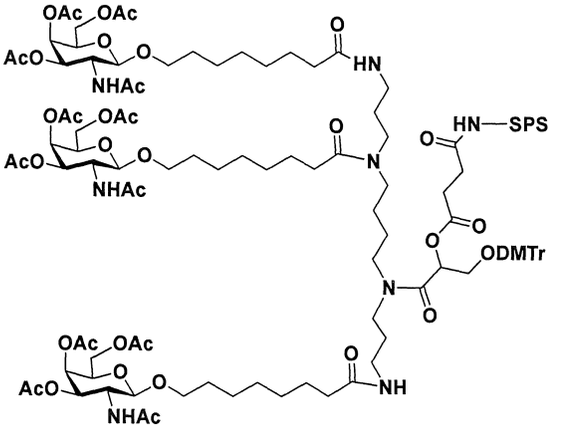
(535)


OAc OAc
AcO
NHAc
HN—SPS
ODMTr
NH

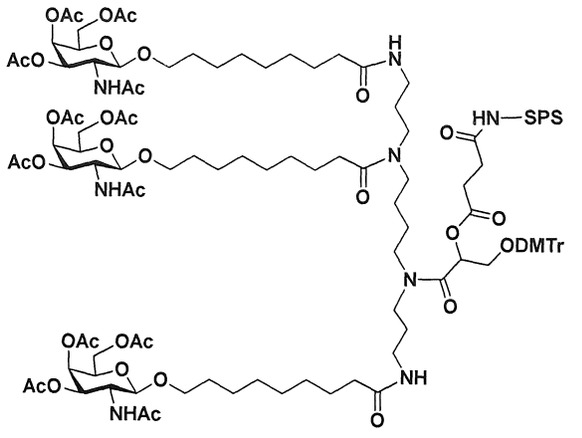
(536)


OAc OAc
AcO
NHAc
HN—SPS
ODMTr
NH

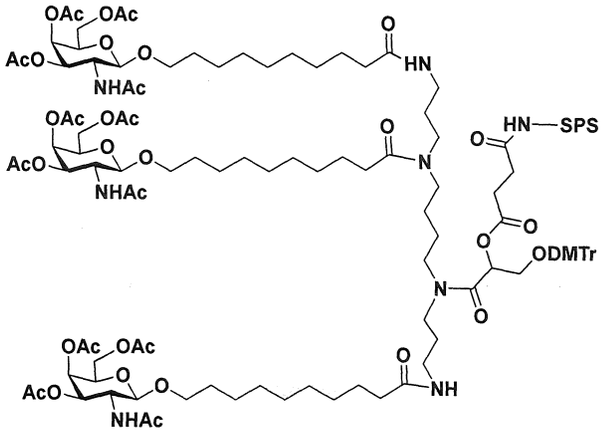
(537)


OAc OAc
AcO
NHAc
HN—SPS
ODMTr
NH

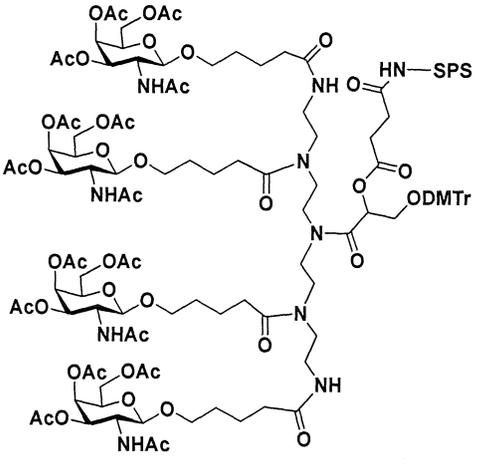
(538)


OAc OAc
AcO
O
NHAc
H
N
O
HN—SPS
ODMTr
NH

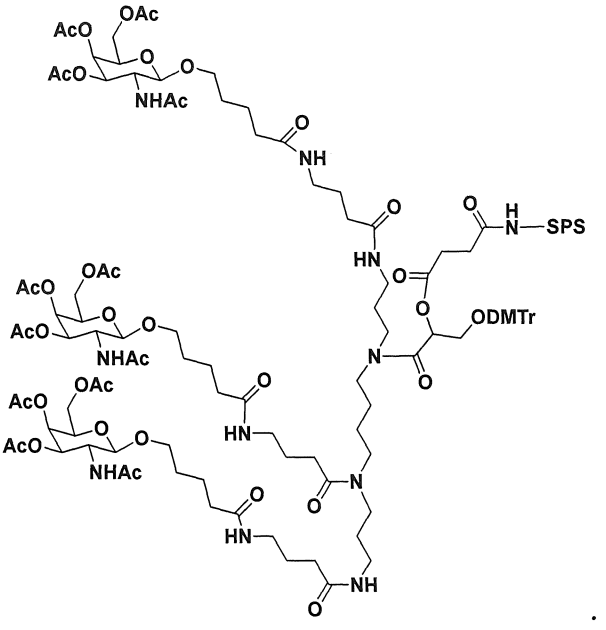
(539)


OAc OAc
AcO
O
NHAc
HN
HN—SPS
ODMTr
NH

(540)


OAc OAc
AcO
O
NHAc
NH
HN—SPS
ODMTr

(541)



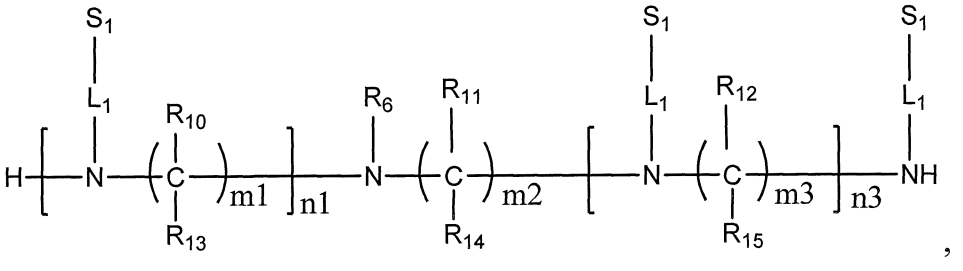
(542)

Trong các công thức từ (523) đến (542) ở trên, SPS là giá đỡ pha rắn, và DMTr dùng để chỉ 4,4'-dimetoxytrityl.

Điều chế phân tử tiếp hợp theo sáng chế

Phân tử tiếp hợp theo sáng chế có thể được điều chế thông qua đường tổng hợp thích hợp bất kỳ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

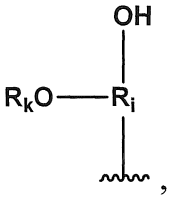
Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp điều chế phân tử tiếp hợp được thể hiện bằng công thức (321) bao gồm bước cho hợp chất được thể hiện bằng công thức (313) tiếp xúc với anhydrit dạng vòng trong điều kiện phản ứng este hóa khi có mặt bazơ và chất xúc tác este hóa trong dung môi hữu cơ; trao đổi ion và phân lập hợp chất được thể hiện bằng công thức (321):



Công thức (313)

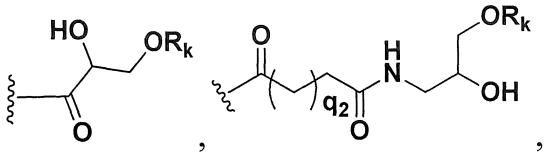
trong đó:

R_6 là nhóm để tạo R_4 của công thức (321). Theo một số phương án, ví dụ, R_6 có cấu trúc được thể hiện bằng công thức (A61):



(A61)

định nghĩa và các tùy chọn của n1, n3, m1, m2, m3, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, L_1, S_1 lần lượt là như được mô tả ở trên; R_i là nhóm có khả năng liên kết với nguyên tử N trên khung chính nitơ, R_kO và nhóm hydroxy tự do; R_k là nhóm bảo vệ hydroxy. Trong trường hợp này, thu được hợp chất được thể hiện bằng công thức (321), trong đó R_4 chứa nhóm bảo vệ hydroxy làm nhóm chức thứ nhất và nhóm được thể hiện bằng công thức (C1) hoặc (C2) làm nhóm chức thứ hai. Theo một số phương án, R_6 là B7 hoặc B8:



(B7) (B8)

trong đó q_2 và R_k lần lượt là như được định nghĩa ở trên.

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

Theo một số phương án, dung môi hữu cơ chứa một hoặc nhiều loại trong số dung môi epoxy, dung môi ete, dung môi haloalkan, dimetyl sulfoxit, N,N-dimetylformamit, và N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, dung môi epoxy là dioxan và/hoặc tetrahydrofuran. Theo một số phương án, dung môi ete là dietyl ete và/hoặc metyl tert-butyl ete. Theo một số phương án, dung môi haloalkan là một hoặc nhiều loại trong số diclometan, triclometan và 1,2-dicloetan. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là

diclometan. Lượng dung môi hữu cơ là 3-50 L/mol, và theo một số phương án, 5-20 L/mol đối với hợp chất được thể hiện bằng công thức (313).

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

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

Theo một số phương án, bazơ có thể là bazơ vô cơ, bazơ hữu cơ hoặc hỗn hợp của chúng. Về độ hòa tan cũng như độ ổn định sản phẩm, bazơ là amin bậc ba. Theo một số phương án, amin bậc ba là trietylamin hoặc N,N-diisopropyletylamin. Tỷ lệ mol của amin bậc ba với hợp chất được thể hiện bằng công thức (313) nằm trong khoảng từ 1:1 đến 20:1, và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 3:1 đến 10:1.

Sự trao đổi ion nhằm để chuyển đổi hợp chất được thể hiện bằng công thức (321) thành dạng mong muốn của axit carboxylic hoặc muối của nó. Với phương pháp trao đổi ion, phân tử tiếp hợp với cation M^+ có thể thu được bằng cách sử dụng dung dịch trao đổi ion và điều kiện trao đổi ion thích hợp, đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, dung dịch trietylamin phosphat được sử dụng để trao đổi ion. Theo một số phương án, nồng độ của dung dịch trietylamin phosphat nằm trong khoảng 0,2-0,8 M. Theo một số phương án, nồng độ của dung dịch trietylamin phosphat nằm trong khoảng 0,4-0,6 M. Theo một số phương án, lượng dung dịch trietylamin phosphat nằm trong khoảng 3-6 L/mol, và theo phương án khác là 4-5 L/mol đối với hợp chất được thể hiện bằng công thức (313).

Hợp chất được thể hiện bằng công thức (321) có thể được phân lập từ hỗn hợp phản ứng sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ. Theo một số phương án, hợp chất được thể hiện bằng công thức (321) có thể được phân lập bằng cách loại bỏ dung môi thông

qua bay hơi sau đó là sắc ký, ví dụ, sử dụng điều kiện sắc ký sau đây để phân lập: (1) tinh chế pha thường: chất độn silicagel 200-300 mesh, với gradien rửa giải của diclometan chứa trietylamin 1‰ khối lượng:metanol = 100:18-100:20; hoặc (2) tinh chế pha ngược: C18 và chất độn pha ngược C8, với gradien rửa giải của metanol:axetonitril = 0,1:1-1:0,1. Theo một số phương án, dung môi có thể được loại bỏ trực tiếp để thu được sản phẩm thô của hợp chất được thể hiện bằng công thức (321), có thể được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo.

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

Giá đỡ pha rắn là một trong các giá đỡ được sử dụng trong tổng hợp pha rắn siARN, một vài trong số đó đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, giá đỡ pha rắn có thể được chọn từ giá đỡ có nhóm chức hydroxy hoặc amino có hoạt tính. Theo một số phương án, giá đỡ pha rắn là nhựa amino hoặc nhựa hydroxy. Theo một số phương án, nhựa amino hoặc nhựa hydroxy có cỡ hạt nằm trong khoảng 100-400 mesh, và tải bề mặt amino hoặc hydroxy nằm trong khoảng 0,2-0,5 mmol/g. Tỷ lệ của hợp chất được thể hiện bằng công thức (321) với giá đỡ pha rắn là từ 10 μmol hợp chất trên mỗi gam giá đỡ pha rắn (μmol/g) đến 400 μmol/g. Theo một số phương án, tỷ lệ của hợp chất có công thức (321) với giá đỡ pha rắn nằm trong khoảng từ 50 μmol/g đến 200 μmol/g.

Dung môi hữu cơ có thể là dung môi thích hợp bất kỳ của hỗn hợp các dung môi được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thích hợp cho mục đích được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều loại trong số axetonitril, dung môi epoxy, dung môi ete, dung môi haloalkan, dimetyl sulfoxit, N,N-dimetylformamit, và N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, dung môi epoxy là dioxan và/hoặc tetrahydrofuran, dung môi ete là

dietyl ete và/hoặc metyl tert-butyl ete, dung môi haloalkan là một hoặc nhiều loại trong số diclometan, triclometan và 1,2-dicloetan. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là axetonitril. Lượng dung môi hữu cơ nằm trong khoảng 20-200 L/mol, theo một số phương án nằm trong khoảng 50-100 L/mol đối với hợp chất được thể hiện bằng công thức (313).

Theo một số phương án, chất ngưng tụ có thể là benzotriazol-1-yl-oxytripyrolidinophosphoni hexaflophosphat, 3-dietoxyphosphoryl- 1,2,3-benzotriazol-4(3H)-on và/hoặc O-benzotriazol-tetrametyluroni hexaflophosphat. Theo một số phương án, chất ngưng tụ là O-benzotriazol- tetrametyluroni hexaflophosphat. Tỷ lệ mol của chất ngưng tụ với hợp chất được thể hiện bằng công thức (313) nằm trong khoảng từ 1:1 đến 20:1, và theo các phương án khác, nằm trong khoảng từ 1:1 đến 5:1.

Theo một số phương án, amin bậc ba là trietylamin và/hoặc N,N-diisopropyletylamin, và theo một số phương án là N,N-diisopropyletylamin. Tỷ lệ mol của amin bậc ba với hợp chất được thể hiện bằng công thức (313) nằm trong khoảng từ 1:1 đến 20:1, và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 1:1 đến 5:1.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế hợp chất được thể hiện bằng công thức (321) còn bao gồm: cho sản phẩm thu được của phản ứng ngưng tụ tiếp xúc với chất phản ứng phủ và chất xúc tác axyl hóa trong điều kiện phản ứng phủ trong dung môi hữu cơ, và phân lập hợp chất được thể hiện bằng công thức (321). Phản ứng phủ được sử dụng để loại bỏ nhóm chức có hoạt tính bất kỳ mà không được phản ứng, để tránh các sản phẩm phụ không cần thiết ở phản ứng tiếp theo. Điều kiện phản ứng phủ bao gồm nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng 0-50°C, và theo một số phương án nằm trong khoảng 15-35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng 1-10 giờ, và theo một số phương án, nằm trong khoảng 3-6 giờ. Chất phản ứng phủ có thể là chất được sử dụng trong tổng hợp pha rắn siARN, được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, chất phản ứng phủ bao gồm chất phản ứng phủ A (capA) và chất phản ứng phủ B (capB). CapA là N-metylimidazol, và theo một số phương án được đề xuất là dung dịch của N-metylimidazol trong dung môi hỗn hợp pyridin/axetonitril, trong đó tỷ lệ thể tích của pyridin với axetonitril nằm trong khoảng từ 1:10 đến 1:1, và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 1:3 đến 1:1.

Theo một số phương án, tỷ lệ giữa tổng thể tích của pyridin và axetonitril với thể tích của N-metylimidazol nằm trong khoảng từ 1:1 đến 10:1, và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 3:1 đến 7:1. Theo một số phương án, chất phản ứng phủ B là anhydrit axetic. Theo một số phương án, chất phản ứng phủ B được đề xuất là dung dịch của anhydrit axetic trong dung môi axetonitril, trong đó tỷ lệ thể tích của anhydrit axetic với axetonitril nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:10, và theo các phương án khác nằm trong khoảng từ 1:2 đến 1:6.

Theo một số phương án, tỷ lệ của thể tích dung dịch của N-metylimidazol trong dung môi hỗn hợp pyridin/axetonitril với khối lượng hợp chất có công thức (313) nằm trong khoảng 5 ml/g-50 ml/g, và theo một số phương án nằm trong khoảng 15ml/g-30ml/g. Tỷ lệ của thể tích dung dịch của anhydrit axetic trong axetonitril với khối lượng hợp chất có công thức (313) nằm trong khoảng 0,5 ml/g-10 ml/g, và theo một số phương án nằm trong khoảng 1 ml/g-5 ml/g.

Theo một số phương án, chất phản ứng phủ là anhydrit axetic đẳng mol và N-metylimidazol. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều loại trong số axetonitril, dung môi epoxy, dung môi ete, dung môi haloalkan, dimetyl sulfoxit, N,N-dimetylformamit, và N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là axetonitril. Theo một số phương án, lượng dung môi hữu cơ nằm trong khoảng 10-50 L/mol, và theo một số phương án nằm trong khoảng 5-30 L/mol đối với hợp chất được thể hiện bằng công thức (313).

Theo một số phương án, chất xúc tác axyl hóa có thể được chọn từ chất xúc tác bất kỳ mà có thể được sử dụng để este hóa hoặc amit hoá, như hợp chất dị vòng kiềm. Theo một số phương án, chất xúc tác axyl hóa là 4-dimetylaminopyridin. Tỷ lệ của khối lượng chất xúc tác với khối lượng hợp chất được thể hiện bằng công thức (313) có thể nằm trong khoảng từ 0,001:1 đến 1:1, và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 0,01:1 đến 0,1:1.

Theo một số phương án, hợp chất được thể hiện bằng công thức (321) có thể được phân lập từ hỗn hợp phản ứng bằng phương pháp thích hợp bất kỳ. Theo một số phương án, hợp chất có công thức (321) có thể thu được bằng cách rửa đủ với dung môi hữu cơ và lọc để loại bỏ chất phản ứng không phản ứng, chất phản ứng phủ dư và các tạp chất

khác, trong đó dung môi hữu cơ được chọn từ axetonitril, diclometan, hoặc metanol. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là axetonitril.

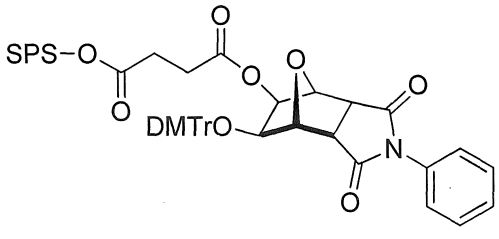
Theo một số phương án, quá trình điều chế phân tử tiếp hợp được thể hiện bằng công thức (321) bao gồm việc cho hợp chất được thể hiện bằng công thức (313) tiếp xúc với phosphorodiamidit trong điều kiện phản ứng ghép đôi khi có mặt chất ghép đôi trong dung môi hữu cơ, và phân lập hợp chất được thể hiện bằng công thức (321). Trong trường hợp này, thu được hợp chất được thể hiện bằng công thức (321), trong đó R_4 chứa nhóm bảo vệ hydroxy làm nhóm chức thứ nhất và nhóm được thể hiện bằng công thức (C3) làm nhóm chức thứ hai.

Theo một số phương án, điều kiện phản ứng ghép đôi bao gồm nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng 0-50°C, như nằm trong khoảng 15-35°C. Tỷ lệ mol của hợp chất có công thức (322) với phosphorodiamidit có thể nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:50, như nằm trong khoảng từ 1:5 đến 1:15. Tỷ lệ mol của hợp chất có công thức (313) với chất ghép đôi có thể nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:100, như nằm trong khoảng từ 1:50 đến 1:80. Thời gian phản ứng có thể nằm trong khoảng 200-3000 giây, tốt hơn là 500-1500 giây. Phosphorodiamidit có thể là như 2-xyanoetyl N,N,N',N'-tetraisopropylphosphorodiamidit, và có thể có bán trên thị trường hoặc được điều chế theo phương pháp đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chất ghép đôi được chọn từ một hoặc nhiều loại trong số 1H-tetrazol, 5-etylthio-1H-tetrazol và 5-benzylthio-1H-tetrazol, như 5-etylthio-1H-tetrazol. Phản ứng ghép đôi có thể được thực hiện trong dung môi hữu cơ. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ được chọn từ một hoặc nhiều loại trong số axetonitril khan, DMF khan và diclometan khan, tốt hơn là axetonitril khan. Lượng dung môi hữu cơ có thể nằm trong khoảng 3-50 L/mol, như nằm trong khoảng 5-20 L/mol đối với hợp chất được thể hiện bằng công thức (313). Qua phản ứng ghép đôi, nhóm hydroxy ở hợp chất (313) phản ứng với phosphorodiamidit để tạo ra nhóm phosphoramidit. Theo một số phương án, dung môi có thể được loại bỏ trực tiếp để thu được sản phẩm thô của hợp chất được thể hiện bằng công thức (321), có thể được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế hợp chất được thể hiện bằng công thức (321) còn bao gồm: cho sản phẩm được phân lập với giá đỡ pha rắn tiếp xúc với

nhóm hydroxy trong điều kiện phản ứng ghép đôi khi có mặt chất ghép đôi trong dung môi hữu cơ, sau đó là phủ, oxy hóa, và phân lập để thu được hợp chất được thể hiện bằng công thức (321), trong đó R_4 chứa nhóm bảo vệ hydroxy làm nhóm chức thứ nhất và nhóm được thể hiện bằng công thức (C3') làm nhóm chức thứ hai.

Theo một số phương án, giá đỡ pha rắn là giá đỡ được sử dụng trong tổng hợp pha rắn axit nucleic, như giá đỡ pha rắn đa năng được giải bảo vệ, có bán trên thị trường (như giá đỡ tổng hợp oligonucleotit NittoPhase®HL UnyLinker™ 300, Kinovate Life Sciences, được thể hiện bằng công thức B80):



(B80).

Phản ứng giải bảo vệ đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, điều kiện giải bảo vệ bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng 0-50°C, như nằm trong khoảng 15-35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng 30-300 giây, như nằm trong khoảng 50-150 giây. Chất giải bảo vệ có thể được chọn từ một hoặc nhiều loại trong số axit trifloaxetic, axit tricloaxetic, axit dicloaxetic, và axit monocloaxetic. Theo một số phương án, chất giải bảo vệ là axit dicloaxetic. Tỷ lệ mol của chất giải bảo vệ với nhóm bảo vệ -DMTr (4,4′ -dimetoxytrityl) trên giá đỡ pha rắn có thể nằm trong khoảng từ 2:1 đến 100:1, như nằm trong khoảng từ 3:1 đến 50:1. Thông qua việc giải bảo vệ này, nhóm hydroxy tự do phản ứng thu được trên bề mặt giá đỡ pha rắn, do đó có sẵn cho phản ứng ghép đôi theo sau.

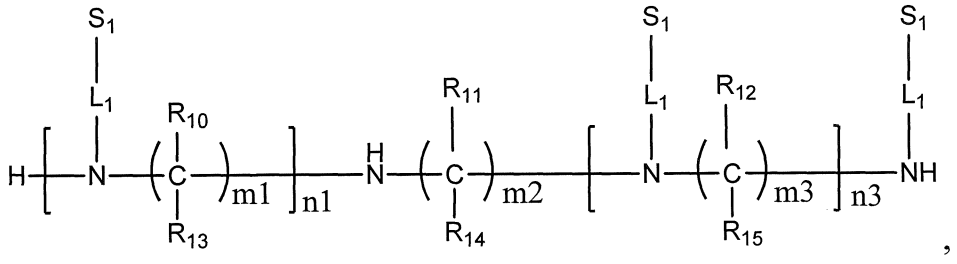
Điều kiện phản ứng ghép đôi và chất ghép đôi có thể được chọn như trên. Thông qua việc ghép đôi này, nhóm hydroxy tự do tạo ra trong quá trình giải bảo vệ phản ứng với nhóm phosphoramidit, để tạo thành liên kết este photphit.

Theo một số phương án, điều kiện phản ứng phủ bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng 0-50°C, như nằm trong khoảng 15-35°C, và thời gian phản ứng nằm trong

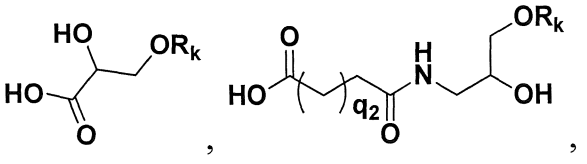
khoảng 5-500 giây, như 10-100 giây. Chất phủ và lượng của nó có thể được chọn như ở trên.

Điều kiện phản ứng oxy hóa có thể bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng 0-50°C, như nằm trong khoảng 15-35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng 1-100 giây, như 5-50 giây. Chất oxy hóa có thể là, ví dụ, iot (theo một số phương án, được đề xuất là nước iot). Theo một số phương án, tỷ lệ mol của chất oxy hóa với trình tự axit nucleic liên kết với giá đỡ pha rắn ở bước ghép đôi nằm trong khoảng từ 1:1 đến 100:1, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5:1 đến 50:1. Theo một số phương án, phản ứng oxy hóa được thực hiện trong dung môi hỗn hợp của tetrahydrofuran:nước:pyridin = 3:1:1-1:1:3.

Theo một số phương án, R_6 là B7 hoặc B8. Trong trường hợp này, hợp chất được thể hiện ở công thức (313) có thể thu được bằng cách cho hợp chất được thể hiện bằng công thức (314) tiếp xúc với hợp chất được thể hiện bằng công thức (A-1) hoặc (A-2) trong điều kiện phản ứng amit hoá khi có mặt chất ngưng tụ dùng cho phản ứng amit hoá và amin bậc ba, trong dung môi hữu cơ, và sau đó là phân lập:



Công thức (314)



(A-1) (A-2)

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

Điều kiện phản ứng amit hóa có thể bao gồm nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng 0-100°C và thời gian phản ứng nằm trong khoảng 1-48 giờ. Theo một số phương án,

điều kiện phản ứng amit hóa là nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng 10-40°C và thời gian phản ứng nằm trong khoảng 2-16 giờ.

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

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

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

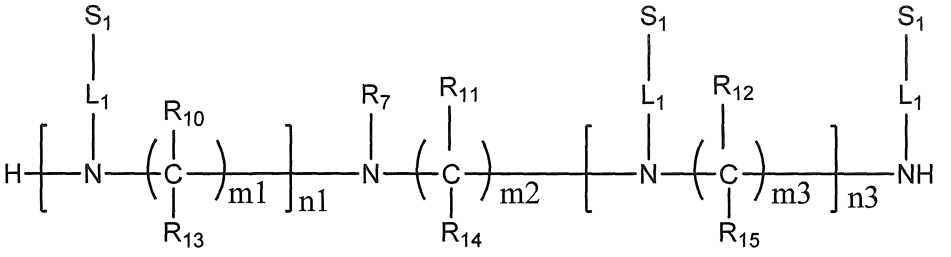
Theo một số phương án, hợp chất có công thức (A-1) và (A-2) có thể được điều chế bằng phương pháp thích hợp bất kỳ. Ví dụ, hợp chất có công thức (A-1) có thể được điều chế bằng cách cho canxi glyxerat phản ứng với DMTrCl trong đó R_k là nhóm DMTr. Tương tự, hợp chất có công thức (A-2) có thể được điều chế bằng cách đầu tiên cho 3-amino-1,2-propandiol tiếp xúc với anhydrit dạng vòng mà có thể có 4-13 nguyên

tử cacbon, và theo một số phương án 4-8 nguyên tử cacbon, sau đó cho phản ứng với DMTrCl. Sẽ dễ dàng được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng việc chọn lọc anhydrit dạng vòng khác nhau là tương ứng với các giá trị khác nhau cho q_2 trong hợp chất có công thức (A-2). Ví dụ, khi anhydrit dạng vòng là anhydrit suxinic, thì q_2=1; khi anhydrit dạng vòng là anhydrit glutaric, thì q_2=2, và v.v..

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

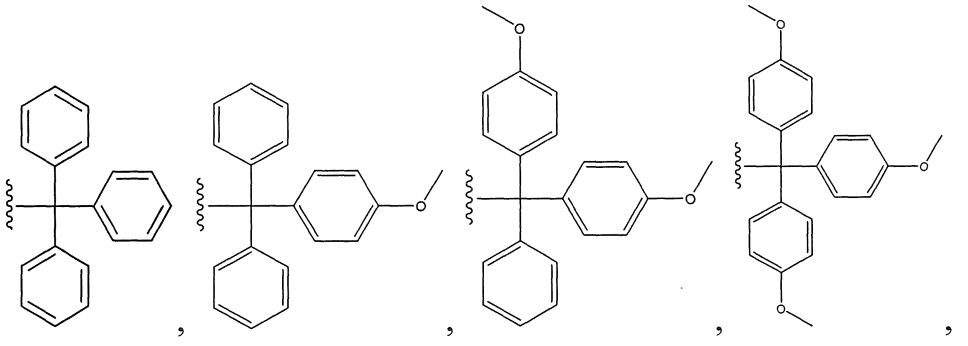
Tương tự, hợp chất được thể hiện bằng công thức (313) có thể được phân lập từ hỗn hợp phản ứng bằng phương pháp phân lập thích hợp bất kỳ. Theo một số phương án, hợp chất được thể hiện bằng công thức (313) có thể được phân lập bằng cách loại bỏ dung môi thông qua bay hơi sau đó là sắc ký. Ví dụ, hai bộ điều kiện sắc ký sau đây có thể được sử dụng để phân lập, (1) tinh chế pha thường: chất độn silicagel 200-300 mesh, với gradien rửa giải của ete dầu mỏ:etyl axetat:diclometan: N,N-dimetylformamit = 1:1:1:0,5-1:1:1:0,6; và (2) tinh chế pha ngược: chất độn pha ngược C18 và C8, với gradien rửa giải của metanol:axetonitril = 0,1:1-1:0,1. Theo một số phương án, dung môi có thể được loại bỏ trực tiếp để thu được sản phẩm thô của hợp chất được thể hiện bằng công thức (313), có thể được sử dụng trực tiếp trong phản ứng tiếp theo.

Theo một số phương án, hợp chất được thể hiện bằng công thức (314) có thể thu được bằng cách cho hợp chất được thể hiện bằng công thức (315) tiếp xúc với axit haloaxetic trong điều kiện phản ứng giải bảo vệ trong dung môi hữu cơ, và sau đó là phân lập:



Công thức (315)

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



(330) (331) (332) (333)

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

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

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

Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều loại trong số dung môi epoxy, dung môi ete, dung môi haloalkan, dimetyl sulfoxit, N,N-dimetylformamit, và N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, dung môi epoxy là dioxan và/hoặc tetrahydrofuran. Theo một số phương án, dung môi ete là dietyl ete và/hoặc metyl tert-

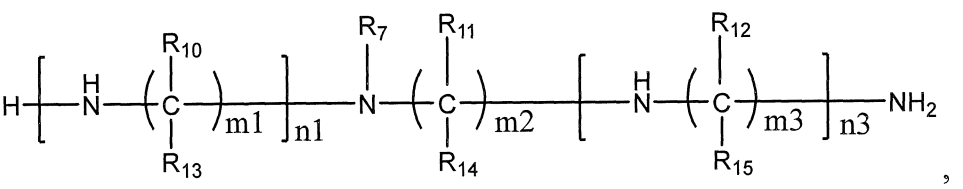
butyl ete. Theo một số phương án, dung môi haloalkan là một hoặc nhiều loại trong số diclometan, triclometan và 1,2-dicloetan. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là diclometan. Lượng dung môi hữu cơ nằm trong khoảng 3-50 L/mol, và theo các phương án khác nằm trong khoảng 5-20 L/mol đối với hợp chất được thể hiện bằng công thức (315).

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

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

Hợp chất được thể hiện bằng công thức (315) có thể thu được bằng cách cho hợp chất được thể hiện bằng công thức (317) tiếp xúc với hợp chất được thể hiện bằng công thức (316) trong điều kiện phản ứng ngưng tụ khi có mặt chất ngưng tụ dùng cho phản ứng amit hóa và amin bậc ba, trong dung môi hữu cơ, và sau đó là phân lập:

Công thức (316)



Công thức (317)

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

Liên quan đến hợp chất có công thức (316), hợp chất như các hợp chất được bộc lộ trong tài liệu J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 16958-16961 có thể được sử dụng. Theo một cách khác, hợp chất có công thức (316) có thể được điều chế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng các phương pháp khác nhau. Ví dụ, một số hợp chất có công thức (316) có thể được điều chế theo phần bộc lộ ở ví dụ 1 của patent Mỹ 8106022 B2, toàn bộ nội dung của nó được kết hợp trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

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

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

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

Theo một số phương án, chất ngưng tụ dùng cho phản ứng amit hóa là benzotriazol-1-yl-oxytripyrolidinophosphoni hexaflophosphat, 3-(dietoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT), O-benzotriazol-tetrametyluroni hexaflophosphat hoặc 4-(4,6-dimetoxytriazin-2-yl)-4-metylmorpholin

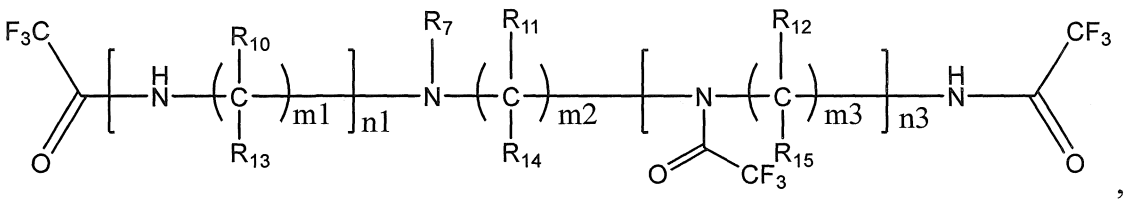
hydroclorua, và theo các phương án khác có thể là 4-(4,6-dimetoxytriazin-2-yl)-4-metylmorpholin hydroclorua. Tỷ lệ mol của chất ngưng tụ dùng cho phản ứng amit hóa với hợp chất được thể hiện bằng công thức (317) có thể nằm trong khoảng từ 2:1 đến 10:1, và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 2,5:1 đến 5:1.

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

Tương tự, hợp chất được thể hiện bằng công thức (315) có thể được phân lập từ hỗn hợp phản ứng bằng phương pháp phân lập thích hợp bất kỳ. Theo một số phương án, hợp chất được thể hiện bằng công thức (315) được phân lập bằng cách loại bỏ dung môi thông qua bay hơi sau đó là sắc ký, ví dụ, bằng cách sử dụng hai bộ điều kiện sắc ký sau đây để phân lập, (1) tinh chế pha thường: chất độn silicagel 200-300 mesh, với gradien rửa giải của diclometan: metanol = 100:5-100:7; (2) tinh chế pha ngược: chất độn pha ngược C18 và C8, với gradien rửa giải của metanol: axetonitril = 0,1:1-1:0,1. Theo một số phương án, dung môi được loại bỏ trực tiếp để thu được sản phẩm thô của hợp chất được thể hiện bằng công thức (315), có thể được sử dụng trực tiếp ở phản ứng tiếp theo.

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

Theo một số phương án, hợp chất được thể hiện bằng công thức (317) có thể thu được bằng cách cho hợp chất được thể hiện bằng công thức (318) tiếp xúc với dung dịch nước metylamin trong điều kiện phản ứng giải bảo vệ khi có mặt dung môi hữu cơ, và sau đó là phân lập:



Công thức (318)

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

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

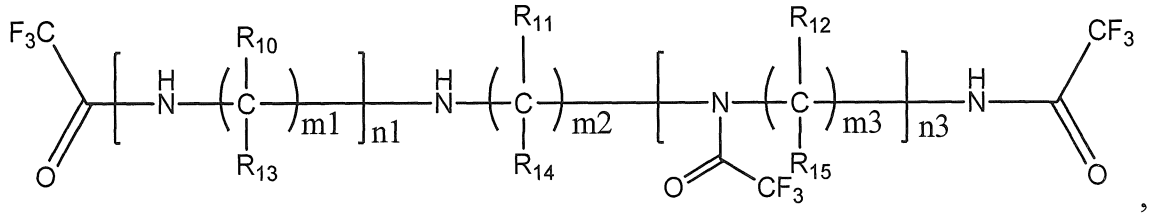
Dung môi hữu cơ có thể được chọn từ rượu, theo một số phương án là một trong số metanol, etanol và isopropanol, và theo các phương án khác là metanol. Lượng dung môi hữu cơ có thể nằm trong khoảng 1-20 L/mol, và theo một số phương án nằm trong khoảng 1,5-10 L/mol đối với hợp chất được thể hiện bằng công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

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

Tương tự, hợp chất được thể hiện bằng công thức (317) có thể được phân lập từ hỗn hợp phản ứng bằng cách sử dụng phương pháp phân lập thích hợp bất kỳ. Theo một số phương án, hợp chất được thể hiện bằng công thức (317) có thể được phân lập bằng cách loại bỏ dung môi thông qua bay hơi sau đó là sắc ký, ví dụ, bằng cách sử dụng hai bộ điều kiện sắc ký sau đây để phân lập, (1) tinh chế pha thường: chất độn silicagel 200-300 mesh, với gradien rửa giải của diclometan:metanol:amoniac nước (25% khối lượng)

= 1:1:0,05-1:1:0,25; và (2) tinh chế pha ngược: chất độn pha ngược C18 và C8, với gradien rửa giải của metanol:axetonitril = 0,1:1-1:0,1. Theo một số phương án, dung môi có thể được loại bỏ trực tiếp để thu được sản phẩm thô của hợp chất được thể hiện bằng công thức (317), có thể được sử dụng trực tiếp ở phản ứng tiếp theo.

Hợp chất được thể hiện bằng công thức (318) có thể thu được bằng cách cho hợp chất được thể hiện bằng công thức (319) tiếp xúc với triphenylclometan (TrCl), diphenyletylphenylclometan, phenyldietylphenylclometan hoặc trietylphenylclometan, và theo một số phương án với triphenylclometan (TrCl) trong điều kiện phản ứng thế khi có mặt dung môi hữu cơ, và sau đó là phân lập:



Công thức (319)

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

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

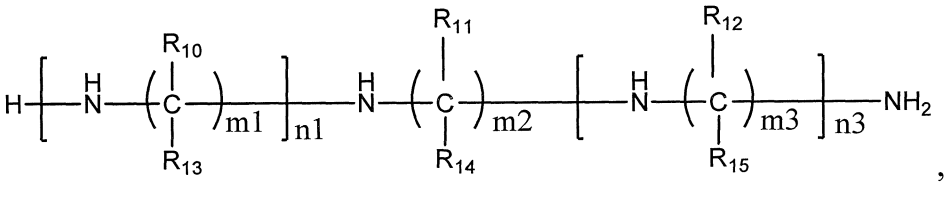
Triphenylclometan (TrCl), diphenyletylphenylclometan, phenyldietylphenylclometan hoặc trietylphenylclometan có bán trên thị trường. Tỷ lệ mol của triphenylclometan (TrCl), diphenyletylphenylclometan, phenyldietylphenylclometan hoặc trietylphenylclometan với hợp chất được thể hiện bằng công thức (319) có thể nằm trong khoảng từ 1:1 đến 10:1, và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 1:1 đến 3:1.

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

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

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

Theo một số phương án, hợp chất được thể hiện bằng công thức (319) có thể thu được bằng cách cho hợp chất được thể hiện bằng công thức (320) tiếp xúc với etyl trifloaxetat trong điều kiện phản ứng thế trong dung môi hữu cơ, và sau đó là phân lập:



Công thức (320)

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

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

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

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

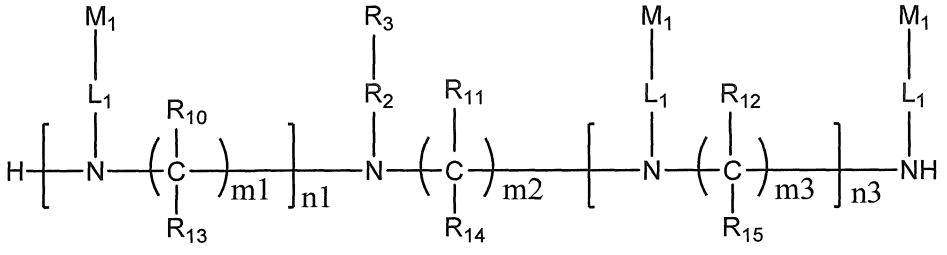
Hợp chất được thể hiện bằng công thức (320) có thể được mua bán, hoặc thu được bằng phương pháp đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, trong trường hợp mà m1=m2=m3=3, n1=1, n3=2, trong khi mỗi trong số R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} là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

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

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

Thể tiếp hợp

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thể tiếp hợp có cấu trúc được thể hiện bằng công thức (1):



Công thức (1),

trong đó:

n1 là số nguyên nằm trong khoảng 1-3, và n3 là số nguyên nằm trong khoảng 0-4;

mỗi trong số m1, m2, và m3 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng 2-10;

mỗi trong số R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} độc lập được chọn từ H, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} haloalkyl, và C_1-C_{10} alkoxy, và theo một số phương án, độc lập là H, metyl, hoặc etyl;

R_3 là thuốc có hoạt tính, theo một số phương án bao gồm oligonucleotit chức;

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

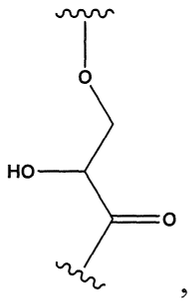
-C(O)C_1-C_{10} alkyl, -C(O)C_1-C_{10} alkylphenyl, -C(O)C_1-C_{10} haloalkyl, -OC(O)C_1-C_{10} alkyl, -SO_2(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2(phenyl), -SO_2(C_1-C_{10} haloalkyl), -SO_2NH_2, -SO_2NH(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2NH(phenyl), -NHSO_2(C_1-C_{10} alkyl), -NHSO_2(phenyl), và -NHSO_2(C_1-C_{10} haloalkyl);

mỗi L_1 độc lập là alkylen mạch thẳng dài từ 1 đến 70 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ trong số các nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, $S(O)_2$, C_2-C_{10} alkenylen, C_2-C_{10} alkynylen, C_6-C_{10} arylen, C_3-C_{18} heteroxyclylen, và C_5-C_{10} heteroarylen, và trong đó L_1 tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ trong số các nhóm bao gồm: C_1-C_{10} alkyl, C_6-C_{10} aryl, C_5-C_{10} heteroaryl, C_1-C_{10} haloalkyl, -OC_1-C_{10} alkyl, -OC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-OH, -OC_1-C_{10} haloalkyl, -SC_1-C_{10} alkyl, -SC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-SH, -SC_1-C_{10} haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH_2, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2, -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -NH(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkylphenyl), -NH(C_1-C_{10} alkylphenyl), xyano, nitro, -CO_2H, -C(O)OC_1-C_{10} alkyl, -CON(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -CONH(C_1-C_{10} alkyl), -$CONH_2$, -NHC(O)(C_1-C_{10} alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C_1-C_{10} alkyl, -C(O)C_1-C_{10} alkylphenyl, -C(O)C_1-C_{10} haloalkyl, -OC(O)C_1-C_{10} alkyl, -SO_2(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2(phenyl), -SO_2(C_1-C_{10} haloalkyl), -SO_2NH_2, -SO_2NH(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2NH(phenyl), -NHSO_2(C_1-C_{10} alkyl), -NHSO_2(phenyl), và -NHSO_2(C_1-C_{10} haloalkyl), và theo một số phương án, L_1 có thể được chọn từ nhóm bao gồm A1-A26 hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng, trong đó các cấu trúc và định nghĩa của A1-A26 được thể hiện ở trên;

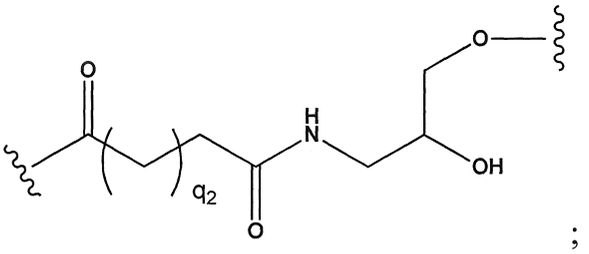
n1, n3, m1, m2, m3, R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15} và M_1 là như được xác định ở trên.

Theo một số phương án, R_2 là nhóm liên kết được tạo ra bằng cách liên kết nhóm R_4 trong hợp chất có công thức (321) với thuốc có hoạt tính qua phản ứng. Theo một số phương án, R_2 là nhóm liên kết được tạo ra bằng cách liên kết nhóm R_4 trong hợp chất có công thức (321) với oligonucleotit chức qua phản ứng. Theo một số phương án, nhóm R_2 có cả vị trí liên kết với nguyên tử N trên khung chính nitơ và vị trí liên kết với nguyên tử P ở R_3. Theo một số phương án, ở R_2, vị trí liên kết với nguyên tử N trên khung chính

nitơ tạo thành liên kết amit với nguyên tử N, và vị trí liên kết với nguyên tử P ở R_3 tạo thành liên kết phosphoeste với nguyên tử P. Theo một số phương án, R_2 là B5, B6, B5' hoặc B6':

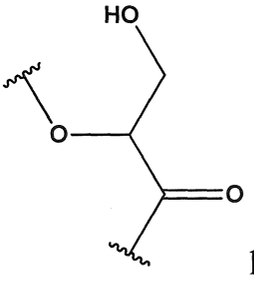


,

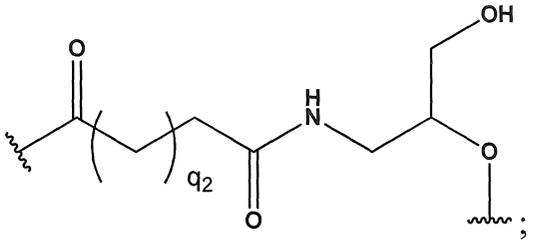


;

(B5) (B6)



hoặc

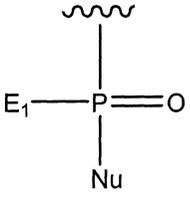


;

(B5') (B6')

trong đó, ~~~ là vị trí mà các nhóm được liên kết cộng hóa trị; việc chọn và các khoảng của q_2 là như được mô tả ở trên.

Theo một số phương án, R_3 là nhóm có cấu trúc được thể hiện bằng công thức A59:



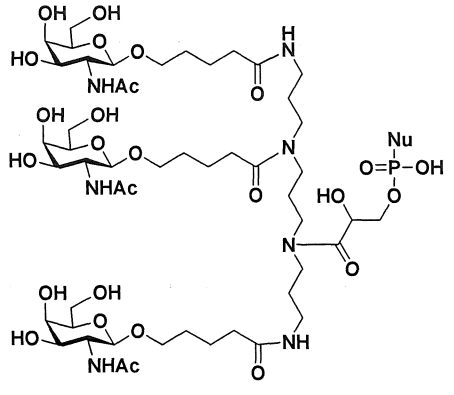
(A59)

trong đó E_1 là OH, SH hoặc BH_2, và theo một số phương án là OH hoặc SH; và Nu là oligonucleotit chức.

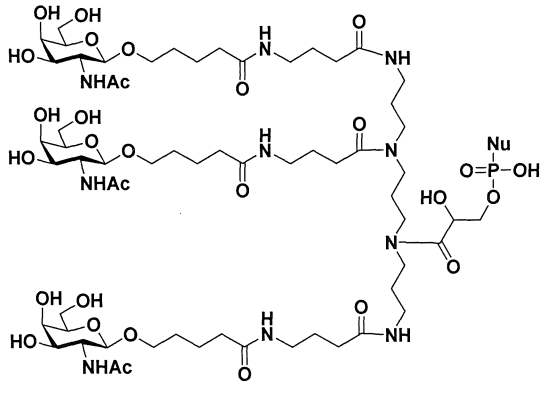
Trong ngữ cảnh của sáng chế, trừ khi được nêu khác đi, nhóm hoặc phân tử "tiếp hợp" dùng để chỉ nhóm hoặc phân tử có khả năng tạo thành liên kết cộng hóa trị với đối

tác thích hợp của chúng, và cả nhóm hoặc phân tử tiếp hợp và đối tác của nó đều có chức năng riêng. Tương ứng với đó, "thể tiếp hợp" dùng để chỉ hợp chất được tạo ra bằng liên kết cộng hóa trị của gốc hóa học với đối tác của nó. Ngoài ra, "thể tiếp hợp oligonucleotit" là hợp chất được tạo ra bằng cách gắn theo cách cộng hóa trị oligonucleotit và một hoặc nhiều gốc tiếp hợp mỗi trong số đó có chức năng riêng. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này là thể tiếp hợp oligonucleotit. Trong ngữ cảnh này, "phân tử tiếp hợp" có thể là hợp chất cụ thể có khả năng tiếp hợp với oligonucleotit qua phản ứng, theo đó cuối cùng tạo thành thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế. Theo một số phương án, oligonucleotit là siARN, vì thế thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế là thể tiếp hợp siARN.

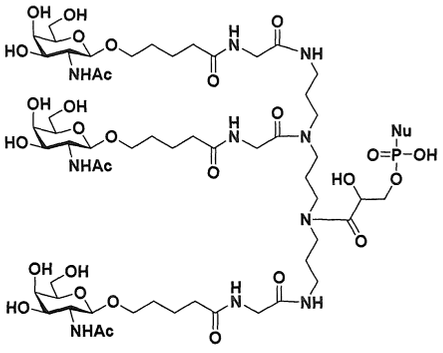
Theo một số phương án, thể tiếp hợp có cấu trúc được thể hiện bằng các công thức (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19), (20), (21), hoặc (22):



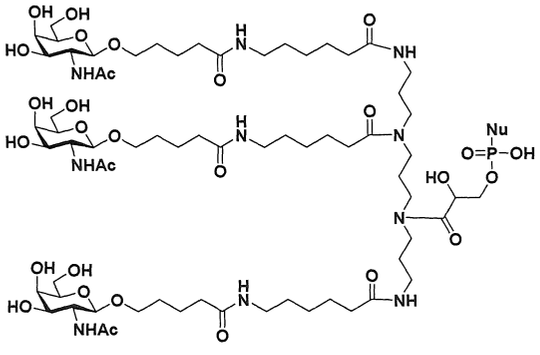
Công thức (3)



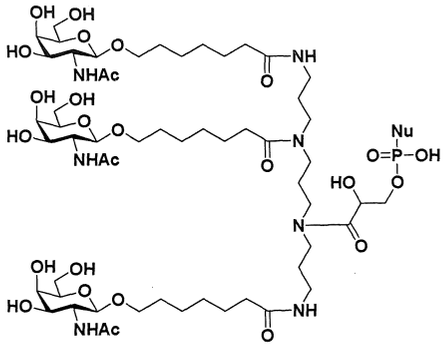
Công thức (4)



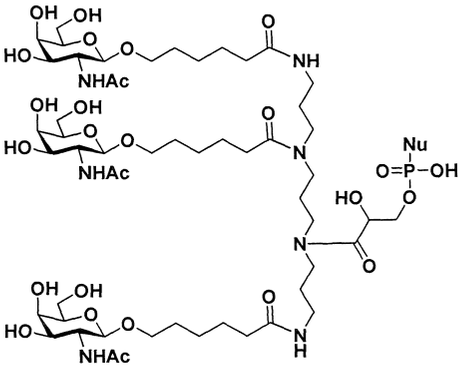
Công thức (5)



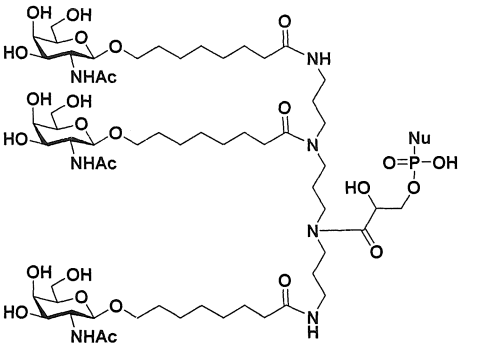
Công thức (6)



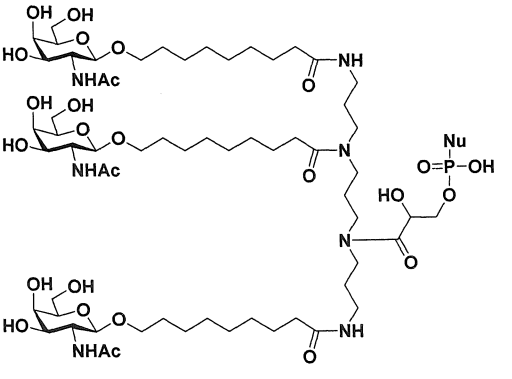
Công thức (7)



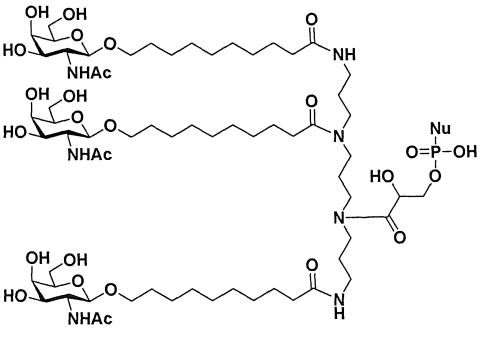
Công thức (8)



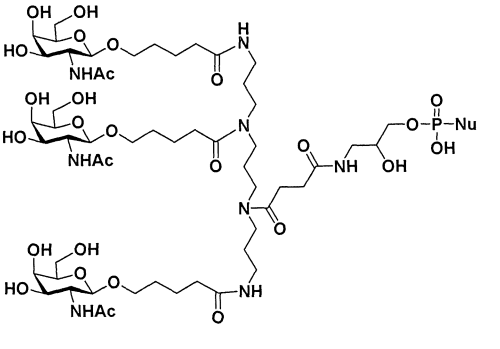
Công thức (9)



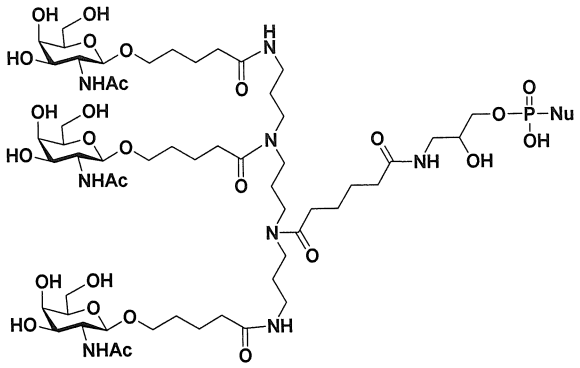
Công thức (10)



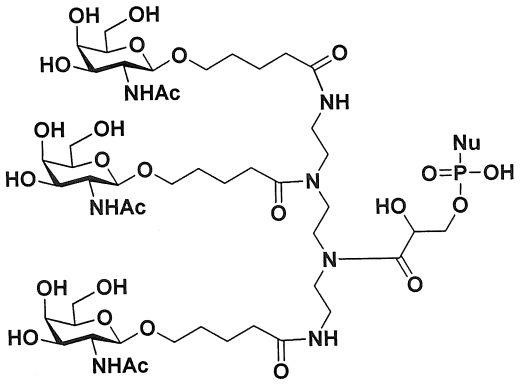
Công thức (11)



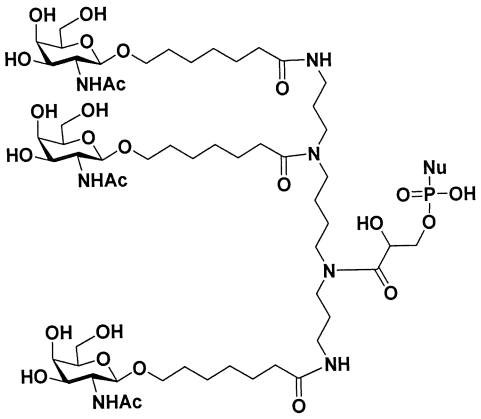
Công thức (12)



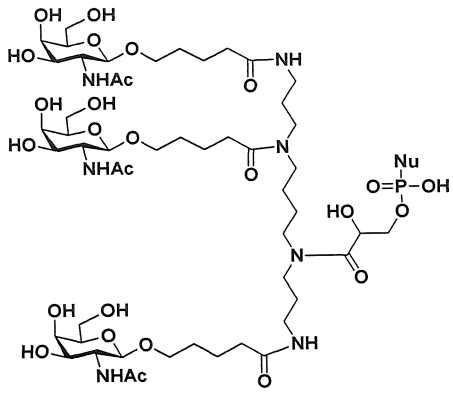
Công thức (13)



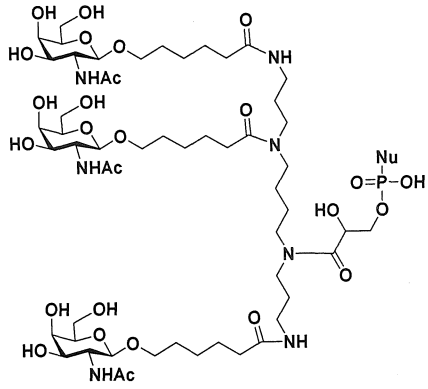
Công thức (14)



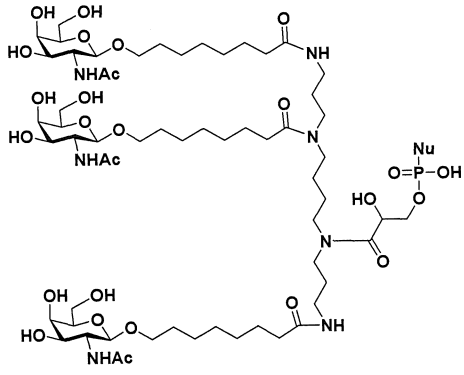
Công thức (15)



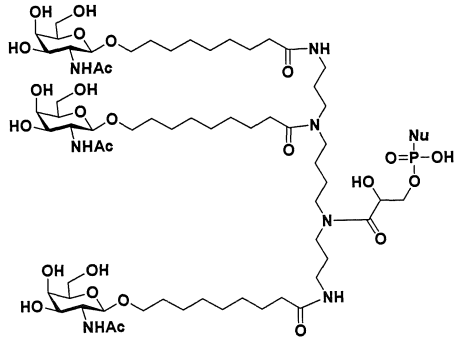
Công thức (16)



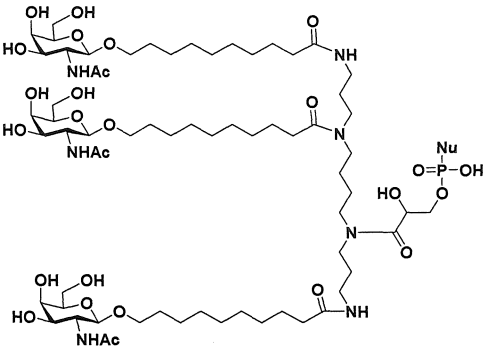
Công thức (17)



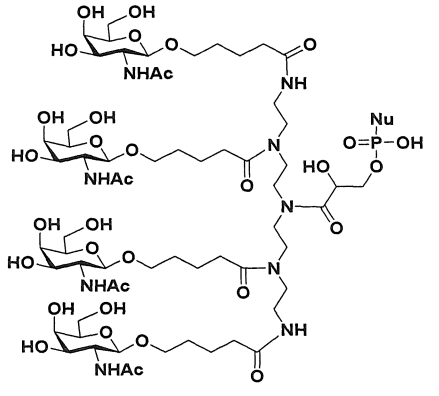
Công thức (18)



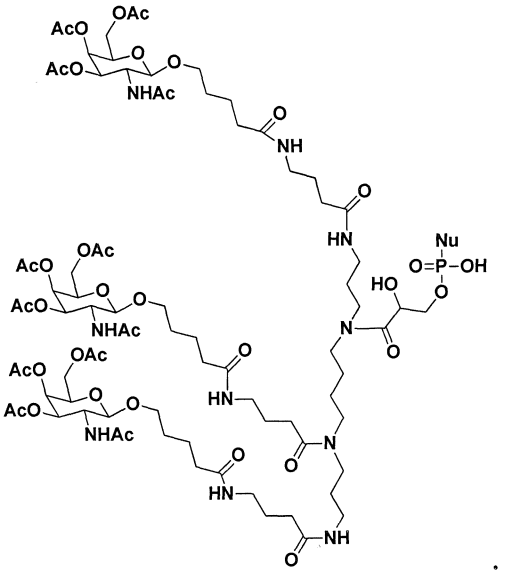
Công thức (19)



Công thức (20)



Công thức (21)



Công thức (22)

Theo một số phương án, oligonucleotit trong thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế là oligonucleotit chức. Oligonucleotit chức dùng để chỉ oligonucleotit có khả năng

điều hòa tăng hoặc giảm mức biểu hiện của gen đích hoặc dẫn đến sự ghép nối xen kẽ của mARN bằng cách tạo ra sự lai ổn định và đặc hiệu với trình tự đích, bằng cách sử dụng nguyên lý như hoạt hóa ARN (ARNa), can thiệp ARN (ARNi), công nghệ axit nucleic đối nghĩa, và công nghệ nhảy cách exon. Theo một số phương án, oligonucleotit chức cũng có thể là cấu trúc axit nucleic mà tạo ra liên kết ổn định và đặc hiệu với protein đích. Ngoài ra, sẽ dễ dàng được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng polynucleotit, như bản thân mARN hoặc mảnh của nó, cũng thích hợp để tạo thành thể tiếp hợp bằng cách tiếp hợp với phân tử tiếp hợp được đề cập theo sáng chế để đạt được sự phân phối nhắm đích như phân phối nhắm đích gan, nhờ đó điều hòa sự biểu hiện của protein được phiên mã bởi mARN. Vì vậy, trong ngữ cảnh này, "oligonucleotit chức" cũng có thể bao gồm mARN hoặc các mảnh của nó.

Theo một số phương án, oligonucleotit chức có khả năng tương tác với trình tự đích, nhờ đó ảnh hưởng đến chức năng bình thường của phân tử trình tự đích, như gây hiện tượng gãy hoặc ức chế dịch mã của mARN hoặc ghép nối xen kẽ của mARN thu được từ quá trình nhảy cách exon, v.v.. Theo một số phương án, oligonucleotit chức này bổ sung vào bazơ ở trình tự đích. Theo một số phương án, oligonucleotit chức này bổ sung vào hơn 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% bazơ ở trình tự đích, hoặc có thể bổ sung hoàn toàn vào trình tự đích. Theo một số phương án, oligonucleotit chức này có thể có 1, 2, hoặc 3 bazơ không bổ sung vào trình tự đích. Theo một số phương án, oligonucleotit chức này bao gồm deoxyribonucleotit, ribonucleotit, và nucleotit được cải biến. Theo một số phương án, oligonucleotit chức là ADN sợi đơn, ARN sợi đơn hoặc thể khảm ADN-ARN, hoặc ADN sợi kép, ARN sợi kép hoặc thể lai ADN-ARN.

Như vậy, theo một số phương án, oligonucleotit chức thích hợp cho thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế có thể là một trong số ARN can thiệp nhỏ (siARN), ARN siêu nhỏ, kháng ARN siêu nhỏ (antimiR), chất đối kháng ARN siêu nhỏ (antagomir), phân tử bắt chước ARN siêu nhỏ, oligonucleotit mồi, phân tử kích thích miễn dịch, bộ bốn G, biến đổi tách intron, ARN sợi đơn (ssARN), axit nucleic đối nghĩa, aptame axit nucleic, ARN hoạt hóa nhỏ (saARN), ARN hoặc ADN vòng-gốc. WO2015/006740A2 bộc lộ thể tiếp hợp với các phối tử khác nhau được tiếp hợp với oligonucleotit, trong đó

các phối tử này được liên kết với oligonucleotit qua tác nhân liên kết. Oligonucleotit được chọn từ nhóm bao gồm ARN can thiệp nhỏ (siARN), ARN siêu nhỏ, kháng ARN siêu nhỏ (antimiR), antagomir, phân tử bắt chước ARN siêu nhỏ, oligonucleotit mồi (mồi), phân tử kích thích miễn dịch, bộ bốn G, biến đổi tách intron, sợi đơn (ssRNA), axit nucleic đối nghĩa (đối nghĩa), aptame, ARN hoặc ADN vòng-gốc. Các thể tiếp hợp này có độ ổn định tốt khi phân phối oligonucleotit *in vivo*. Theo các phương án khác, oligonucleotit chức thích hợp cho thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế là oligonucleotit được bộc lộ trong WO2009082607A2, WO2009073809A2 hoặc WO2015006740A2, tất cả các tài liệu này được kết hợp trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế có thể điều hòa sự biểu hiện bất thường của gen đặc hiệu trong một số tế bào nhất định như tế bào gan bằng cách làm tăng sự phân phối nhắm đích gan của hoạt chất, như oligonucleotit chức, và vì vậy cải thiện tương tác của oligonucleotit chức với trình tự đích trong tế bào. Theo một số phương án, gen đặc hiệu có thể là gen nội sinh được biểu hiện trong gan hoặc gen gây bệnh tái sinh trong gan. Gen biểu hiện bất thường trong tế bào gan có thể là gen như ApoB, ApoC, ANGPTL3, PCSK9, SCD1, TIMP-1, Col1A1, FVII, STAT3, p53, HBV, và HCV, v.v.. Theo một số phương án, gen biểu hiện bất thường trong tế bào gan là gen HBV, gen ANGPTL3, hoặc gen APOC3. Trong ngữ cảnh của sáng chế, gen HBV dùng để chỉ gen có trình tự như được thể hiện trong số gia nhập Genbank NC_003977.1; gen ANGPTL3 dùng để chỉ gen có trình tự mARN như được thể hiện trong số gia nhập Genbank NM_014495.3; và gen APOC3 dùng để chỉ gen có trình tự mARN như được thể hiện trong số gia nhập Genbank NM_000040.1.

Theo một số phương án, "trình tự đích" là mARN đích. Trong ngữ cảnh của sáng chế, "mARN đích" dùng để chỉ mARN tương ứng với gen biểu hiện bất thường như trong tế bào gan, mà có thể là mARN tương ứng với gen biểu hiện quá mức hoặc mARN tương ứng với gen biểu hiện dưới mức. Theo một số phương án, mARN đích tốt hơn là mARN tương ứng với gen biểu hiện quá mức, vì hầu hết các bệnh đều có nguồn gốc từ sự biểu hiện quá mức của mARN. Theo một số phương án của sáng chế, mARN đích tương ứng với gen biểu hiện bất thường nêu ở trên có thể là mARN tương ứng với gen

như ApoB, ApoC, ANGPTL3, PCSK9, SCD1, TIMP-1, Col1A1, FVII, STAT3, p53, HBV, và HCV, v.v.. Theo một số phương án, mARN đích có thể là mARN được phiên mã bởi gen HBV tương ứng, gen ANGPTL3 hoặc gen APOC3.

Nguyên tử P trong công thức A59 có thể được liên kết với vị trí bất kỳ có thể có trong trình tự oligonucleotit, ví dụ, nucleotit bất kỳ của oligonucleotit. Theo một số phương án, oligonucleotit chức trong thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế là oligonucleotit sợi đơn (ví dụ, ARN sợi đơn hoặc aptame). Trong trường hợp này, nguyên tử P trong công thức A59 có thể được liên kết với vùng tận cùng của oligonucleotit sợi đơn, dùng để chỉ 4 nucleotit gần nhất với một đầu của oligonucleotit sợi đơn. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với đầu của oligonucleotit sợi đơn.

Theo một số phương án, oligonucleotit chức trong thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế là oligonucleotit sợi kép (ví dụ, siARN, vi ARN, hoặc ADN) chứa sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 có thể được liên kết với vùng tận cùng của sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa trong oligonucleotit sợi kép, dùng để chỉ 4 nucleotit gần nhất với một đầu của sợi có nghĩa hoặc đối nghĩa. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với đầu của sợi có nghĩa hoặc đối nghĩa. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với đầu 3’ của sợi có nghĩa. Ở trường hợp trong đó nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với vị trí trên trong sợi có nghĩa của oligonucleotit sợi kép, thể tiếp hợp oligonucleotit được đề cập theo sáng chế có thể giải phóng sợi đối nghĩa tách riêng của oligonucleotit sợi kép trong quá trình gỡ cuốn sau khi đi vào tế bào, nhờ đó ngăn chặn sự dịch mã của mARN đích thành protein và ức chế sự biểu hiện của gen đặc hiệu.

Nguyên tử P trong công thức A59 có thể được liên kết với vị trí bất kỳ có thể có của nucleotit trong trình tự oligonucleotit, ví dụ, vị trí 5', 2' hoặc 3', hoặc bazơ của nucleotit. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 có thể được liên kết với vị trí 2', 3', hoặc 5' của nucleotit trong trình tự oligonucleotit bằng cách tạo thành liên kết phosphodieste. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với nguyên tử oxy tạo thành sau khi khử proton 3′ -hydroxy của nucleotit ở

đầu 3′ của sợi có nghĩa trong trình tự oligonucleotit sợi kép, hoặc được liên kết với nucleotit bằng cách thế nguyên tử hydro trong 2'-hydroxy của nucleotit của sợi có nghĩa hoặc bằng cách thế nguyên tử hydro trong 5'-hydroxy của nucleotit tại đầu 5′ của sợi có nghĩa trong trình tự oligonucleotit sợi kép.

Không mong muốn bị giới hạn, sáng chế được mô tả chi tiết hơn theo phương án dưới đây và các ví dụ đối với các phương án lấy làm ví dụ trong đó oligonucleotit chức trong thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế là ARN can thiệp nhỏ (siARN). Trong trường hợp này, thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế là thể tiếp hợp siARN. Trong ngữ cảnh của sáng chế, thể tiếp hợp siARN theo các phương án này còn được gọi là thể tiếp hợp siARN theo sáng chế chỉ để thuận tiện cho việc mô tả. Điều đó không có nghĩa là oligonucleotit trong thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế chỉ có thể là siARN, thay vào đó, oligonucleotit và thậm chí thuốc có hoạt tính có thể là lựa chọn thay thế bổ sung như được bộc lộ trong bản mô tả này hoặc được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Dự tính rằng, dựa trên phần minh họa chi tiết về thể tiếp hợp siARN, các thuốc có hoạt tính hoặc oligonucleotit chức khác sẽ hoạt động tương tự khi được tiếp hợp với phân tử tiếp hợp được đề cập trong bản mô tả này.

Đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật rằng siARN chứa nhóm nucleotit như là các khối xây dựng. Nhóm nucleotit, lần lượt, chứa nhóm phosphat, nhóm riboza và bazơ. Nói chung, siARN có hoạt tính, tức là, siARN chức, có thể có độ dài nằm trong khoảng 12-40 nucleotit, và theo một số phương án dài khoảng 15-30 nucleotit. Mỗi nucleotit ở siARN có thể độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến. Để tăng độ ổn định, ít nhất một nucleotit trong siARN là nucleotit được cải biến.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng siARN được mô tả theo các phương án sau đây có hoạt tính và/hoặc độ ổn định cao hơn và vì vậy có thể được sử dụng làm siARN cho các mục đích được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, mỗi nucleotit trong siARN của thể tiếp hợp siARN theo sáng chế (sau đây còn được gọi là siARN theo sáng chế) độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến. SiARN chứa sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa, trong đó sợi

có nghĩa chứa trình tự nucleotit 1, và sợi đối nghĩa chứa trình tự nucleotit 2. Cả trình tự nucleotit 1 và trình tự nucleotit 2 đều có độ dài là 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, hoặc 25 nucleotit và bổ sung ngược ít nhất một phần để tạo ra vùng bổ sung sợi kép. Trình tự nucleotit 2 bổ sung vào mảnh trình tự nucleotit thứ nhất, dùng để chỉ mảnh của trình tự nucleotit trong mARN đích.

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế dùng để chỉ siARN có khả năng ức chế ít nhất 50% sự biểu hiện của gen HBV, ít nhất 50% sự biểu hiện của gen ANGPTL3, hoặc ít nhất 50% sự biểu hiện của gen APOC3, ở nồng độ 3 mg/kg. Theo một số phương án, siARN theo sáng chế dùng để chỉ siARN có khả năng ức chế ít nhất 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, hoặc 80% sự biểu hiện của gen HBV, gen ANGPTL3, hoặc gen APOC3, ở nồng độ 3 mg/kg.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit 1 có cùng độ dài và khác không nhiều hơn 3 nucleotit với mảnh trình tự nucleotit thứ nhất; trình tự nucleotit 2 có cùng độ dài và khác không nhiều hơn 3 nucleotit với trình tự nucleotit B, dùng để chỉ trình tự nucleotit bổ sung ngược hoàn toàn vào mảnh trình tự nucleotit thứ nhất. Không muốn bị giới hạn bởi lý thuyết bất kỳ, các khác biệt nucleotit đặc biệt này sẽ không làm giảm đáng kể khả năng làm suy yếu của thể tiếp hợp siARN, và vì vậy nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit 1 về cơ bản là bổ sung ngược, hầu như là bổ sung ngược, hoặc bổ sung ngược hoàn toàn vào trình tự nucleotit 2.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit 1 có không nhiều hơn 1 nucleotit khác với mảnh trình tự nucleotit thứ nhất; và/hoặc trình tự nucleotit 2 có không nhiều hơn 1 nucleotit khác với trình tự nucleotit B. Theo một số phương án, sự khác biệt nucleotit giữa trình tự nucleotit 2 và trình tự nucleotit B bao gồm sự khác nhau ở vị trí của nucleotit thứ nhất Z' trên trình tự nucleotit 2 từ đầu 5' đến đầu 3'. Theo một số phương án, nucleotit cuối Z trên trình tự nucleotit 1 từ đầu 5' đến đầu 3' là bổ sung nucleotit vào Z'.

Theo một số phương án, sợi có nghĩa cũng chứa trình tự nucleotit 3, và sợi đối nghĩa cũng chứa trình tự nucleotit 4. Trình tự nucleotit 3 và 4 có cùng độ dài nằm trong

khoảng 1-4 nucleotit. Trình tự nucleotit 3 được liên kết với đầu 5' của trình tự nucleotit 1, và trình tự nucleotit 4 được liên kết với đầu 3' của trình tự nucleotit 2. Trình tự nucleotit 4 bổ sung vào mảnh trình tự nucleotit thứ hai, dùng để chỉ trình tự nucleotit liền kề với mảnh trình tự nucleotit thứ nhất và có độ dài giống như trình tự nucleotit 4 trong mARN đích. Theo một số phương án, trình tự nucleotit 3 hầu như là bổ sung ngược hoặc bổ sung ngược hoàn toàn vào trình tự nucleotit 4. Do đó, theo một số phương án, sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa có thể có độ dài nằm trong khoảng 19-23 nucleotit.

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế cũng chứa trình tự nucleotit 5, có độ dài nằm trong khoảng 1-3 nucleotit và được liên kết với đầu 3' của sợi đối nghĩa, nhờ đó cấu thành phần nhô 3' của sợi đối nghĩa. Theo một số phương án, trình tự nucleotit 5 dài 1 hoặc 2 nucleotit. Như vậy, theo một số phương án, tỷ lệ độ dài của sợi có nghĩa với sợi đối nghĩa trong siARN theo sáng chế có thể là 19/20, 19/21, 20/21, 20/22, 21/22, 21/23, 22/23, 22/24, 23/24, hoặc 23/25.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit 5 có độ dài 2 nucleotit. Ngoài ra, trình tự nucleotit 5 này là 2 deoxynucleotit thymidin liên tiếp, hoặc 2 nucleotit uridin liên tiếp theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', hoặc bổ sung vào mảnh trình tự nucleotit thứ ba, dùng để chỉ trình tự nucleotit liền kề với mảnh trình tự nucleotit thứ nhất hoặc thứ hai trong mARN đích, và có độ dài giống như trình tự nucleotit 5. Theo một số phương án, tỷ lệ độ dài của sợi có nghĩa với sợi đối nghĩa trong siARN theo sáng chế là 19/21 hoặc 21/23. Trong bản mô tả này, siARN theo sáng chế có hoạt tính làm bất hoạt đáng kể chống lại mARN ở tế bào gan.

Theo một số phương án, mỗi nucleotit trong siARN theo sáng chế độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến. Theo một số phương án, siARN theo sáng chế không chứa nucleotit được cải biến. Theo một số phương án, siARN theo sáng chế chứa nhóm nucleotit được cải biến.

Hiện có nhiều phương pháp mà có thể được sử dụng để cải biến siARN trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm cải biến khung chính (hoặc cải biến liên kết giữa các nucleotit, như cải biến nhóm phosphat), cải biến nhóm riboza, cải biến bazơ, v.v. (xem, ví dụ, Watts, J.K., G. F. Deleavey and M. J. Damha, Chemically Modified siRNA: tools and

applications. Drug Discov Today, 2008,13(19-20): p.842-55, được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ).

Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ "nucleotit được cải biến" được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm nucleotit trong đó nhóm riboza được cải biến, như được tạo ra bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng các nhóm khác, chất tương tự nucleotit, hoặc nucleotit bằng bazơ được cải biến.

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một nucleotit ở sợi có nghĩa hoặc đối nghĩa là nucleotit được cải biến, và/hoặc ít nhất một phosphat là nhóm phosphat với nhóm được cải biến. Nói cách khác, ít nhất một phần của nhóm phosphat và/hoặc nhóm riboza trong khung chính phosphat-riboza của ít nhất một sợi đơn trong sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa là nhóm phosphat và/hoặc nhóm riboza với nhóm được cải biến (hoặc phosphat được cải biến và/hoặc riboza được cải biến). Theo một số phương án của sáng chế, tất cả các nucleotit trong sợi có nghĩa và/hoặc sợi đối nghĩa là nucleotit được cải biến.

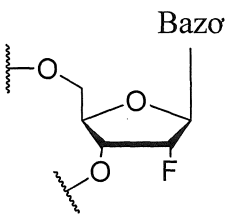
Theo một số phương án, mỗi nucleotit trong sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa độc lập là nucleotit cải biến bằng flo hoặc nucleotit không cải biến bằng flo.

"Nucleotit cải biến bằng flo" dùng để chỉ nucleotit được tạo ra bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng flo như được thể hiện bằng công thức (207).

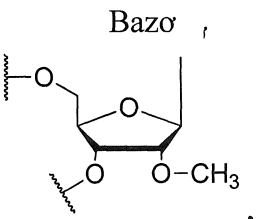
"Nucleotit không cải biến bằng flo" dùng để chỉ nucleotit được tạo ra bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nhóm khác với flo, hoặc chất tương tự nucleotit. Theo một số phương án, mỗi nucleotit không cải biến bằng flo độc lập là nucleotit được tạo ra bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nó bằng nhóm không flo, hoặc chất tương tự nucleotit.

Nucleotit được tạo ra bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nhóm không flo là đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này, như nucleotit cải biến bằng 2'-alkoxy, nucleotit cải biến bằng alkoxy được thế 2', nucleotit cải biến bằng 2'-alkyl, nucleotit cải biến bằng alkyl được thế 2', nucleotit cải biến bằng 2'-amino, nucleotit cải biến bằng amino được thế 2' hoặc nucleotit 2'-deoxy.

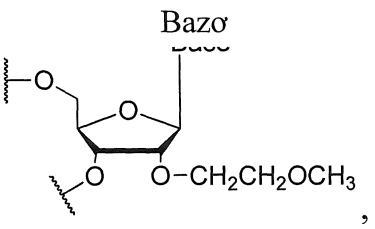
Theo một số phương án, nucleotit cải biến bằng 2'-alkoxy là nucleotit cải biến bằng metoxy được thể hiện bằng công thức (208). Theo một số phương án, nucleotit cải biến bằng alkoxy được thế 2' là nucleotit cải biến bằng 2'-O-metoxyetoxy được thể hiện bằng công thức (209). Theo một số phương án, nucleotit cải biến bằng 2'-amino được thể hiện bằng công thức (210). Theo một số phương án, nucleotit 2'-deoxy (ADN) được thể hiện bằng công thức (211).



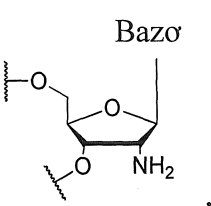
(207)



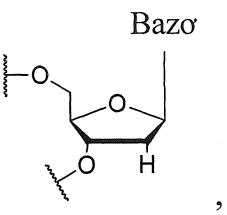
(208)



(209)



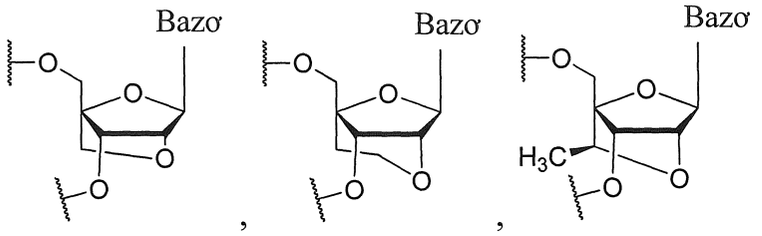
(210)



(211)

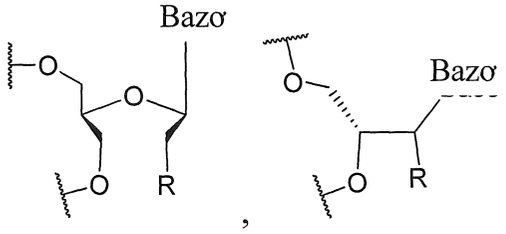
"Chất tương tự nucleotit" dùng để chỉ nhóm mà có thể thay thế nucleotit trong axit nucleic, trong khi khác với adenin ribonucleotit, guanin ribonucleotit, xytosin ribonucleotit, uraxil ribonucleotit hoặc thymin deoxyribonucleotit. Theo một số phương án, chất tương tự nucleotit có thể là isonucleotit,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

Nucleotit BNA là nucleotit bị ràng buộc hoặc khó tiếp cận. BNA có thể chứa cấu trúc có cầu vòng 5, 6 cạnh hoặc thậm chí là 7 cạnh có nếp nhăn đường C3'-endo "cố định". Cầu này thường được kết hợp ở vị trí 2' và 4' của vòng riboza để tạo ra nucleotit 2', 4'-BNA, như LNA, ENA và cET BNA mà được thể hiện bằng công thức (212), (213) và (214), một cách tương ứng.



(212) (213) (214)

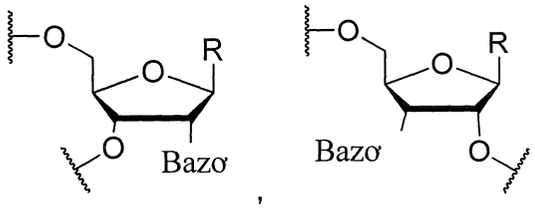
Nucleotit không vòng là nucleotit trong đó vòng riboza được mở, như nucleotit axit nucleic không móc chuỗi (UNA) và nucleotit axit nucleic glyxerol (GNA), lần lượt được thể hiện bằng công thức (215) và (216).



(215) (216)

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

Isonucleotit là nucleotit trong đó vị trí của bazơ trên vòng riboza thay đổi, như hợp chất trong đó bazơ được di chuyển từ 1' đến 2' hoặc 3' trên vòng riboza được thể hiện lần lượt bằng công thức (217) hoặc (218).



(217) (218)

trong đó bazơ là bazơ axit nucleic A, U, G, C hoặc T; R là H, OH, F hoặc nhóm không flo được mô tả ở trên.

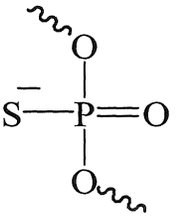
Theo một số phương án, chất tương tự nucleotit là isonucleotit, LNA, ENA, cET, UNA hoặc GNA. Theo một số phương án, mỗi nucleotit không cải biến bằng flo là nucleotit cải biến bằng metoxy, dùng để chỉ nucleotit được tạo ra bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nhóm metoxy.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, “nucleotit cải biến bằng flo”, “nucleotit cải biến bằng 2'-flo", “nucleotit trong đó 2'-hydroxy của nhóm riboza được thế bằng flo" và "nucleotit với 2'-floribosyl" có cùng nghĩa, đề cập đến nucleotit mà 2'-hydroxy của nucleotit được thế bằng flo để tạo ra cấu trúc được thể hiện bằng công thức (207). "Nucleotit cải biến bằng metoxy", “nucleotit cải biến bằng 2'-metoxy", “nucleotit trong đó 2'-hydroxy của nhóm riboza được thế bằng metoxy" và "nucleotit với 2'-metoxyribosyl" có cùng nghĩa, đề cập đến nucleotit mà 2'-hydroxy của nhóm riboza trong nucleotit được thế bằng metoxy để tạo ra cấu trúc được thể hiện bằng công thức (208).

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế là siARN có các cải biến sau đây: theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', nucleotit ở các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 trong sợi có nghĩa của siARN là nucleotitcải biến bằng flo, và nucleotit ở các vị trí còn lại trong sợi có nghĩa là nucleotit cải biến bằng metoxy; và/hoặc nucleotit ở các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 trong sợi đối nghĩa là nucleotit cải biến bằng flo, và nucleotit ở các vị trí còn lại trong sợi đối nghĩa là nucleotit cải biến bằng metoxy. Theo một số phương án, siARN theo sáng chế là siARN có các cải biến sau đây: theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', nucleotit ở các vị trí 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 trong sợi có nghĩa của siARN là nucleotit cải biến bằng flo, và nucleotit ở các vị trí còn lại trong sợi có nghĩa là nucleotit cải biến bằng metoxy; và/hoặc nucleotit ở các vị trí 2, 6, 8, 9, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 trong sợi đối nghĩa là nucleotit cải biến bằng flo, và nucleotit ở các vị trí còn lại trong sợi đối nghĩa là nucleotit cải biến bằng 2'-metoxy. Theo một số phương án, siARN theo sáng chế là siARN có các cải biến sau đây: theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', nucleotit ở các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit 1 trong sợi có nghĩa của siARN là nucleotit cải biến bằng flo, và nucleotit ở các vị trí còn lại trong sợi có nghĩa là nucleotit cải biến bằng metoxy; và/hoặc theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', nucleotit ở các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit 2 trong sợi đối nghĩa của siARN là nucleotit cải biến bằng flo, và nucleotit ở các vị trí còn lại trong sợi đối nghĩa là nucleotit cải biến bằng metoxy.

Theo một số phương án của siARN theo sáng chế, nucleotit có cải biến ở nhóm phosphat. Trong ngữ cảnh của sáng chế, cải biến ở nhóm phosphat theo một số phương

án là cải biến phosphorothioat được thể hiện bằng công thức (201) dưới đây, nghĩa là, thế nguyên tử oxy không cầu trong liên kết phosphodieste bằng nguyên tử lưu huỳnh sao cho liên kết phosphodieste được thay đổi thành liên kết phosphorothioat dieste. Theo một số phương án, cải biến này làm ổn định cấu trúc của siARN và duy trì tính đặc hiệu cao và ái lực cao cho bắt cặp bazơ.



(201)

Theo một số phương án của sáng chế, trong siARN, liên kết phosphorothioat tồn tại ở ít nhất một trong các vị trí sau đây: giữa nucleotit thứ nhất và nucleotit thứ hai từ đầu của sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa, giữa nucleotit thứ hai và nucleotit thứ ba từ đầu của sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một số phương án, liên kết phosphorothioat tồn tại ở tất cả các vị trí trên trừ đầu 5’ của sợi có nghĩa. Theo một số phương án, liên kết phosphorothioat tồn tại ở tất cả các vị trí trên trừ đầu 3’ của sợi có nghĩa. Theo một số phương án, liên kết phosphorothioat tồn tại ở ít nhất một trong các vị trí sau đây:

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

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

giữa nucleotit thứ nhất và nucleotit thứ hai từ đầu 3’ của sợi có nghĩa;

giữa nucleotit thứ hai và nucleotit thứ ba từ đầu 3’ của sợi có nghĩa;

giữa nucleotit thứ nhất và nucleotit thứ hai từ đầu 5’ của sợi đối nghĩa;

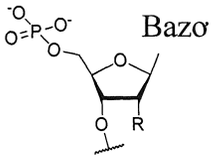
giữa nucleotit thứ hai và nucleotit thứ ba từ đầu 5’ của sợi đối nghĩa;

giữa nucleotit thứ nhất và nucleotit thứ hai từ đầu 3’ của sợi đối nghĩa; và

giữa nucleotit thứ hai và nucleotit thứ ba từ đầu 3’ của sợi đối nghĩa.

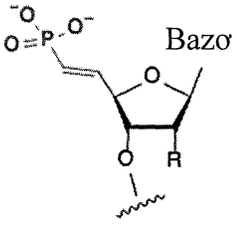
Theo một số phương án của sáng chế, nucleotit đầu tận 5’ trong trình tự sợi đối nghĩa của phân tử siARN là nucleotit 5'-phosphat hoặc nucleotit cải biến bằng chất tương tự 5'-phosphat.

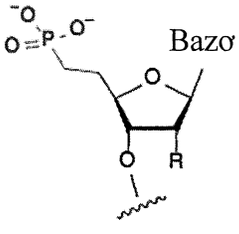
Theo một số phương án, nucleotit 5’-phosphat có cấu trúc sau đây được thể hiện bằng công thức (202):

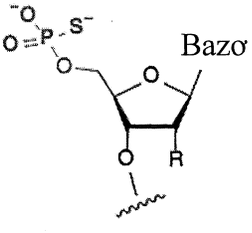


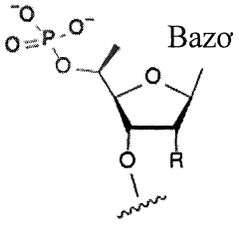
(202);

Các loại nucleotit cải biến bằng chất tương tự 5′ -phosphat thông thường là đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, 4 nucleotit sau đây được thể hiện bằng các công thức (203)-(206) được bộc lộ trong tài liệu Anastasia Khvorova and Jonathan K. Watts, The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nature Biotechnology, 2017, 35(3): 238-48:









Công thức (203) Công thức (204) Công thức (205) Công thức (206),

trong đó R là nhóm được chọn từ nhóm bao gồm H, OH, F, và metoxy;

“Bazơ” là bazơ được chọn từ A, U, C, G, hoặc T.

Theo một số phương án, nucleotit 5’-phosphat hoặc nucleotit cải biến bằng chất tương tự 5’-phosphat là nucleotit có cải biến vinyl phosphat (VP) được thể hiện bằng công thức (203), nucleotit 5'-phosphat được thể hiện bằng công thức (202) hoặc nucleotit cải biến bằng 5'-phosphorothioat được thể hiện bằng công thức (205).

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có độ ổn định trong huyết thanh cải thiện đáng kể trong khi hoạt tính làm bất hoạt

mARN đích không bị tổn hại đáng kể, mang lại hiệu quả ức chế tốt *in vivo* đối với sự biểu hiện gen. Đã thấy rằng thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có hiệu suất phân phối cao hơn *in vivo*. Do đó, theo một số phương án của sáng chế, thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế là thể tiếp hợp siARN chứa các siARN như được thể hiện trong bảng 1A-bảng 1F:

Bảng 1 trình tự siARN

Bảng 1A

Số	Hướng trình tự 5' - 3'		SEQ ID No
siHBa1	*S	CCUUGAGGCAUACUUCAAA	1
	AS	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU	2
siHBa2	S	GACCUUGAGGCAUACUUCAAA	3
	AS	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCGG	4
siHBa1M1	S	CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	5
	AS	UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	6
siHBa1M2	S	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	7
	AS	UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	8
siHBa2M1	S	GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	9
	AS	UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	10
siHBa2M2	S	GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	11
	AS	UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	12
siHBa1M1S	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13
	AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	14
siHBa1M2S	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	15

	AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	16
siHBa2M1S	S	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	17
	AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	18
siHBa2M2S	S	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	19
	AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	20
siHBa1M1P1	S	CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	5
	AS	P1-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	21
siHBa1M2P1	S	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	7
	AS	P1-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	22
siHBa2M1P1	S	GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	9
	AS	P1-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	23
siHBa2M2P1	S	GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	11
	AS	P1-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	24
siHBa1M1SP1	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13

	AS	P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	25
siHBa1M2SP1	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	15
	AS	P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	26
siHBa2M1SP1	S	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	17
	AS	P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	27
siHBa2M2SP1	S	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	19
	AS	P1-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	28

Bảng 1B

Số	Hướng trình tự 5' - 3'		SEQ ID No
siHBb1	S	UGCUAUGCCUCAUCUUCUA	29
	AS	UAGAAGAUGAGGCAUAGCAGC	30
siHBb2	S	UGCUAUGCCUCAUCUUCUA	29
	AS	UAGAAGAUGAGGCAUAGCAUU	31
siHBb1M1	S	UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	32
	AS	UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm	33
siHBb2M1	S	UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	32

	AS	UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAf UmAfGmCmAmUmUm	34
siHBb1M2	S	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmU mUmCmUmAm	35
	AS	UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfU mAfGmCmAmGmCm	36
siHBb2M2	S	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmU mUmCmUmAm	35
	AS	UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfU mAfGmCmAmUmUm	37
siHBb1M1 S	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmC mUmUmCmUmAm	38
	AS	UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCm AfUmAfGmCmAmsGmsCm	39
siHBb2M1 S	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmC mUmUmCmUmAm	38
	AS	UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCm AfUmAfGmCmAmsUmsUm	40
siHBb1M2 S	S	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCm UmUmCmUmAm	41
	AS	UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAf UmAfGmCmAmsGmsCm	42
siHBb2M2 S	S	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCm UmUmCmUmAm	41
	AS	UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAf UmAfGmCmAmsUmsUm	43
siHBb1M1 P1	S	UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCm UmUmCmUmAm	32
	AS	P1-UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAf UmAfGmCmAmGmCm	44

siHBb2M1 P1	S	UmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCm UmUmCmUmAm	32
	AS	P1-UmAfGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAf UmAfGmCmAmUmUm	45
siHBb1M2 P1	S	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmU mUmCmUmAm	35
	AS	P1-UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfU mAfGmCmAmGmCm	46
siHBb2M2 P1	S	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmU mUmCmUmAm	35
	AS	P1-UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfU mAfGmCmAmUmUm	47
siHBb1M1 SP1	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmC mUmUmCmUmAm	38
	AS	P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCm AfUmAfGmCmAmsGmsCm	48
siHBb2M1 SP1	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmC mUmUmCmUmAm	38
	AS	P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCm AfUmAfGmCmAmsUmsUm	49
siHBb1M2 SP1	S	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCm UmUmCmUmAm	41
	AS	P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAf UmAfGmCmAmsGmsCm	50
siHBb2M2 SP1	S	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCm UmUmCmUmAm	41

	AS	P1-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	51

Bảng 1C

Số	Hướng trình tự 5' - 3'		SEQ ID No
siHBc1	S	UCUGUGCCUUCUCAUCUGA	52
	AS	UCAGAUGAGAAGGCACAGACG	53
siHBc1M1	S	UmCmUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	54
	AS	UmCfAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmCmGm	55
siHBc1M2	S	UmCmUmGmUfGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	56
	AS	UmCfAmGmAmUfGmAfGfAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmCmGm	57
siHBc1M1S	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	58
	AS	UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	59
siHBc1M2S	S	UmsCmsUmGmUfGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	60
	AS	UmsCfsAmGmAmUfGmAfGfAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	61
siHBc1M1P1	S	UmCmUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	54
	AS	P1-UmCfAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmCmGm	62

siHBc1M2P1	S	UmCmUmGmUfGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	56
	AS	P1-UmCfAmGmAmUfGmAfGfAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmCmGm	63
siHBc1M1SP1	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	58
	AS	P1-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	64
siHBc1M2SP1	S	UmsCmsUmGmUfGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	60
	AS	P1-UmsCfsAmGmAmUfGmAfGfAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	65

Bảng 1D

Số	Hướng trình tự 5' - 3'		SEQ ID No
siHBd1	S	CGUGUGCACUUCGCUUCAA	66
	AS	UUGAAGCGAAGUGCACACGGU	67
siHBd1M1	S	CmGmUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	68
	AS	UmUfGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmGmUm	69
siHBd1M2	S	CmGmUmGmUfGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	70
	AS	UmUfGmAmAmGfCmGfAfAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmGmUm	71
siHBd1M1S	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	72

	AS	UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	73
siHBd1M2S	S	CmsGmsUmGmUfGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	74
	AS	UmsUfsGmAmAmGfCmGfAfAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	75
siHBd1M1P1	S	CmGmUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	68
	AS	P1-UmUfGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmGmUm	76
siHBd1M2P1	S	CmGmUmGmUfGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	70
	AS	P1-UmUfGmAmAmGfCmGfAfAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmGmUm	77
siHBd1M1SP1	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	72
	AS	P1-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	78
siHBd1M2SP1	S	CmsGmsUmGmUfGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	74
	AS	P1-UmsUfsGmAmAmGfCmGfAfAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	79

Bảng 1E

Số	Hướng trình tự 5’ - 3’		SEQ ID No
siAN1	S	CCAAGAGCACCAAGAACUA	80

	AS	UAGUUCUUGGUGCUCUUGGCU	81
siAN2	S	AGCCAAGAGCACCAAGAACUA	82
	AS	UAGUUCUUGGUGCUCUUGGCUUG	83
siAN1M1	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	84
	AS	UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	85
siAN2M1	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	86
	AS	UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	87
siAN1M2	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	84
	AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	88
siAN2M2	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	86
	AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	89
siAN1M3	S	CmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	90
	AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	88
siAN2M3	S	AmGmCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	91
	AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	89
siAN1M1S	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	92
	AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	93

siAN2M1S	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	94
	AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	95
siAN1M2S	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	92
	AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	96
siAN2M2S	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	94
	AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	97
siAN1M3S	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
	AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	96
siAN2M3S	S	AmsGmsCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	99
	AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	97
siAN1M1P1	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	84
	AS	P1-UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	100
siAN2M1P1	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	86
	AS	P1-UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	101
siAN1M2P1	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	84

	AS	P1-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	102
siAN2M2P1	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	86
	AS	P1-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	103
siAN1M3P1	S	CmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	90
	AS	P1-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	102
siAN2M3P1	S	AmGmCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	91
	AS	P1-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	103
siAN1M1SP1	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	92
	AS	P1-UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	104
siAN2M1SP1	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	94
	AS	P1-UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	105
siAN1M2SP1	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	92
	AS	P1-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	106

siAN2M2 SP1	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	94
	AS	P1-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	107
siAN1M3 SP1	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
	AS	P1-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	106
siAN2M3 SP1	S	AmsGmsCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	99
	AS	P1-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	107

Bảng 1F

Số	Hướng trình tự 5' - 3'		SEQ ID No
siAP1	S	CAAUAAAGCUGGACAAGAA	108
	AS	UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG	109
siAP2	S	CCCAAUAAAGCUGGACAAGAA	110
	AS	UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGAG	111
siAP1M1	S	CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	112
	AS	UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	113
siAP2M1	S	CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	114
	AS	UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	115

siAP1M2	S	CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	116
	AS	UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	117
siAP2M2	S	CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	118
	AS	UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	119
siAP1M1S	S	CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	120
	AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	121
siAP2M1S	S	CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	122
	AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	123
siAP1M2S	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	124
	AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	125
siAP2M2S	S	CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	126
	AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	127
siAP1M1P1	S	CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	112
	AS	P1-UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	128
siAP2M1P1	S	CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	114

	AS	P1-UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	129
siAP1M2P1	S	CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	116
	AS	P1-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	130
siAP2M2P1	S	CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	118
	AS	P1-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	131
siAP1M1SP1	S	CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	120
	AS	P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	132
siAP2M1SP1	S	CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	122
	AS	P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	133
siAP1M2SP1	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	124
	AS	P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	134
siAP2M2SP1	S	CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	126
	AS	P1-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	135

*S: Sợi có nghĩa; AS: Sợi đối nghĩa

Trong các bảng trên, chữ in hoa C, G, U, và A chỉ chế phẩm bazơ của nucleotit; chữ in thường m chỉ rằng nucleotit liền kề phía bên trái của chữ m là nucleotit cải biến bằng 2'-metoxy; chữ in thường f chỉ rằng nucleotit liền kề phía bên trái của chữ f là nucleotit cải biến bằng 2'-flo; chữ in thường s chỉ liên kết phosphorothioat giữa hai nucleotit liền kề cả hai bên của chữ s; P1 chỉ rằng nucleotit liền kề phía bên phải của P1 là nucleotit 5'-phosphat hoặc nucleotitcải biến bằng chất tương tự 5'-phosphat, và theo một số phương án là nucleotit cải biến bằng vinyl phosphat (được thể hiện là VP trong các ví dụ dưới đây), phosphat nucleotit (được thể hiện là P trong các ví dụ dưới đây) hoặc nucleotit cải biến bằng phosphorothioat (được thể hiện là P trong các ví dụ dưới đây).

Đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng nhóm nucleotit được cải biến có thể được đưa vào siARN theo sáng chế bằng monome nucleosit với cải biến tương ứng. Phương pháp điều chế monome nucleosit có cải biến tương ứng và đưa nhóm nucleotit được cải biến vào siARN cũng được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Monome nucleosit được cải biến có bán trên thị trường hoặc có thể được điều chế bằng phương pháp đã biết.

Điều chế thể tiếp hợp oligonucleotit

Thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế có thể được điều chế bằng đường tổng hợp thích hợp bất kỳ. Ví dụ, thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế có thể được điều chế bằng phương pháp bao gồm liên kết liên tiếp các monome nucleosit theo hướng 3' đến 5' theo loại nucleotit và trình tự của oligonucleotit một cách tương ứng, trong điều kiện tổng hợp pha rắn phosphoramidit, trong đó sự liên kết của mỗi monome nucleosit bao gồm phản ứng bốn bước là giải bảo vệ, ghép đôi, phủ, và oxy hóa hoặc sulfua hóa. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước cho hợp chất được thể hiện bằng công thức (321) tiếp xúc với monome nucleosit hoặc trình tự nucleotit đã liên kết với giá đỡ pha rắn trong điều kiện phản ứng ghép đôi khi có mặt chất phản ứng ghép đôi, nhờ đó liên kết hợp chất được thể hiện bằng công thức (321) với trình tự nucleotit qua phản ứng ghép đôi.

Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước giải bảo vệ nhóm bảo vệ và cắt giảm giá đỡ pha rắn, phân lập và tinh chế.

Theo một số phương án, oligonucleotit là oligonucleotit sợi kép, và phương pháp điều chế bao gồm các bước sau đây: cho hợp chất được thể hiện bằng công thức (321) tiếp xúc với monome nucleosit ở đầu 3' của sợi có nghĩa hoặc đối nghĩa trong điều kiện phản ứng ghép đôi khi có mặt chất phản ứng ghép đôi, nhờ đó liên kết hợp chất được thể hiện bằng công thức (321) với nucleotit thứ nhất theo thứ tự, liên kết liên tiếp các monome nucleosit từ 3' đến 5' để tổng hợp sợi có nghĩa hoặc đối nghĩa của oligonucleotit sợi kép, trong đó, hợp chất có công thức (321) là hợp chất trong đó R_4 chứa hydroxy được bảo vệ làm nhóm chức thứ nhất và nhóm được thể hiện bằng công thức (C1') hoặc (C3') làm nhóm chức thứ hai, hợp chất có công thức (321) được giải bảo vệ trước khi liên kết với monome nucleosit thứ nhất, và sự liên kết của mỗi monome nucleosit bao gồm phản ứng bốn bước là giải bảo vệ, ghép đôi, phủ, và oxy hóa hoặc sulfua hóa, vì vậy thu được sợi có nghĩa hoặc đối nghĩa được liên kết với phân tử tiếp hợp; liên kết liên tiếp các monome nucleosit từ 3' đến 5' để tổng hợp sợi còn lại của oligonucleotit sợi kép, trong đó sự liên kết của mỗi monome nucleosit bao gồm phản ứng bốn bước là giải bảo vệ, ghép đôi, phủ, và oxy hóa hoặc sulfua hóa; loại bỏ nhóm bảo vệ và cắt giảm giá đỡ pha rắn; thu được sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa thông qua phân lập và tinh chế; và ủ.

Theo một số phương án, oligonucleotit là oligonucleotit sợi kép, và phương pháp điều chế bao gồm các bước sau đây: liên kết liên tiếp các monome nucleosit từ 3' đến 5' để tổng hợp sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của oligonucleotit sợi kép, sự liên kết của mỗi monome nucleosit bao gồm phản ứng bốn bước là giải bảo vệ, ghép đôi, phủ, và oxy hóa hoặc sulfua hóa, vì vậy thu được sợi có nghĩa được liên kết với giá đỡ pha rắn và sợi đối nghĩa được liên kết với giá đỡ pha rắn; cho hợp chất được thể hiện bằng công thức (321) tiếp xúc với sợi có nghĩa đã liên kết với giá đỡ pha rắn hoặc sợi đối nghĩa đã liên kết với giá đỡ pha rắn trong điều kiện phản ứng ghép đôi khi có mặt chất phản ứng ghép đôi, nhờ đó liên kết hợp chất được thể hiện bằng công thức (321) với sợi có nghĩa hoặc đối nghĩa, trong đó, hợp chất có công thức (321) là hợp chất trong đó R_4 chứa nhóm phosphoramidit làm nhóm chức thứ nhất; loại bỏ nhóm bảo vệ và cắt giảm giá đỡ pha rắn, thu được sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của oligonucleotit thông qua phân lập và tinh chế, và ủ, trong đó sợi có nghĩa hoặc đối nghĩa của oligonucleotit được liên kết với phân tử tiếp hợp.

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

(1) loại bỏ nhóm bảo vệ R_k trong hợp chất có công thức (321) đã liên kết với giá đỡ pha rắn được mô tả ở trên (sau đây còn được gọi là phân tử tiếp hợp L đã liên kết với giá đỡ pha rắn); cho phân tử tiếp hợp L đã liên kết với giá đỡ pha rắn này tiếp xúc với monome nucleosit để thu được monome nucleosit được liên kết với giá đỡ pha rắn qua phân tử tiếp hợp L, trong điều kiện phản ứng ghép đôi khi có mặt chất phản ứng ghép đôi;

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

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

(4) phân lập sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của siARN và ủ chúng để thu được thể tiếp hợp siARN theo sáng chế.

Trong đó, ở bước (1), phương pháp loại bỏ nhóm bảo vệ R_k trong phân tử tiếp hợp L liên kết giá đỡ pha rắn bao gồm bước cho hợp chất có công thức (321) tiếp xúc với chất giải bảo vệ trong điều kiện giải bảo vệ. Điều kiện giải bảo vệ bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng 0-50°C, và theo một số phương án nằm trong khoảng 15-35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng 30-300 giây, và theo một số phương án nằm trong khoảng 50-150 giây. Chất giải bảo vệ có thể được chọn từ một hoặc nhiều loại trong số axit trifloaxetic, axit tricloaxetic, axit dicloaxetic, và axit monocloaxetic, và theo một số phương án là axit dicloaxetic. Tỷ lệ mol của chất giải bảo vệ với hợp chất được thể hiện bằng công thức (322) có thể nằm trong khoảng từ 10:1 đến 1000:1, và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 50:1 đến 500:1.

Điều kiện phản ứng ghép đôi và chất ghép đôi có thể là điều kiện và chất bất kỳ thích hợp cho phản ứng ghép đôi ở trên. Theo một số phương án, điều kiện và chất giống như phản ứng ghép đôi ở phương pháp tổng hợp pha rắn đã sử dụng được dùng.

Theo một số phương án, điều kiện phản ứng ghép đôi bao gồm nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng 0-50°C, và theo một số phương án nằm trong khoảng 15-35°C. Tỷ lệ mol của hợp chất có công thức (321) với monome nucleosit có thể nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:50, và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 1:2 đến 1:5. Tỷ lệ mol của hợp chất có công thức (322) với chất ghép đôi có thể nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:50, và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 1:3 đến 1:10. Thời gian phản ứng có thể nằm trong khoảng 200-3000 giây, và theo một số phương án nằm trong khoảng 500-1500 giây. Chất ghép đôi có thể được chọn từ một hoặc nhiều loại trong số 1H-tetrazol, 5-etylthio-1H-tetrazol và 5-benzylthio-1H-tetrazol, và theo một số phương án là 5-etylthio-1H-tetrazol. Phản ứng ghép đôi có thể được thực hiện trong dung môi hữu cơ. Dung môi hữu cơ có thể được chọn từ một hoặc nhiều loại trong số axetonitril khan, DMF khan và diclometan khan, và theo một số phương án là axetonitril khan. Lượng dung môi hữu cơ có thể nằm trong khoảng 3-50 L/mol, và theo một số phương án nằm trong khoảng 5-20 L/mol đối với hợp chất được thể hiện bằng công thức (321).

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

Các điều kiện khác để tổng hợp pha rắn được mô tả ở các bước (2) và (3) bao gồm điều kiện giải bảo vệ cho monome nucleosit, loại và lượng chất giải bảo vệ, điều kiện phản ứng ghép đôi, loại và lượng chất ghép đôi, điều kiện phản ứng phủ, loại và lượng chất phủ, điều kiện phản ứng oxy hóa, loại và lượng chất oxy hóa, điều kiện phản ứng sulfua hóa, và loại và lượng chất sulfua hóa, các chất, lượng, và điều kiện khác nhau thường được dùng trong lĩnh vực kỹ thuật này được sử dụng trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, ví dụ, quy trình tổng hợp pha rắn được mô tả ở các bước (2) và (3) có thể sử dụng điều kiện sau đây:

Điều kiện giải bảo vệ cho monome nucleosit bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng 0-50°C, và theo một số phương án, nằm trong khoảng 15-35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng 30-300 giây, và theo một số phương án, nằm trong khoảng 50-150

giây. Chất giải bảo vệ có thể được chọn từ một hoặc nhiều loại trong số axit trifloaxetic, axit tricloaxetic, axit dicloaxetic, và axit monocloaxetic, và theo một số phương án là axit dicloaxetic. Tỷ lệ mol của chất giải bảo vệ với nhóm bảo vệ của 4,4′ -dimetoxytrityl trên giá đỡ pha rắn có thể nằm trong khoảng từ 2:1 đến 100:1, và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 3:1 đến 50:1.

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

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

Điều kiện phản ứng oxy hóa bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng 0-50°C, và theo một số phương án nằm trong khoảng 15-35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng 1-100 giây, và theo một số phương án, nằm trong khoảng 5-50 giây. Theo một số phương án, chất oxy hóa là iot (và theo phương án khác được đề xuất là nước iot). Tỷ lệ mol của chất oxy hóa với trình tự axit nucleic liên kết với giá đỡ pha rắn ở bước ghép đôi có thể nằm trong khoảng từ 1:1 đến 100:1, và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 5:1 đến 50:1. Theo một số phương án, phản ứng oxy hóa được thực hiện trong dung môi hỗn hợp của tetrahydrofuran:nước:pyridin = 3:1:1-1:1:3. Điều kiện phản ứng sulfua hóa bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng 0-50°C, và theo một số phương án, nằm trong

khoảng 15-35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng 50-2000 giây, và theo một số phương án, nằm trong khoảng 100-1000 giây. Theo một số phương án, chất sulfua hóa là xanthan hydrit. Tỷ lệ mol của chất sulfua hóa với trình tự axit nucleic liên kết với giá đỡ pha rắn ở bước ghép đôi có thể nằm trong khoảng từ 10:1 đến 1000:1, và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 10:1 đến 500:1. Theo một số phương án, phản ứng sulfua hóa được thực hiện trong dung môi hỗn hợp của axetonitril:pyridin = 1:3-3:1.

Theo phương pháp được đề cập trong bản mô tả này, phương pháp này còn bao gồm bước phân lập sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của siARN sau khi liên kết tất cả các monome nucleosit và trước khi ủ. Phương pháp phân lập là đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và thường bao gồm bước loại bỏ trình tự nucleotit đã tổng hợp khỏi giá đỡ pha rắn, giải bảo vệ bazơ, nhóm phosphat và phối tử, và tinh chế và khử muối.

Trình tự nucleotit đã tổng hợp có thể được phân cắt từ giá đỡ pha rắn, và nhóm bảo vệ trên bazơ, nhóm phosphat và phối tử được loại bỏ, theo phương pháp phân cắt và giải bảo vệ thông thường trong tổng hợp siARN. Ví dụ, trình tự nucleotit thu được đã liên kết với giá đỡ pha rắn được cho tiếp xúc với dung dịch amoniac nước đậm đặc; trong bước giải bảo vệ, nhóm bảo vệ $YCOO^-$ trong nhóm A46-A54 được chuyển đổi thành nhóm hydroxyl, vì vậy nhóm S_1 được chuyển đổi thành nhóm M_1tương ứng, tạo ra thể tiếp hợp được thể hiện bằng công thức (1). Trong trường hợp này, dung dịch amoniac nước đậm đặc có thể là dung dịch amoniac nước với nồng độ 25-30% khối lượng. Lượng dung dịch amoniac nước đậm đặc có thể nằm trong khoảng 0,2 ml/μmol-0,8 ml/μmol đối với trình tự siARN đích.

Khi có ít nhất một sự bảo vệ 2'-TBDMS trên trình tự nucleotit đã tổng hợp, thì phương pháp này còn bao gồm bước cho trình tự nucleotit đã loại bỏ khỏi giá đỡ pha rắn tiếp xúc với trietylamin trihydroflorua để loại bỏ sự bảo vệ 2'-TBDMS. Trong bản mô tả này, trình tự siARN đích thu được có 2'-hydroxy tự do ở nucleosit tương ứng. Lượng trietylamin trihydroflorua tinh khiết đối với trình tự siARN đích có thể nằm trong khoảng 0,4 ml/μmol - 1,0 ml/μmol. Như vậy, có thể thu được thể tiếp hợp siARN theo sáng chế.

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

Trong quy trình tổng hợp, độ tinh khiết và phân tử lượng của trình tự axit nucleic có thể được xác định bất cứ lúc nào, để kiểm soát chất lượng tổng hợp một cách thuận lợi hơn. Các phương pháp này là đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, độ tinh khiết của axit nucleic có thể được xác định bằng sắc ký trao đổi ion, và phân tử lượng có thể được xác định bằng sắc ký lỏng - khối phổ (LC-MS).

Phương pháp ủ cũng đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, sợi có nghĩa đã tổng hợp (sợi S) và sợi đối nghĩa (sợi AS) có thể được trộn một cách đơn giản vào nước dùng cho tiêm theo tỷ lệ đẳng mol, làm nóng đến 70-95°C, và sau đó làm mát ở nhiệt độ phòng để tạo thành cấu trúc sợi kép qua liên kết hydro. Vì thế, có thể thu được thể tiếp hợp siARN theo sáng chế theo đó.

Sau khi thu được thể tiếp hợp theo sáng chế, theo một số phương án, thể tiếp hợp siARN được tổng hợp theo đó cũng có thể được mô tả đặc điểm bằng cách sử dụng công cụ như LC-MS theo phương pháp như phát hiện theo phân tử lượng, để xác nhận rằng thể tiếp hợp siARN đã tổng hợp là thể tiếp hợp siARN đích được thiết kế và trình tự siARN đã tổng hợp là trình tự siARN mong muốn, ví dụ, là một trong các trình tự được liệt kê trong bảng 1 ở trên.

Sử dụng thể tiếp hợp theo sáng chế

Như được bộc lộ trong bản mô tả này, thể tiếp hợp này hữu ích để phân phối đến tế bào một số hoạt chất nhất định để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh lý mà việc phân phối này có thể mong muốn ở đó. Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết bất kỳ, tin rằng sự sắp xếp trong không gian của phân tử tiếp hợp đặc biệt hiệu quả trong việc nhắm đích thụ thể bề mặt tế bào, và do đó mang hoạt chất đã nạp tiếp xúc

với tế bào đó. Theo một số phương án, thể tiếp hợp này là thể tiếp hợp oligonucleotit nhắm đích tế bào gan.

Theo một số phương án, thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế có tính đặc hiệu nhắm đích gan ưu việt, và do đó có thể phân phối một cách hiệu quả oligonucleotit chức đã tiếp hợp vào gan, nhờ đó điều hòa hiệu quả sự biểu hiện của gen đặc hiệu trong tế bào gan. Vì vậy, thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế có triển vọng ứng dụng rộng rãi.

Theo một số phương án của sáng chế, được đề cập trong bản mô tả này là việc sử dụng thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế để bào chế thuốc để điều trị và/hoặc ngăn ngừa các tình trạng bệnh lý hoặc bệnh gây ra do sự biểu hiện của gen đặc hiệu trong tế bào gan. Gen đặc hiệu này có thể là gen nội sinh được biểu hiện trong gan hoặc gen gây bệnh tái sinh trong gan. Theo một số phương án, gen đặc hiệu là chẳng hạn như ApoB, ApoC, ANGPTL3, PCSK9, SCD1, TIMP-1, Col1A1, FVII, STAT3, p53, HBV hoặc HCV. Theo một số phương án, gen đặc hiệu này là gen HBV, gen ANGPTL3, hoặc gen APOC3. Tương ứng, bệnh được chọn từ bệnh gan mạn tính, viêm gan, xơ gan, bệnh tăng sinh gan và rối loạn lipit máu. Theo một số phương án, rối loạn lipit máu là tăng cholesterol máu, tăng triglyxerit máu và xơ vữa động mạch.

Theo một số phương án của sáng chế, được đề cập trong bản mô tả này là phương pháp điều trị các tình trạng bệnh lý hoặc bệnh gây ra do sự biểu hiện của gen đặc hiệu trong tế bào gan, bao gồm bước sử dụng thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế cho đối tượng cần điều trị. Theo một số phương án, gen đặc hiệu là chẳng hạn như ApoB, ApoC, ANGPTL3, PCSK9, SCD1, TIMP-1, Col1A1, FVII, STAT3, p53, HBV hoặc HCV. Theo một số phương án, gen đặc hiệu này được chọn từ gen HBV, gen ANGPTL3, và gen APO C3. Tương ứng, bệnh được chọn từ bệnh gan mạn tính, viêm gan, xơ gan, bệnh tăng sinh gan và rối loạn lipit máu. Theo một số phương án, rối loạn lipit máu là tăng cholesterol máu, tăng triglyxerit máu và xơ vữa động mạch. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được đề cập theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để điều trị các bệnh gan khác, bao gồm bệnh đặc trưng bởi sự tăng sinh tế bào không mong muốn, bệnh máu, bệnh trao đổi chất, và bệnh đặc trưng bởi sự viêm. Bệnh tăng sinh của gan có thể là bệnh lành tính hoặc ác tính như ung thư, caxinom tế bào gan (HCC), di căn gan hoặc u nguyên

bào gan. Bệnh viêm hoặc huyết học ở gan có thể là bệnh liên quan đến các yếu tố đông máu, viêm qua trung gian bổ thể hoặc xơ hóa. Bệnh chuyển hóa của gan bao gồm rối loạn lipit máu và điều hòa glucoza không đều. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước sử dụng một hoặc nhiều oligonucleotit có mức độ tương đồng cao với các trình tự gen tham gia gây bệnh gan.

Theo một số phương án của sáng chế, được đề cập trong bản mô tả này là phương pháp ức chế sự biểu hiện của gen đặc hiệu trong tế bào gan, bao gồm bước cho thể tiếp hợp siARN theo sáng chế tiếp xúc với tế bào gan.

Mục đích ngăn ngừa và/hoặc điều trị các tình trạng bệnh lý hoặc bệnh gây ra do sự biểu hiện của gen đặc hiệu trong tế bào gan có thể đạt được thông qua cơ chế điều hòa sự biểu hiện gen bằng cách sử dụng thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế cho đối tượng cần điều trị. Do đó, thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế có thể được sử dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị các tình trạng bệnh lý hoặc bệnh được bộc lộ trong bản mô tả này, hoặc để bào chế thuốc để ngăn ngừa và/hoặc điều trị các tình trạng bệnh lý hoặc bệnh được bộc lộ trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "sử dụng" và các dạng tương đương về mặt ngữ pháp của nó đề cập đến việc phân phối thể tiếp hợp như thể tiếp hợp oligonucleotit vào cơ thể của đối tượng bằng phương pháp hoặc đường mà sẽ định vị ít nhất một phần thể tiếp hợp này ở vị trí mong muốn để đem lại tác dụng mong muốn. Đường sử dụng thích hợp cho phương pháp theo sáng chế bao gồm nhưng không giới hạn ở sử dụng tại chỗ và sử dụng toàn thân. Nhìn chung, việc sử dụng tại chỗ dẫn đến việc phân phối thể tiếp hợp oligonucleotit đến một vị trí cụ thể nhiều hơn so với khi tuần hoàn toàn thân đối tượng; trong khi đó việc sử dụng toàn thân dẫn đến việc phân phối thể tiếp hợp oligonucleotit để tuần hoàn toàn thân bệnh nhân. Theo một số phương án, chế độ sử dụng có khả năng phân phối thuốc đến gan được sử dụng, có cân nhắc đến việc mục đích của sáng chế là nhằm tạo ra phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị các tình trạng bệnh lý hoặc bệnh gây ra do sự biểu hiện của gen đặc hiệu trong tế bào gan.

Việc sử dụng cho bệnh nhân có thể được thực hiện bằng đường thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm nhưng không giới hạn ở đường dùng qua miệng và ngoài đường tiêu hóa, như sử dụng trong tĩnh mạch, sử dụng trong cơ, sử dụng

dưới da, sử dụng qua da, sử dụng trong khí quản (khí dung), sử dụng trong phổi, sử dụng qua đường mũi, sử dụng qua đường trực tràng và sử dụng tại chỗ (bao gồm sử dụng trong má và sử dụng dưới lưỡi). Tần suất sử dụng có thể là một lần hoặc nhiều lần mỗi ngày, hằng tuần, hai tuần một lần, hằng tháng hoặc hằng năm.

Liều thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế có thể là liều thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này, có thể được xác định theo các thông số khác nhau, đặc biệt là độ tuổi, cân nặng, và giới tính của bệnh nhân. Độc tính và độ hiệu nghiệm có thể được đo trong giống cấy tế bào hoặc động vật thử nghiệm theo quy trình dược tiêu chuẩn, ví dụ, bằng cách xác định LD50 (liều gây chết gây tử vong 50% dân số) và ED50 (liều có thể gây ra 50% cường độ đáp ứng tối đa trong đáp ứng được phân loại, và khiến cho 50% đối tượng thử nghiệm có đáp ứng tích cực trong đáp ứng định tính). Khoảng liều cho người có thể thu được dựa trên dữ liệu thu được từ thử nghiệm nuôi cấy tế bào và nghiên cứu ở động vật.

Khi sử dụng thể tiếp hợp theo sáng chế, ví dụ, cho chuột nhắt C57BL/6J hoặc C3H/HeNCrlVr, đực hoặc cái, 6-12 tuần tuổi, trọng lượng cơ thể 18-25 g, để phân phối thể tiếp hợp oligonucleotit tạo ra bởi oligonucleotit chức và phân tử tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này, lượng oligonucleotit cần được phân phối bởi thể tiếp hợp có thể nằm trong khoảng 0,001-100 mg/kg trọng lượng cơ thể, và theo một số phương án nằm trong khoảng 0,01-50 mg/kg trọng lượng cơ thể, và theo các phương án khác nằm trong khoảng 0,05-20 mg/kg trọng lượng cơ thể, và theo các phương án khác nữa nằm trong khoảng 0,1-15 mg/kg trọng lượng cơ thể, và theo các phương án khác nữa nằm trong khoảng 0,1-10 mg/kg trọng lượng cơ thể, như được tính bởi lượng oligonucleotit trong thể tiếp hợp oligonucleotit. Khi sử dụng thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế, thì các lượng trên được ưu tiên.

Ngoài ra, mục đích ức chế sự biểu hiện của gen đặc hiệu trong tế bào gan cũng có thể đạt được thông qua cơ chế điều hòa sự biểu hiện gen bằng cách đưa thể tiếp hợp oligonucleotit theo sáng chế vào tế bào gan có sự biểu hiện bất thường của gen đặc hiệu. Theo một số phương án, tế bào gan là tế bào viêm gan, và theo một số phương án là tế bào HepG2.2.15. Theo một số phương án, tế bào gan có thể được chọn từ dòng tế bào u

gan như Hep3B, HepG2 hoặc Huh7, và tế bào gan sơ cấp đã được phân lập, và theo một số phương án là tế bào u gan Huh7.

Trong trường hợp mà sự biểu hiện của gen đặc hiệu trong tế bào gan bị ức chế bằng cách sử dụng phương pháp được đề cập theo sáng chế, thì lượng oligonucleotit chức trong thể tiếp hợp oligonucleotit đã đề cập dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này theo các tác dụng mong muốn. Ví dụ, theo một số phương án trong đó thể tiếp hợp oligonucleotit là thể tiếp hợp siARN, thì lượng siARN trong thể tiếp hợp siARN đã đề cập là lượng đủ để làm giảm sự biểu hiện của gen đích và dẫn đến nồng độ ngoại bào nằm trong khoảng từ 1 pM đến 1 μM, hoặc nằm trong khoảng từ 0,01 nM đến 100 nM, hoặc nằm trong khoảng từ 0,05 nM đến 50 nM hoặc nằm trong khoảng từ 0,05 nM đến 5 nM. Lượng bắt buộc để đạt được nồng độ cục bộ này sẽ thay đổi với các yếu tố khác nhau, bao gồm phương pháp phân phối, vị trí phân phối, số lớp tế bào giữa vị trí phân phối và tế bào hoặc mô đích, đường phân phối (tại chỗ hoặc toàn thân), v.v.. Nồng độ ở vị trí phân phối có thể cao hơn đáng kể so với trên bề mặt tế bào hoặc mô đích.

Tác dụng có lợi

Theo một số phương án, thể tiếp hợp được đề cập theo sáng chế có hiệu suất phân phối oligonucleotit *in vivo* cao hơn, độc tính thấp hơn, độ ổn định tốt hơn và/hoặc hoạt tính cao hơn. Theo một số phương án, thể tiếp hợp đượcbộc lộ trong bản mô tả này có tỷ lệ ức chế sự biểu hiện gen đích ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có tỷ lệ ức chế sự biểu hiện gen HBV ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có tỷ lệ ức chế sự biểu hiện gen HBV trong gan ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có tỷ lệ ức chế sự biểu hiện gen HBV trong gan ở các mô hình động vật ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có tỷ lệ ức chế sự biểu hiện gen HBV ở đối tượng người ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có tỷ lệ ức chế sự

biểu hiện của kháng nguyên bề mặt HBV ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có tỷ lệ ức chế sự biểu hiện gen ANGPTL3 ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có tỷ lệ ức chế sự biểu hiện gen ANGPTL3 trong gan ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có tỷ lệ ức chế sự biểu hiện gen ANGPTL3 trong gan ở các mô hình động vật ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có tỷ lệ ức chế sự biểu hiện gen ANGPTL3 ở đối tượng người ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có tỷ lệ ức chế sự biểu hiện gen ApoC3 ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có tỷ lệ ức chế sự biểu hiện gen ApoC3 trong gan ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có tỷ lệ ức chế sự biểu hiện gen ApoC3 trong gan ở mẫu động vật ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có tỷ lệ ức chế sự biểu hiện gen ApoC3 ở đối tượng người ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95%. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này không có tác dụng ngoài đích đáng kể. Tác dụng ngoài đích có thể là, ví dụ, ức chế sự biểu hiện gen mà không phải là gen đích. Được coi là không đáng kể nếu mức liên kết/ức chế sự biểu hiện gen ngoài đích là ở mức thấp hơn 50%, 40%, 30%, 20%, hoặc 10% của tác dụng trúng đích.

Theo một số phương án của sáng chế, thể tiếp hợp được đề cập theo sáng chế phân phối một cách hiệu quả siARN đến gan, và có đặc tính ức chế sự biểu hiện gen HBV ưu việt, ví dụ, tỷ lệ ức chế nằm trong khoảng 87,4%-92,2% sự biểu hiện gen HBV trong gan của mô hình chuột nhắt HBV ở liều 1 mg/kg, cùng với tác dụng ngoài đích thấp. Theo một số phương án, thể tiếp hợp theo sáng chế làm giảm một cách hiệu quả sự biểu hiện của kháng nguyên bề mặt HBV ở mô hình chuột nhắt HBV và đạt được tỷ

lệ ức chế là 96,9% đối với sự biểu hiện kháng nguyên bề mặt HBV và tỷ lệ ức chế là 95,4% đối với HBV ADN ở liều 3 mg/kg. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được đề cập theo sáng chế có tác dụng ức chế ưu việt đến sự biểu hiện HBV ở liều thấp trong khoảng thời gian lên tới 140 ngày.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp được đề cập theo sáng chế phân phối một cách hiệu quả siARN đến gan, và có đặc tính ức chế sự biểu hiện gen HBV ưu việt, ví dụ, tỷ lệ ức chế ít nhất là 69,3%, hoặc nằm trong khoảng 78,1%-89,1% sự biểu hiện gen HBV trong gan của mô hình chuột nhắt HBV ở liều 1 mg/kg, cùng với tác dụng ngoài đích thấp. Theo một số phương án, thể tiếp hợp theo sáng chế làm giảm một cách hiệu quả sự biểu hiện của kháng nguyên bề mặt HBV ở mô hình chuột nhắt HBV và đạt được tỷ lệ ức chế là 98,4% đối với sự biểu hiện kháng nguyên bề mặt HBV và tỷ lệ ức chế là 95,8% đối với HBV ADN ở liều 3 mg/kg. Theo một số phương án, thể tiếp hợp đặc hiệu được đề cập theo sáng chế có tác dụng ức chế ưu việt đến sự biểu hiện HBV ở liều thấp trong khoảng thời gian lên tới 84 ngày, so với thể tiếp hợp tham chiếu.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp được đề cập theo sáng chế phân phối một cách hiệu quả siARN đến gan, và có đặc tính ức chế sự biểu hiện gen HBV ưu việt, ví dụ, tỷ lệ ức chế ít nhất là 48,5%, hoặc nằm trong khoảng 76,8%-80,0% sự biểu hiện gen HBV trong gan của mô hình chuột nhắt HBV ở liều 1 mg/kg, cùng với tác dụng ngoài đích thấp. Theo một số phương án, thể tiếp hợp theo sáng chế cũng làm giảm một cách hiệu quả sự biểu hiện của kháng nguyên bề mặt HBV ở mô hình chuột nhắt HBV và đạt được tỷ lệ ức chế là 84,6% đối với sự biểu hiện kháng nguyên bề mặt HBV và tỷ lệ ức chế là 85,6% đối với HBV ADN thậm chí ở liều 3 mg/kg. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được đề cập theo sáng chế có tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện HBV ở liều thấp trong khoảng thời gian 21 ngày, cao hơn so với thể tiếp hợp tham chiếu.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp được đề cập theo sáng chế phân phối một cách hiệu quả siARN đến gan, và có đặc tính ức chế sự biểu hiện gen HBV ưu việt, ví dụ, tỷ lệ ức chế ít nhất là 60,1%, hoặc theo một số phương án, nằm trong khoảng 80,7%-84,5% sự biểu hiện gen của vùng gen HBV X trong gan của mô hình chuột nhắt HBV ở liều 1 mg/kg, cùng với tác dụng ngoài đích thấp. Theo một số phương án, thể tiếp hợp theo sáng chế cũng làm giảm một cách hiệu quả sự biểu hiện của kháng nguyên

bề mặt HBV trong mô hình chuột nhắt HBV và đạt được tỷ lệ ức chế là 94,8% đối với sự biểu hiện kháng nguyên bề mặt HBV và tỷ lệ ức chế là 95,8% đối với HBV ADN thậm chí ở liều 3 mg/kg. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được đề cập theo sáng chế có tác dụng ức chế ưu việt đối với sự biểu hiện HBV ở liều thấp trong khoảng thời gian lên tới 56 ngày, so với thể tiếp hợp tham chiếu.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp được đề cập theo sáng chế có thể phân phối một cách hiệu quả siARN đến gan, và có đặc tính ức chế sự biểu hiện gen ANGPTL3 ưu việt, ví dụ, tỷ lệ ức chế ít nhất là 57,3% sự biểu hiện gen ANGPTL3 trong gan của mô hình chuột nhắt chất béo cao ở liều 1 mg/kg và lên đến 90,4% ở liều 3 mg/kg. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được đề cập theo sáng chế có tác dụng ức chế sự biểu hiện ANGPTL3 và hạ đường huyết ưu việt ở liều thấp và tần suất sử dụng thấp trong thời gian lên tới 49 ngày, so với thể tiếp hợp tham chiếu.

Theo một phương án của sáng chế, thể tiếp hợp được đề cập theo sáng chế phân phối một cách hiệu quả siARN đến gan, và có đặc tính ức chế sự biểu hiện gen ApoC3 ưu việt, ví dụ, tỷ lệ ức chế ít nhất là 75% sự biểu hiện gen ANGPTL3 trong gan của mô hình chuột nhắt chất béo cao ở liều 3 mg/kg. Theo một số phương án, thể tiếp hợp được đề cập theo sáng chế có tác dụng ức chế ưu việt đối với lipit máu ở liều lượng thấp và tần suất sử dụng thấp trong thời gian lên đến 65 ngày, so với thể tiếp hợp tham chiếu.

Theo một số phương án, thể tiếp hợp được mô tả theo sáng chế có độc tính thấp ở mô hình động vật, chỉ báo độ an toàn tốt. Ví dụ, theo một số phương án, không có đáp ứng độc hại rõ ràng được quan sát thấy ngay cả khi thể tiếp hợp theo sáng chế được sử dụng cho chuột nhắt C57BL/6J với nồng độ lên đến gấp 100 lần nồng độ có tác dụng (3 mg/kg đối với nồng độ có tác dụng).

Trường hợp trên minh họa thể tiếp hợp được đề cập trong bản mô tả này có hiệu quả đối với thụ thể bề mặt tế bào đích và phân phối hoạt chất đã nạp đến tế bào biểu hiện thụ thể đó. Dự tính rằng phân tử tiếp hợp này có thể được biến đổi phù hợp cho thụ thể bề mặt tế bào bổ sung và hoạt chất bổ sung để nhắm đích hoạt chất đó đến tế bào biểu hiện các thụ thể này.

Kit

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kit bao gồm thể tiếp hợp như được mô tả ở trên.

Theo một số phương án, kit được đề cập trong bản mô tả này bao gồm thể tiếp hợp trong một vật chứa. Theo một số phương án, kit được đề cập trong bản mô tả này bao gồm vật chứa chứa tá dược dược dụng. Theo một số phương án, kit được đề cập trong bản mô tả này còn bao gồm tá dược dược dụng, như chất ổn định hoặc chất bảo quản. Theo một số phương án, kit được đề cập trong bản mô tả này bao gồm ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Theo một số phương án, kit này bao gồm ít nhất một chất trị liệu bổ sung ở vật chứa khác với vật chứa chứa thể tiếp hợp được đề cập trong bản mô tả này. Theo một số phương án, kit này bao gồm hướng dẫn trộn thể tiếp hợp với các tá dược dược dụng hoặc các thành phần khác (nếu có).

Trong kit theo sáng chế, thể tiếp hợp và/hoặc tá dược dược dụng có thể được cung cấp ở dạng bất kỳ, ví dụ, ở dạng lỏng, dạng khô, hoặc dạng đông khô. Theo một số phương án, thể tiếp hợp và/hoặc tá dược dược dụng gần như là tinh khiết và/hoặc vô trùng. Theo một số phương án, nước vô trùng có thể được cung cấp trong kit theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

Tế bào HEK293A được cung cấp bởi phòng thí nghiệm công nghệ axit nucleic, Viện Y học Phân tử, đại học Peking và được nuôi cấy bằng môi trường hoàn chỉnh DMEM (Hyclone company) chứa huyết thanh bào thai bò 20% (FBS, Hyclone company), xyanomyxin biresistant 0,2% thể tích (penixilin-streptomyxin, Gibco, Invitrogen company) ở 37°C trong tủ ủ chứa 5% CO2/95% không khí.

Tế bào Huh7 được mua từ Ngân hàng tế bào gốc thuộc Học viện Khoa học Trung Hoa và được nuôi cấy bằng môi trường hoàn chỉnh DMEM (Hyclone company) chứa huyết thanh bào thai bò 10% (FBS, Hyclone company), axit amin không thiết yếu 1% (NEAA, Corning company) ở 37°C trong tủ ủ chứa 5% CO2/95% không khí.

Trừ khi có quy định khác, LipofectamineTM2000 (Invitrogen company) được sử dụng làm chất phản ứng chuyển nhiễm khi tế bào được chuyển nhiễm với thể tiếp hợp siARN được tổng hợp trong các ví dụ điều chế 12-15 dưới đây. Thao tác chi tiết được thực hiện dựa trên hướng dẫn được cung cấp bởi nhà sản xuất.

Trừ khi có quy định khác, tất cả các tỷ lệ của chất phản ứng được đề cập dưới đây đều được tính theo tỷ lệ thể tích (thể tích/thể tích).

Trừ khi có quy định khác, các mô hình động vật được sử dụng là như sau:

Chuột nhắt C57BL/6J: mua từ Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.;

Chuột cống SD: được cung cấp bởi Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.;

Chuột nhắt chuyển gen HBV C57B/6N-Tg (1.28 HBV)/Vst (kiểu gen A), mua từ Beijing Vitalstar Biotechnology Co., Ltd.. Chuột nhắt với COI>10^4 (dưới đây gọi tắt là chuột nhắt bản sao 1.28) được chọn trước thử nghiệm;

Chuột nhắt chuyển gen HBV C57BL/6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri/J: mua từ ban khoa học động vật thí nghiệm, Trung tâm Khoa học Y tế Đại học Peking. Chuột nhắt có S/COV>10 được chọn trước thử nghiệm;

Chuột nhắt chuyển gen HBV: được đặt tên là M-TgHBV, mua từ ban động vật, Trung tâm Y tế Cộng đồng Thượng Hải. Phương pháp chuẩn bị chuột nhắt chuyển gen được mô tả trong tài liệu Ren J. et al., in J. Medical Virology. 2006, 78:551-560;

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

rAAV8-1.3HBV được pha loãng đến 5×10^{11} v.g./mL với PBS vô trùng. 200 µL rAAV8-1.3HBV đã pha loãng được tiêm vào mỗi con chuột nhắt, tức là, 1×10^{11} v.g. trên mỗi con chuột nhắt. Máu (khoảng 100 µL) được lấy từ hốc mắt của tất cả các con chuột nhắt vào ngày 28 sau khi tiêm virut để gom huyết thanh để phát hiện ra HBsAg và HBV ADN;

Chuột nhắt chuyển gen AAV-HBV nồng độ thấp: Sử dụng phương pháp xây dựng mô hình gần giống như ở trên, khác nhau ở chỗ virut được pha loãng đến 1×10^{11} v.g./mL với PBS vô trùng trước thử nghiệm. 100 µL virut được tiêm vào mỗi con chuột nhắt, tức là, 1×10^{10} v.g. trên mỗi con chuột nhắt;

Chuột nhắt BALB/c: 6-8 tuần tuổi, mua từ Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.;

Chuột nhắt ob/ob: 6-8 tuần tuổi, mua từ Changzhou Cavens Laboratory Animal Co., Ltd.;

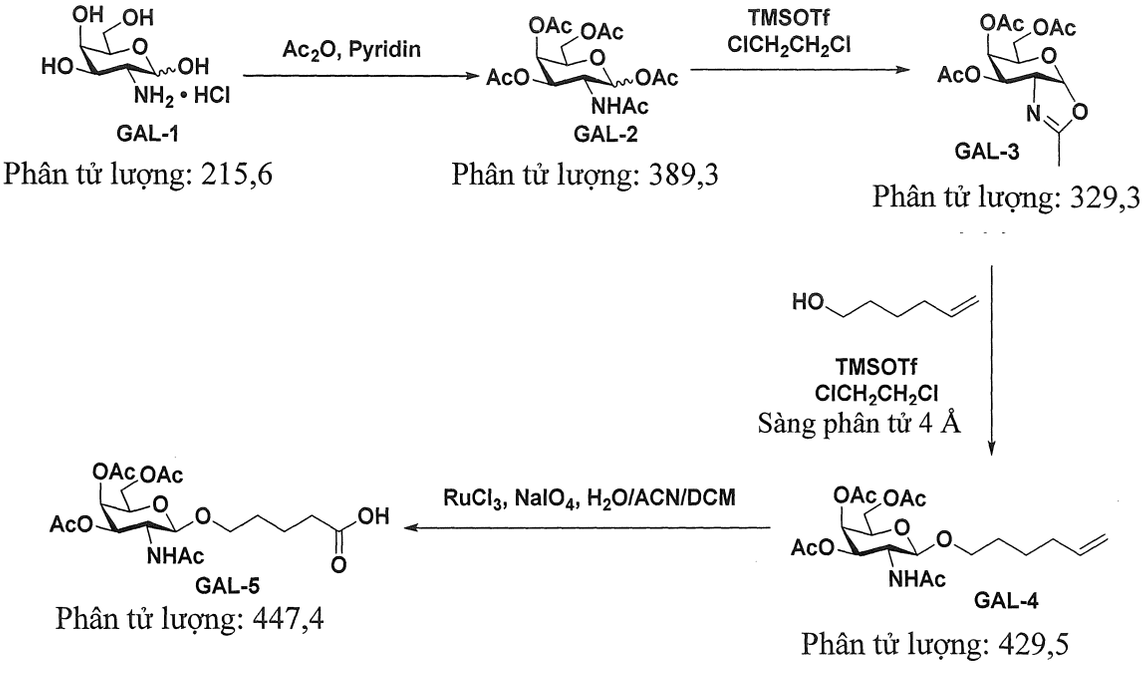
Chuột nhắt chuyển gen APOC3 của người: B6; CBA-Tg(APOC3)3707Bres/J, mua từ Jackson Lab;

Khỉ có hội chứng chuyển hóa: Tất cả đều là con đực, được cung cấp bởi trung tâm nghiên cứu động vật linh trưởng không phải người, Viện Y học Phân tử, Đại học Peking;

Ví dụ điều chế 1 Điều chế phân tử tiếp hợp L-9 (phân tử tiếp hợp 1)

Trong ví dụ điều chế này, phân tử tiếp hợp 1 (sau đây còn được gọi là phân tử tiếp hợp L-9) được tổng hợp theo phương pháp sau đây.

(1-1) Tổng hợp GAL-5 (phân tử ở mảnh đầu của phân tử tiếp hợp L-9)



(1-1a) Tổng hợp GAL-2

100,0 g GAL-1 (N-axetyl-D-galactosamin hydroclorua, CAS số: 1772-03-8, mua từ Ning Bo hongxiang bio-chem Co., Ltd., 463,8 mmol) được hòa tan trong 1000 ml pyridin khan, mà 540 ml anhydrit axetic (mua từ Enox Inc., 5565,6 mmol) được bổ sung vào trong bể nước đá để phản ứng trong 1,5 giờ trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng. Dung dịch phản ứng thu được được đổ vào 10L nước đá và lọc hút trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được rửa bằng 2L nước đá, và sau đó thêm vào dung môi axetonitril/toluen hỗn hợp (thể tích/thể tích của axetonitril:toluen = 1:1) cho tới khi hoàn toàn được hòa tan. Dung môi được làm bay hơi để tạo ra 130,0 g sản phẩm GAL-2 dưới dạng chất rắn màu trắng.

(1-1b) Tổng hợp GAL-3

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

400 ml diclometan được bổ sung vào dung dịch phản ứng để pha loãng, được lọc bằng diatomit, và sau đó 1L dung dịch natri bicacbonat nước bão hòa được bổ sung vào dung dịch phản ứng thu được và khuấy đều. Pha hữu cơ được phân lập. Pha nước còn

lại được chiết hai lần, mỗi lần bằng 300 ml dicloetan, và tất cả các pha hữu cơ được kết hợp và rửa bằng 300 ml dung dịch natri bicacbonat nước bão hòa và 300 ml nước muối bão hòa, một cách tương ứng. Pha hữu cơ thu được từ bước rửa được phân lập và sấy khô với natri sunfat khan. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 26,9 g sản phẩm GAL-3 dưới dạng xi-rô nhớt màu vàng nhạt.

(1-1c) Tổng hợp GAL-4

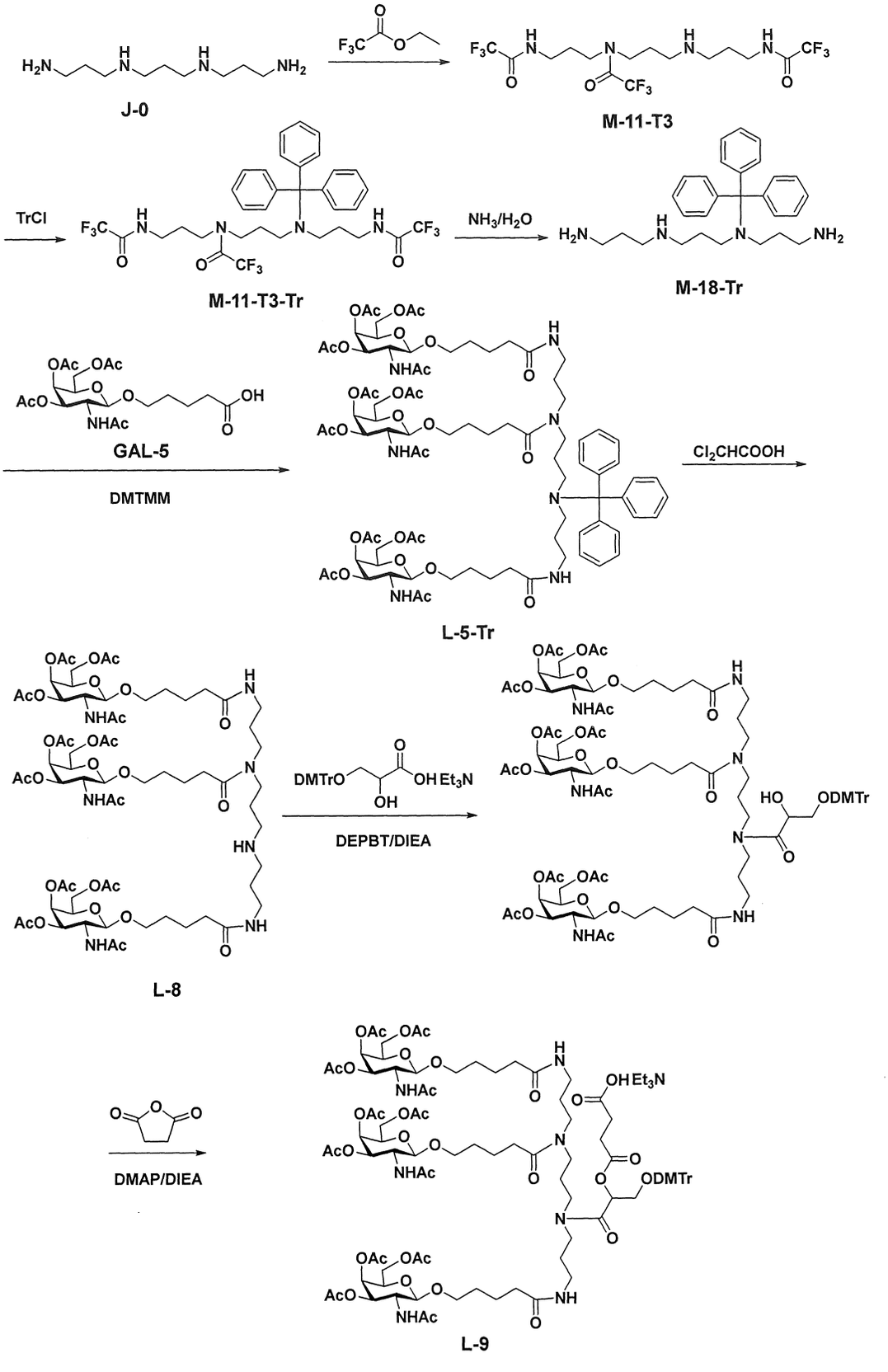
GAL-3 (26,9 g, 81,7 mmol) thu được ở bước (1-1b) được hòa tan trong 136 ml 1,2-dicloetan khan, được bổ sung 30 g sàng phân tử 4Å dưới dạng bột khô sau đó là 9,0 g 5-hexen-1-ol (CAS số: 821-41-0, mua từ Adamas-beta Inc., 89,9 mmol), và khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. 9,08 ml TMSOTf (40,9 mmol) được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

(1-1d) Tổng hợp GAL-5

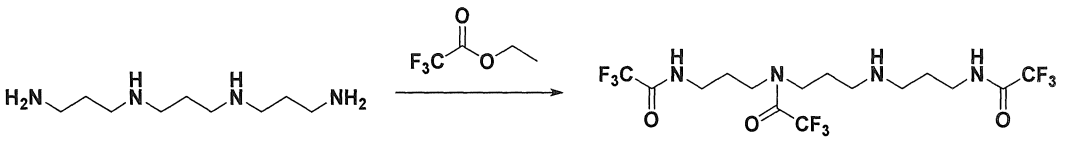
GAL-4 (14,9 g, 34,7 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả ở bước (1-1c) được hòa tan trong dung môi hỗn hợp của 77 ml diclometan và 77 ml axetonitril, được bổ sung 103 ml nước khử ion và 29,7 g natri periodat (CAS số: 7790-28-5, mua từ Aladdin Inc., 138,8 mmol) một cách tương ứng, và được khuấy trong bể đá trong 10 phút. Rutheni triclorua (CAS số: 14898-67-0, có sẵn từ Energy Chemical, 238 mg, 1,145 mmol) được bổ sung để phản ứng qua đêm ở nhiệt độ phòng. Dung dịch phản ứng thu được được pha loãng bằng cách thêm 300 ml nước, được khuấy, và điều chỉnh đến độ pH khoảng 7,5 bằng cách thêm natri bicacbonat bão hòa. Pha hữu cơ đã phân lập được loại bỏ. Pha nước còn lại được chiết ba lần, mỗi lần bằng 200 ml diclometan, và pha hữu

cơ thu được từ bước chiết được loại bỏ. Pha nước thu được từ bước chiết được điều chỉnh đến độ pH khoảng 3 bằng axit xitric rắn và được chiết ba lần, mỗi lần bằng 200 ml diclometan, và các pha hữu cơ được kết hợp và sấy khô với natri sunfat khan. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 6,85 g sản phẩm GAL-5 dưới dạng chất rắn bọt trắng.

Phân tử tiếp hợp L-9 được tổng hợp bằng cách sử dụng hợp chất GAL-5 thu được theo phương pháp trên qua đường xử lý sau đây:


J-0
M-11-T3
TrCl
M-11-T3-Tr
NH3/H2O
M-18-Tr
GAL-5
DMTMM
Cl2CHCOOH
L-5-Tr
L-8
DMTrO
OH Et3N
DEPBT/DIEA
DMAP/DIEA
L-9

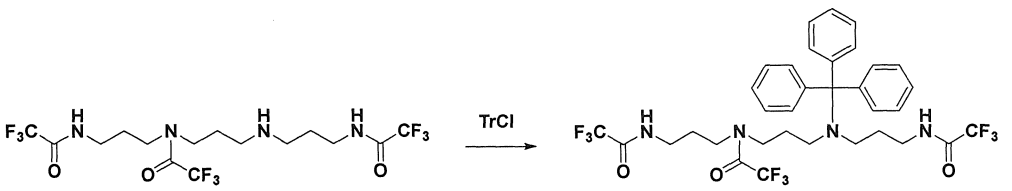
(1-2) Tổng hợp M-11-T3:



J-0 M-11-T3

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

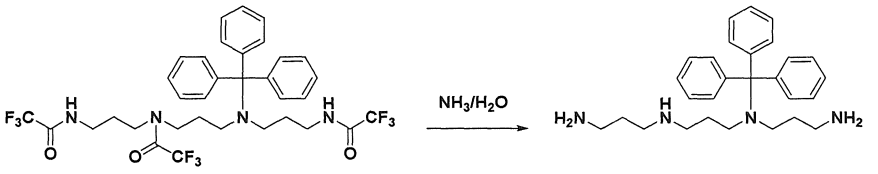
(1-3) Tổng hợp M-11-T3-Tr:



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

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

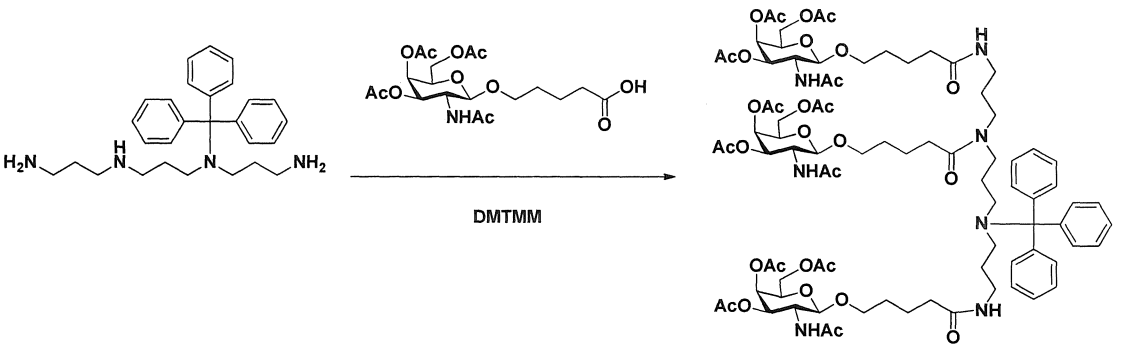
(1-4) Tổng hợp M-18-Tr:



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

Sản phẩm thô M-11-T3-Tr (7,763 g, 10 mmol) thu được ở bước (1-3) được hòa tan trong 100 ml metanol, và được bổ sung 100 ml dung dịch metylamin nước (40% khối lượng) để phản ứng trong 23 giờ trong khi khuấy ở 50°C. Các hạt không tan được loại bỏ bằng cách lọc. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và phần cặn được bổ sung 200 ml dung môi hỗn hợp của DCM:metanol theo tỷ lệ thể tích là 1:1, rửa bằng 50 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha nước thu được được chiết ba lần, mỗi lần bằng 50 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp, sấy khô với natri sulfat khan và được lọc. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và phần cặn được sấy bọt bằng bơm dầu chân không qua đêm, và được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel pha thường, 200-300 mesh. Cột này được đóng gói với ete dầu mỏ, được bổ sung trietylamin 1% khối lượng để trung hòa tính axit của silicagel, và được rửa giải gradien bằng diclometan:metanol:amoniac nước (25% khối lượng) = 1:1:0,05-1:1:0,25. Nước giải hấp được gom, dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và phần cặn được sấy bọt bằng bơm dầu chân không để tạo ra 2,887g sản phẩm tinh khiết M-18-Tr. 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ7,47 – 7,39 (m, 6H), 7,32 –7,24 (m, 6H), 7,19 – 7,12 (m, 3H), 2,60 – 2,47 (m, 4H), 2,46 – 2,19 (m, 13H), 1,70 – 1,55 (m, 4H), 1,40 (p, J = 6,8 Hz, 2H). MS m/z: C28H39N4, [M+H]+, tính được: 431,65, đo được: 432,61.

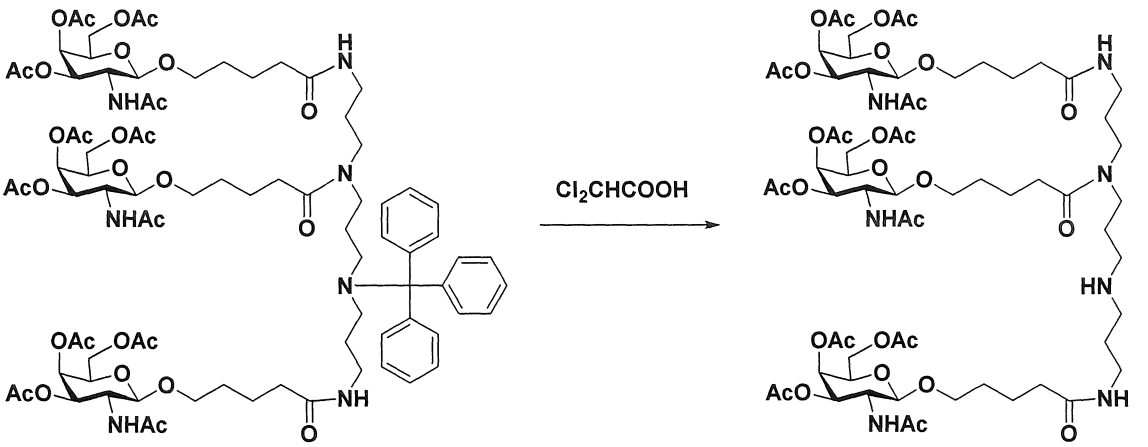
(1-5) Tổng hợp L-5-Tr:



M-18-Tr **L-5-Tr**

M-18-Tr (2,02 g, 4,69 mmol) thu được ở bước (1-4) và GAL-5 (6,93 g, 15,48 mmol) thu được ở bước (1-1) được trộn và hòa tan trong 47 ml axetonitril, và được bổ sung N-metylmorpholin (3,13 g, 30,96 mmol) và 4-(4,6-dimetoxytriazin-2-yl)-4-metylmorpholin hydroclorua (DMTMM, 4,28 g, 15,48 mmol) để phản ứng trong 2 giờ trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng. Dung dịch phản ứng thu được được pha loãng với 200 ml diclometan, được rửa bằng 100 ml dung dịch natri bicacbonat bão hòa và 100 ml nước muối bão hòa, sấy khô với natri sulfat khan, và được lọc. Sau đó dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô này được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel pha thường, 200-300 mesh. Cột này được đóng gói với ete dầu mỏ, được bổ sung trietylamin 1% khối lượng để trung hòa tính axit của silicagel, và được rửa giải gradien bằng diclometan:metanol = 100:5-100:7. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi để sấy khô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 7,49 g sản phẩm tinh khiết L-5-Tr. 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ7,83 – 7,10 (m, 4H), 7,67 – 7,60 (m, 1H), 7,44 – 7,34 (m, 6H), 7,33 – 7,24 (m, 6H), 7,20 – 7,15 (m, 3H), 5,22 (s, 3H), 4,97 (d, J = 11,3 Hz, 3H), 4,49 (d, J = 8,4 Hz, 3H), 4,06 – 3,07 (m, 9H), 3,95 – 3,83 (m, 3H), 3,77 – 3,64 (m, 3H), 3,45 – 3,35 (m, 3H), 3,12 – 2,87 (m, 8H), 2,30 – 2,15 (m, 3H), 2,11 – 1,98 (m, 22H), 1,95 – 1,84 (m, 11H), 1,81 – 1,61 (m, 14H), 1,54 – 1,36 (m, 14H). MS m/z: C85H119N7O30, [M+H]+, tính được: 1718,81, đo được: 1718,03.

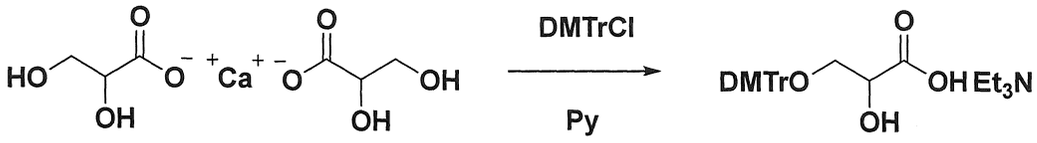
(1-6) Tổng hợp L-8:



L-5-Tr **L-8**

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

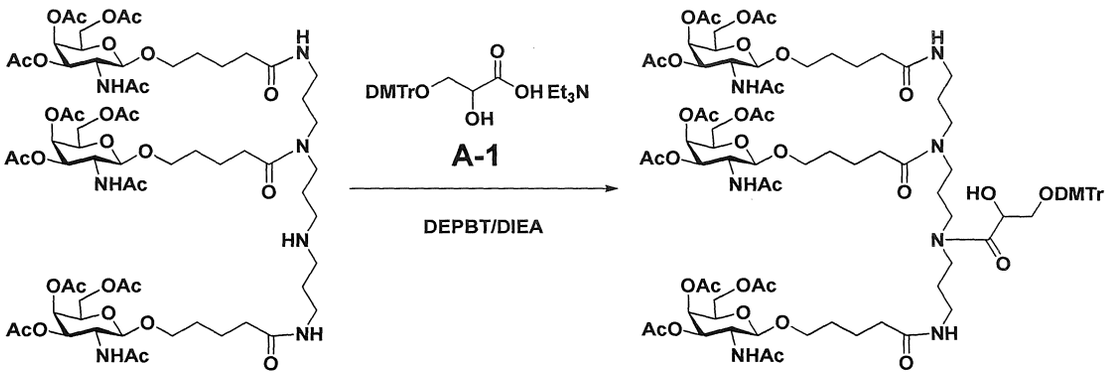
(1-7a) Tổng hợp A-1



A-1

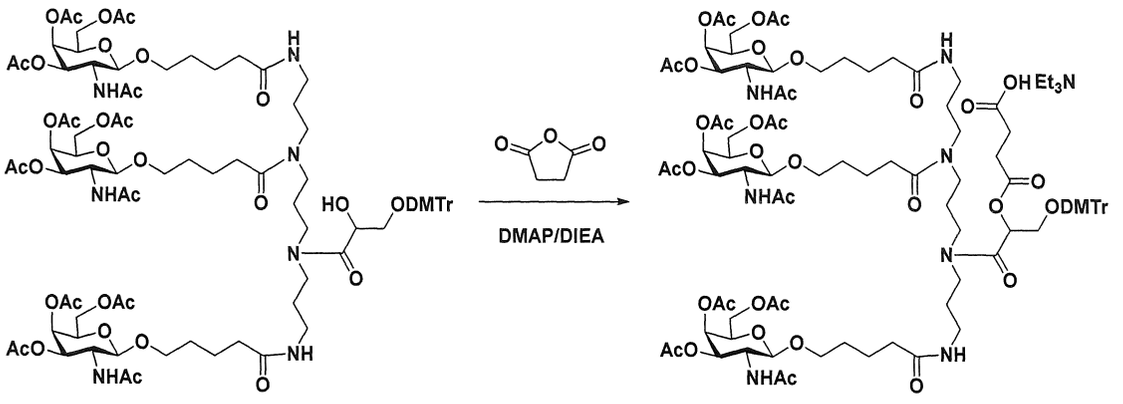
DMTrCl (4,4'-dimetoxytrityl clorua, 38,12 g, 112,5 mmol) được hòa tan trong 450 ml pyridin khan, và được bổ sung canxi DL-glyxerat hydrat (12,88 g, 45,0 mmol) để phản ứng trong 22 giờ ở 45°C. Dung dịch phản ứng thu được được lọc. Phần cặn được rửa với 200 ml DCM, và dịch lọc được cô đến khô trong điều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

(1-7b) Tổng hợp L-7:



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

(1-8) Tổng hợp L-9:

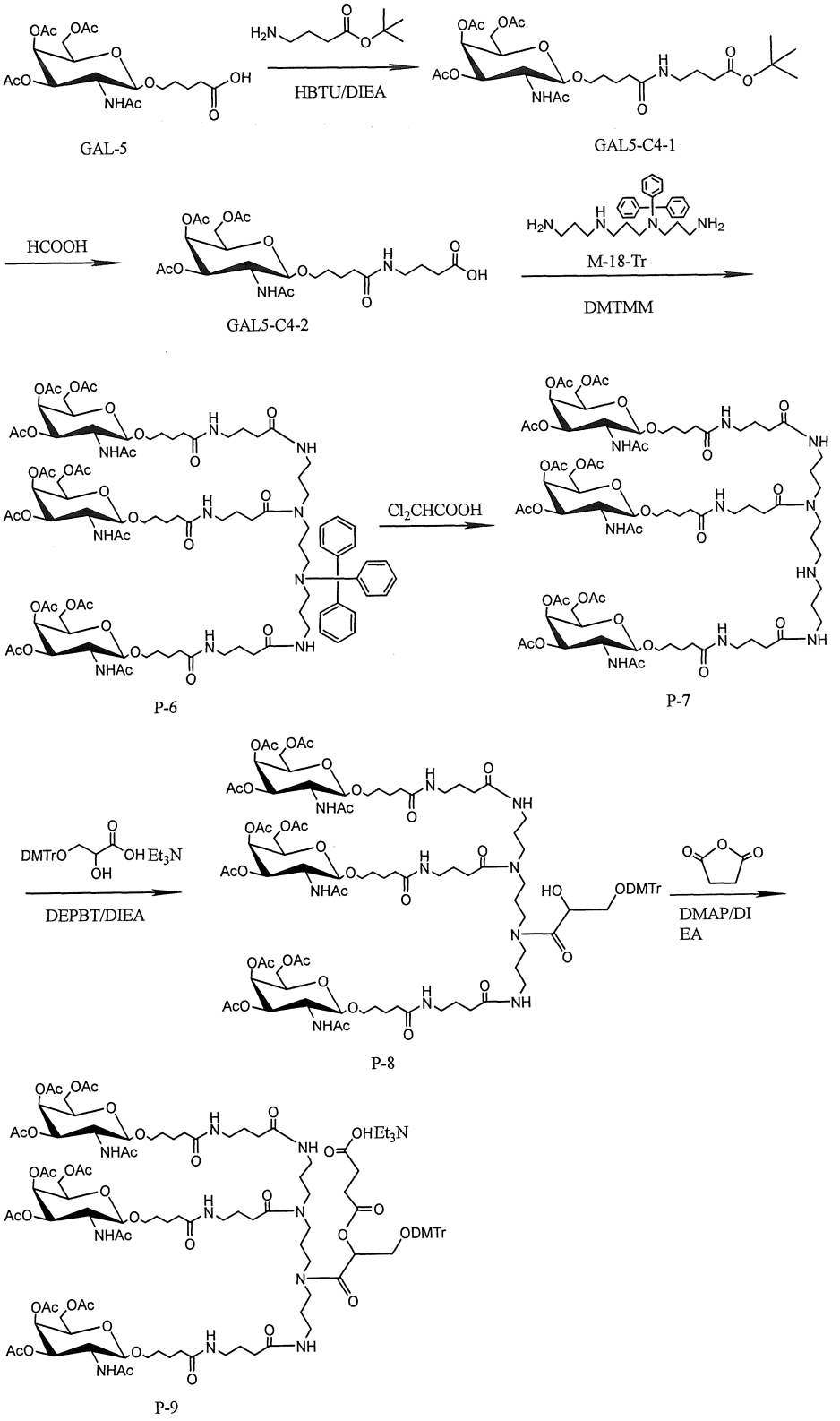


L-7 L-9

L-7 (2,300 g, 1,26 mmol) thu được ở bước (1-7b), anhydrit sucxinic (0,378 g, 3,78 mmol) và 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 0,462 g, 3,78 mmol) được trộn và hòa tan trong 13 ml diclometan, được bổ sung thêm DIPEA (0,814 g, 6,30 mmol), và khuấy trong 24 giờ ở 25°C. Dung dịch phản ứng thu được được rửa bằng 5 ml trietylamin phosphat 0,5 M. Pha nước đã phân lập được chiết ba lần, mỗi lần bằng 5 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 2,774 g sản phẩm thô. Sản phẩm thô được cho tinh chế cột bằng cách sử dụng silicagel pha thường, 200-300 mesh, 60 g, với trietylamin 1% khối lượng để trung hòa tính axit của silicagel. Cột được cân bằng với diclometan và được rửa giải gradien bằng trietylamin chứa diclometan 1‰ khối lượng:metanol = 100:18-100:20. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 1,874 g sản phẩm tinh khiết của phân tử tiếp hợp L-9 (phân tử tiếp hợp 1). 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8,58 (d, J = 4,2 Hz, 1H), 7,94 – 7,82 (m, 3H), 7,41 – 7,29 (m, 5H), 7,22 (d, J = 8,1 Hz, 5H), 6,89 (d, J = 8,3 Hz, 4H), 5,49 – 5,37 (m, 1H), 5,21 (d, J = 3,0 Hz, 3H), 4,97 (d, J = 11,1 Hz, 3H), 4,49 (d, J = 8,2 Hz, 3H), 4,02 (s, 9H), 3,88 (dd, J = 19,4, 9,4 Hz, 3H), 3,77 – 3,65 (m, 9H), 3,50 – 3,39 (m, 6H), 3,11 – 2,90 (m, 5H), 2,61 – 2,54 (m, 4H), 2,47 – 2,41 (m, 2H), 2,26 – 2,17 (m, 2H), 2,15 – 1,95 (m, 22H), 1,92 – 1,84 (m, 9H), 1,80 – 1,70 (m, 10H), 1,65 – 1,35 (m, 17H), 1,31 – 1,19 (m, 4H), 0,96 (t, J = 7,1 Hz, 9H). MS m/z: C94H132N7O38, [M-DMTr]+, tính được: 1664,72, đo được: 1655,03. Cấu trúc của phân tử tiếp hợp L-9 thu được được thể hiện bằng công thức (503).

Ví dụ điều chế 2 Điều chế phân tử tiếp hợp P-9 (phân tử tiếp hợp 2)

Trong ví dụ điều chế này, phân tử tiếp hợp 2 (sau đây còn được gọi là phân tử tiếp hợp P-9) được tổng hợp theo phương pháp sau đây:



(2-1) Tổng hợp GAL5-C4-1

GAL-5 (13,43 g, 30,0 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả ở bước (1-1) ở trên, t-butyl 4-aminobutyrat hydroclorua (5,87 g, 30,0 mmol), O-benzotriazol-tetrametyluroni hexaflophosphat (13,65 g, 36,0 mmol) và diisopropyletylamin (11,63 g, 90,0 mmol) được bổ sung vào 40 ml N,N-dimetylformamit, được hòa tan đều và sau đó khuấy ở nhiệt độ phòng để phản ứng trong 5 giờ. 300 ml dung dịch natri bicacbonat nước bão hòa được bổ sung vào dung dịch phản ứng thu được. Pha nước đã phân lập được chiết ba lần, mỗi lần bằng 200 ml etyl axetat. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp và được rửa một lần bằng 200 ml nước muối bão hòa. Pha hữu cơ thu được từ bước rửa được phân lập và sấy khô với natri sulfat khan. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm đến khô để tạo ra 30,3 g sản phẩm thô GAL5-C4-1 dưới dạng dầu, được sử dụng trực tiếp ở phản ứng tiếp theo.

(2-2) Tổng hợp GAL5-C4-2

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

(2-3) Tổng hợp P-6:

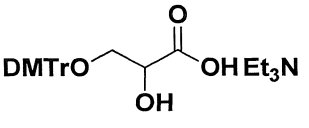
M-18-Tr (2,02 g, 4,69 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả ở bước (1-4) và GAL5-C4-2 (8,24 g, 15,48 mmol) thu được ở bước (2-2) được trộn và hòa tan trong 47 ml axetonitril, được bổ sung N-metylmorpholin (3,13 g, 30,96 mmol) sau đó là 4-(4,6-dimetoxytriazin-2-yl)-4-metylmorpholin hydroclorua (DMTMM, 4,28 g, 15,48 mmol) để phản ứng trong 2 giờ trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng. Dung dịch phản ứng thu được được pha loãng với 200 ml diclometan. Pha hữu cơ thu được được rửa bằng 100 ml dung dịch natri bicacbonat bão hòa và 100 ml nước muối bão hòa, một cách tương ứng. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp, sấy khô với natri sulfat khan, và lọc. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô, được

tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel pha thường, 200-300 mesh. Cột này được đóng gói với ete dầu mỏ, được bổ sung trietylamin 1% khối lượng để trung hòa tính axit của silicagel, và được rửa giải gradien bằng diclometan:metanol = 100:5-100:7. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra tổng cộng 8,27 g sản phẩm tinh khiết P-6.

(2-4) Tổng hợp P-7:

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

(2-5) Tổng hợp P-8:



(A-1)

P-7 (2,653 g, 1,532 mmol) và A-1 (2,342 g, 4,596 mmol) được trộn và hòa tan trong 16 ml diclometan, và được bổ sung 3-dietoxyphosphoryl-1,2,3-benzotriazol 4(3H)-on (DEPBT) (1,375 g, 4,596 mmol) sau đó là diisopropyletylamin (1,188 g, 9,191 mmol) để phản ứng trong 2 giờ trong khi khuấy ở 25°C, được rửa bằng 10 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã phân lập được chiết ba lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp và rửa bằng 10 ml nước muối bão hòa.

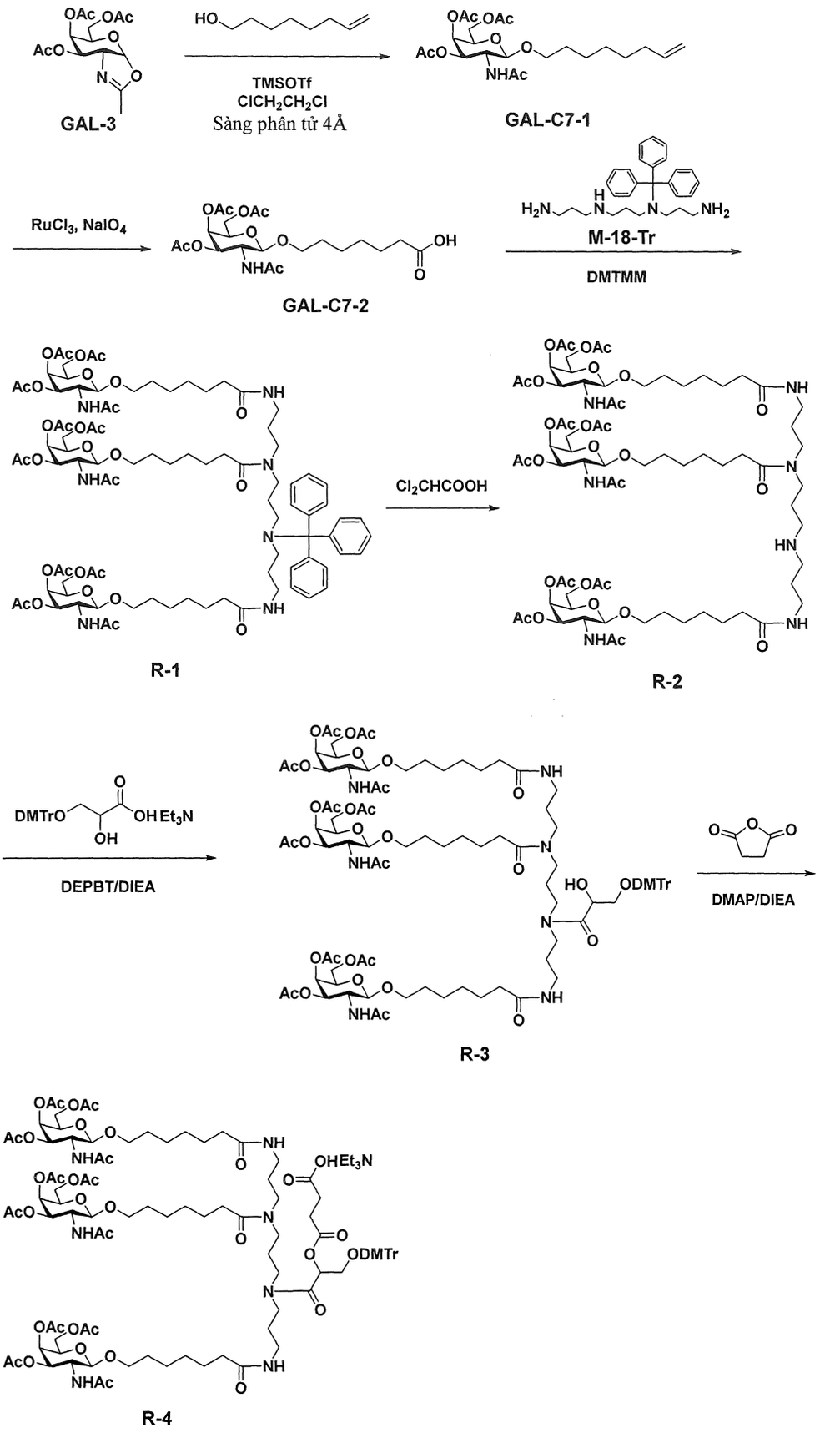
Pha nước đã phân lập được chiết hai lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan, và các pha hữu cơ thu được được kết hợp, sấy khô với natri sulfat khan và lọc. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và phần cặn được sấy bọt qua đêm bằng bơm dầu chân không để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô này được cho tinh chế cột bằng cách sử dụng silicagel pha thường, 200-300 mesh, 120 g, với 20 ml trietylamin để trung hòa tính axit của silicagel. Cột này được cân bằng với ete dầu mỏ chứa trietylamin 1% khối lượng và được rửa giải gradien bằng ete dầu mỏ:etyl axetat:diclometan:N,N-dimetylformamit = 1:1:1:0,5-1:1:1:0,6. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra tổng cộng 2,793 g sản phẩm tinh khiết P-8.

(2-6) Tổng hợp P-9:

P-8 (490 mg, 0,231 mmol), anhydrit sucxinic (69 mg, 0,693 mmol) và 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 68 mg, 0,554 mmol) được trộn và hòa tan trong 2,3 ml diclometan, và được bổ sung diisopropyletylamin (DIPEA, 149 mg, 1,155 mmol) để phản ứng trong 21 giờ trong khi khuấy ở 25°C. 50 ml diclometan được bổ sung vào dung dịch phản ứng thu được để pha loãng, và sau đó được rửa bằng 100 ml trietylamin phosphat 0,5 M. Pha nước đã phân lập được chiết ba lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô được cho tinh chế cột bằng cách sử dụng silicagel pha thường, 200-300 mesh, 80g, với trietylamin 1% khối lượng để trung hòa tính axit của silicagel. Cột này được cân bằng với diclometan và được rửa giải gradien bằng diclometan chứa trietylamin 1‰ khối lượng:metanol = 100:18-100:20. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra tổng cộng 200 mg sản phẩm tinh khiết, phân tử tiếp hợp P-9 (phân tử tiếp hợp 2). MS m/z: C106H153N10O41, [M-DMTr]+, tính được: 1921,05, đo được: 1920,97. Cấu trúc của phân tử tiếp hợp P-9 thu được được thể hiện bằng công thức (504).

Ví dụ điều chế 3 Điều chế phân tử tiếp hợp R-4 (phân tử tiếp hợp 3)

Trong ví dụ điều chế này, phân tử tiếp hợp 3 (sau đây còn được gọi là phân tử tiếp hợp R-4) được tổng hợp theo phương pháp sau đây:


GAL-3
TMSOTf
ClCH2CH2Cl
Sàng phân tử 4Å
GAL-C7-1
RuCl3, NaIO4
GAL-C7-2
M-18-Tr
DMTMM
R-1
Cl2CHCOOH
R-2
DMTrO
OH Et3N
DEPBT/DIEA
R-3
DMAP/DIEA
R-4

(3-1) Tổng hợp GAL-C7-1

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

(3-2) Tổng hợp GAL-C7-2

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

(3-3) Tổng hợp R-1:

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

(3-4) Tổng hợp R-2:

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

(3-5) Tổng hợp R-3:

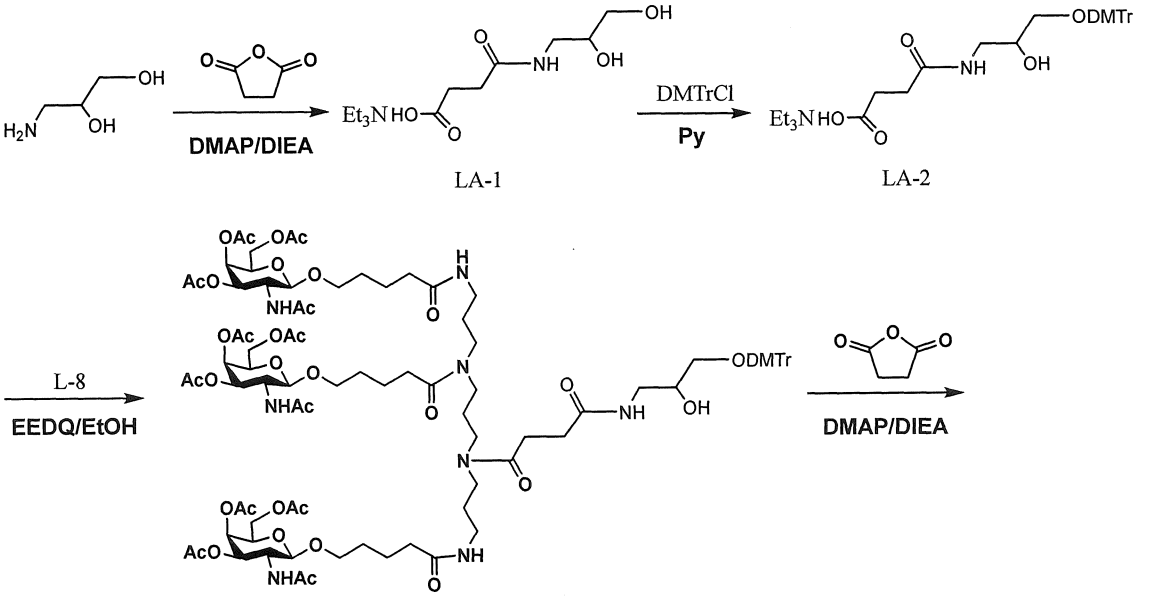
R-2 (2,391 g, 1,532 mmol) và A-1 (2,342 g, 4,596 mmol) được trộn và được hòa tan trong 16 ml diclometan, và được bổ sung 3-(dietoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT, 1,375 g, 4,596 mmol) sau đó là diisopropyletylamin (1,188 g, 9,191 mmol) để phản ứng trong 2 giờ trong khi khuấy ở 25°C, được rửa bằng 10 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã phân lập được chiết ba lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp và rửa bằng 10 ml nước muối bão hòa. Pha nước đã phân lập được chiết hai lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan, và các pha hữu cơ thu được được kết hợp, sấy khô bằng natri sulfat khan và lọc. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và phần cặn được sấy bọt qua đêm bằng bơm dầu chân không để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô được cho tinh chế cột bằng cách sử dụng silicagel pha thường, 200-300 mesh, 120 g, với 20 ml trietylamin để trung hòa tính axit của silicagel. Cột này được cân bằng với ete dầu mỏ chứa trietylamin 1% khối lượng và được rửa giải gradien bằng ete dầu mỏ:etyl axetat:diclometan:N,N-dimetylformamit = 1:1:1:0,5-1:1:1:0,6. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 2,642 g sản phẩm tinh khiết R-3.

(3-6) Tổng hợp R-4:

R-3 (795mg, 0,4074mmol), sucxinic anhydrit (82mg, 0,8148mmol) và 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 100mg, 0,8148mmol) được trộn và hòa tan trong 4 ml diclometan, và được bổ sung diisopropyletylamin (DIPEA, 100mg, 0,8148 mmol) để phản ứng trong 18 giờ trong khi khuấy ở 25°C. Dung dịch phản ứng thu được được rửa bằng 5 ml trietylamin phosphat 0,5 M. Pha nước được chiết ba lần, mỗi lần bằng 5 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô này được cho tinh chế cột bằng cách sử dụng silicagel pha thường, 200-300 mesh, 30 g, với trietylamin 1% khối lượng để trung hòa tính axit của silicagel. Cột được cân bằng với diclometan và được rửa giải gradien bằng diclometan chứa trietylamin 1‰ khối lượng:metanol = 100:18-100:20. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 505 mg sản phẩm tinh khiết của phân tử tiếp hợp R-4 (phân tử tiếp hợp 3). Cấu trúc của phân tử tiếp hợp R-4 thu được được thể hiện bằng công thức (507).

Ví dụ điều chế 4 Điều chế phân tử tiếp hợp LA-4 (phân tử tiếp hợp 4)

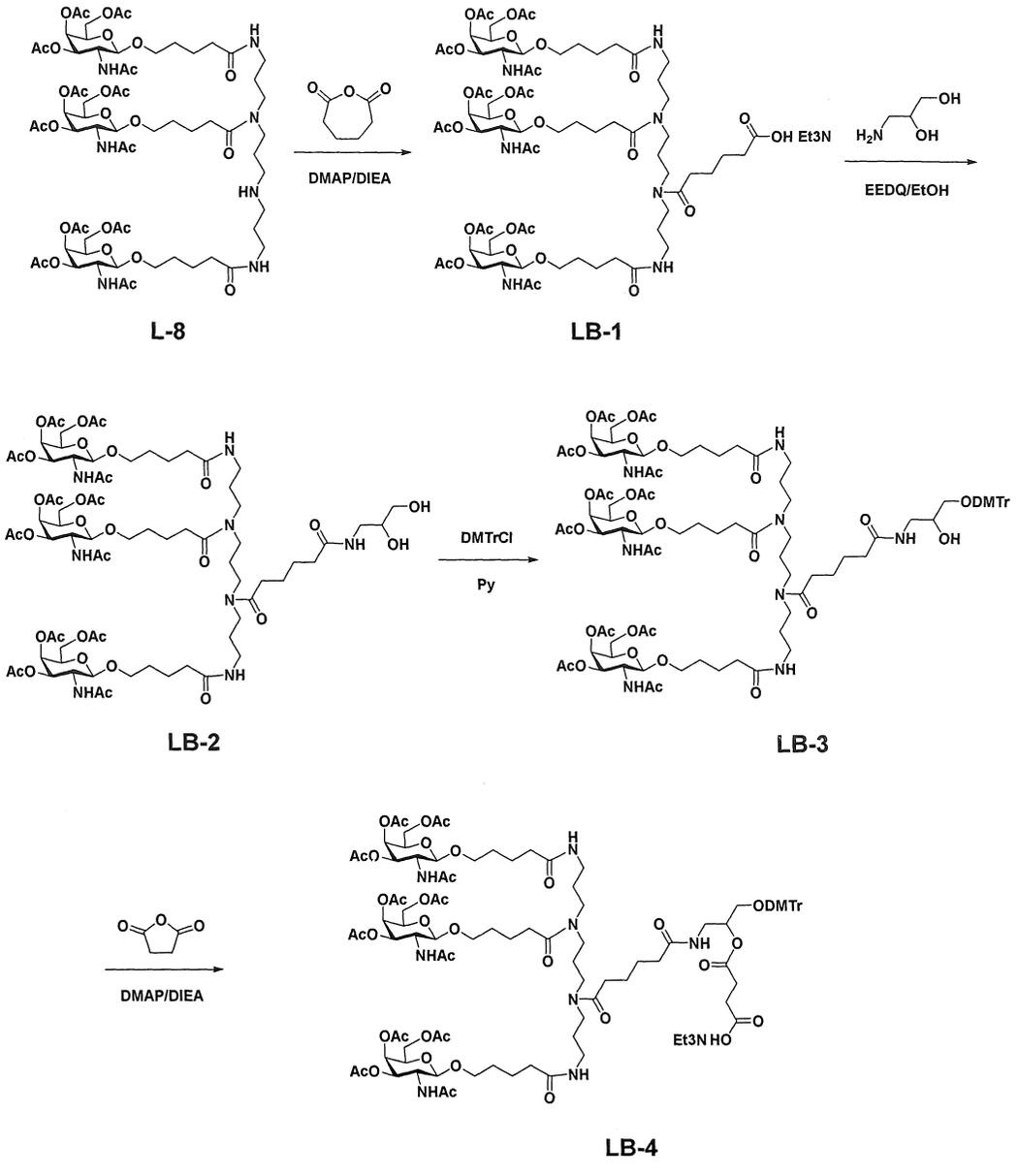
Mong đợi là phân tử tiếp hợp 4 (sau đây còn được gọi là phân tử tiếp hợp LA-4) có thể được tổng hợp theo đường xử lý sau đây. Cấu trúc của phân tử tiếp hợp LA-4 thu được được thể hiện bằng công thức (512).



Phân tử tiếp hợp

Ví dụ điều chế 5 Điều chế phân tử tiếp hợp LB-4 (phân tử tiếp hợp 5)

Trong ví dụ điều chế này, phân tử tiếp hợp 5 (sau đây còn được gọi là phân tử tiếp hợp LB-4) được tổng hợp theo phương pháp sau đây:



(5-1) Tổng hợp LB-1:

L-8 (5,0g, 3,386mmol) thu được theo phương pháp được mô tả ở bước (1-6), adipic anhydrit (870mg, 6,772mmol) và 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 827mg, 6,772 mmol) được trộn và hòa tan trong 130 ml diclometan, và được bổ sung diisopropyletylamin (DIPEA, 2,2 g, 16,931 mmol) để phản ứng trong 4 giờ trong khi khuấy ở 25°C. 70ml diclometan được bổ sung vào dung dịch phản ứng thu được để pha loãng, và sau đó được rửa bằng trietylamin phosphat 0,5 M. Pha nước đã phân lập được chiết bốn lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô này được tinh chế cột bằng cách sử dụng silicagel pha thường, 200-300 mesh,

120 g, với trietylamin 1% khối lượng để trung hòa tính axit của silicagel. Cột này được cân bằng với diclometan và được rửa giải gradien bằng ete dầu mỏ:etyl axetat:diclometan:metanol = 1:1:1:0,2-1:1:1:1. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 4,267 g sản phẩm tinh khiết LB-1.

(5-2) Tổng hợp LB-2:

LB-1 (4,697 g, 2,753 mmol, hỗn hợp của 2 mẻ) thu được theo phương pháp được mô tả ở bước (5-1), 3-amino-1,2-propandiol (313mg, 3,442 mmol), 4-(4,6-dimetoxytriazin-2-yl)-4-metylmorpholin hydroclorua (DMTMM, 953mg, 3,442mmol) và N-metylmorpholin (700mg, 6,884mmol) được bổ sung tuần tự vào hỗn hợp của 30 ml axetonitril và 3 ml metanol để phản ứng qua đêm trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng được chuyển sang bể dầu ở 60°C và khuấy trong 18 giờ. Dung môi được làm bay hơi đến khô, và phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột (silicagel pha thường 200-300 mesh, với gradien rửa giải của diclometan:metanol = 1:0,07-1:0,5). Nước giải hấp được gom và cô để loại bỏ dung môi để tạo ra 3,27 g sản phẩm đích LB-2.

(5-3) Tổng hợp LB-3:

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

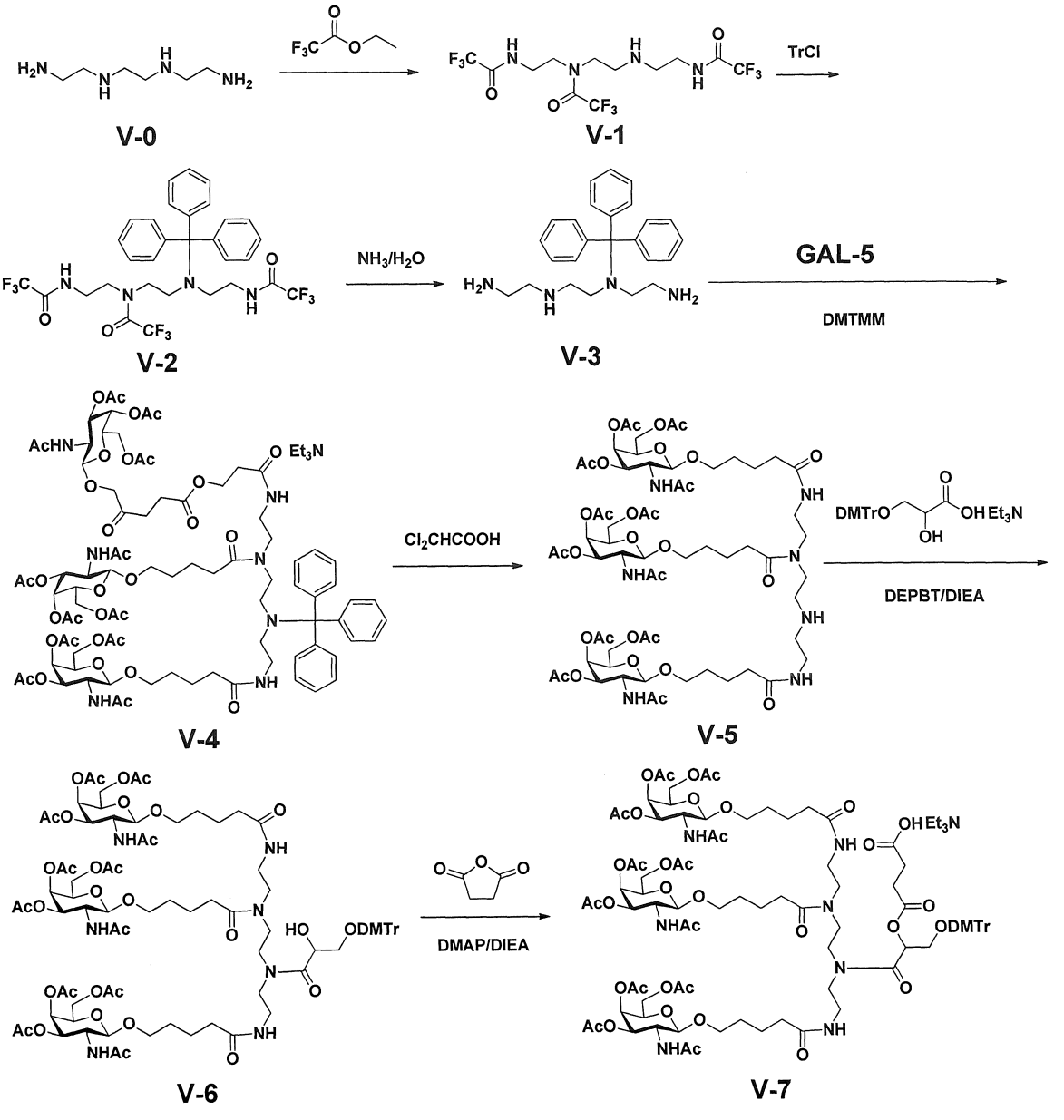
(5-4) Tổng hợp LB-4:

LB-3 (822 mg, 0,415 mmol), sucxinic anhydrit (83 g, 0,83 mmol) và 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 102 mg, 0,83 mmol) được trộn và hòa tan trong 4 ml diclometan, được bổ sung DIPEA (270 mg, 2,075 mmol), và khuấy ở 25°C để phản ứng qua đêm. Chất lỏng phản ứng thu được được rửa bằng trietylamin phosphat 0,5 M ba lần. Pha nước đã phân lập được chiết ba lần, mỗi lần bằng 2 ml diclometan. Tất cả các

pha hữu cơ được kết hợp, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô này được cho tinh chế cột bằng cách sử dụng silicagel pha thường, 200-300 mesh, với trietylamin 5% khối lượng để trung hòa tính axit của silicagel. Cột được cân bằng với ete dầu mỏ và được rửa giải gradien bằng diclometan chứa trietylamin 1‰ khối lượng:metanol = 100:5-100:20. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 787 mg sản phẩm tinh khiết, phân tử tiếp hợp LB-4 (phân tử tiếp hợp 5). Cấu trúc của phân tử tiếp hợp LB-4 thu được được thể hiện bằng công thức (513).

Ví dụ điều chế 6 Tổng hợp phân tử tiếp hợp V-7 (phân tử tiếp hợp 6)

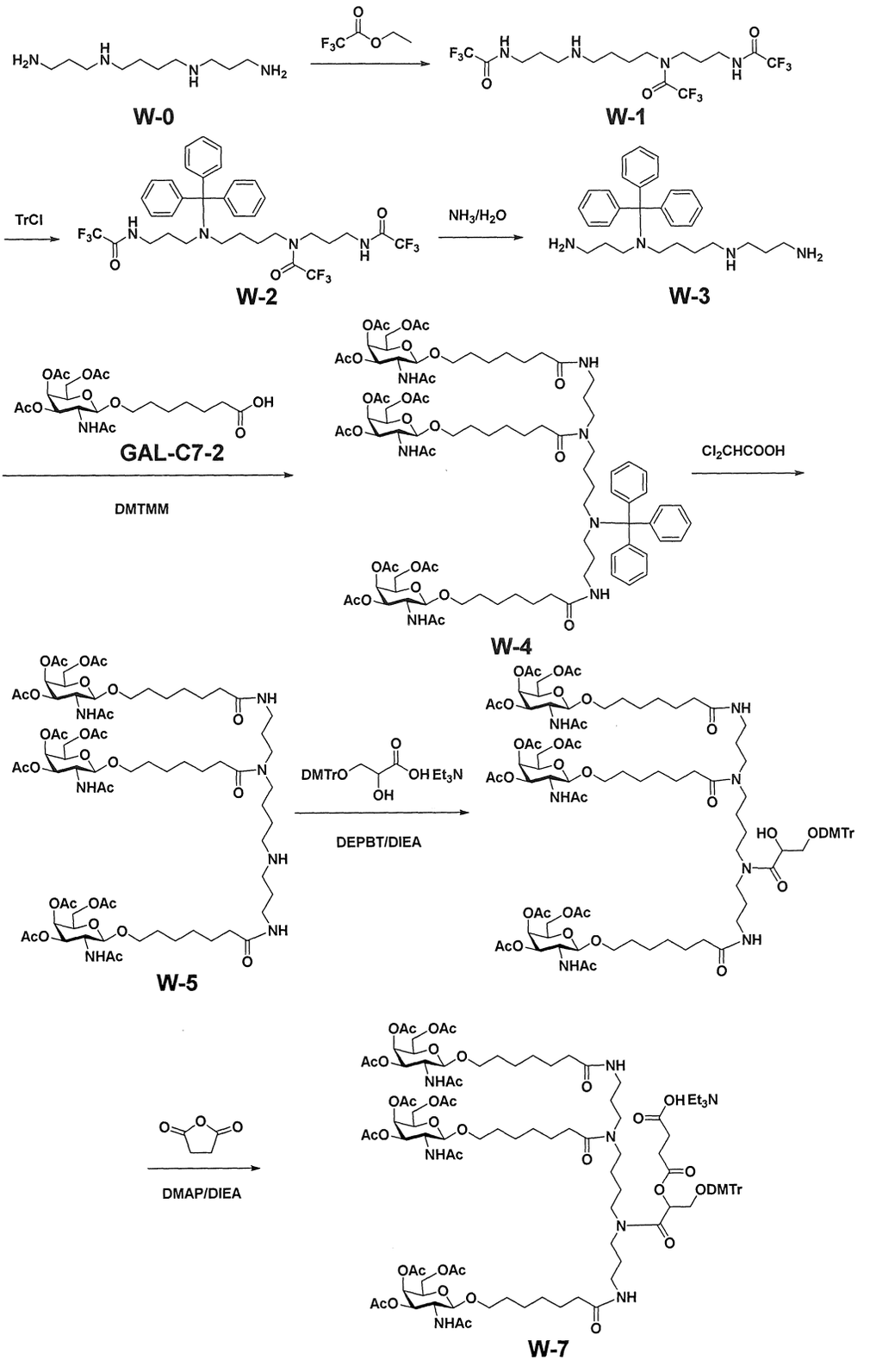
Mong đợi là phân tử tiếp hợp 6 (sau đây còn được gọi là phân tử tiếp hợp V-7) có thể được tổng hợp theo đường xử lý sau đây. Cấu trúc của phân tử tiếp hợp V-7 thu được được thể hiện bằng công thức (514). Phân tử tiếp hợp



Phân tử tiếp hợp

Ví dụ điều chế 7 Điều chế phân tử tiếp hợp W-7 (phân tử tiếp hợp 7)

Trong ví dụ điều chế này, phân tử tiếp hợp 7 (sau đây còn được gọi là phân tử tiếp hợp W-7) được tổng hợp theo phương pháp sau đây.



(7-1) Tổng hợp W-1:

W-0 (2,024 g, 10 mmol) được hòa tan trong 25 ml axetonitril, được bổ sung trietylamin (4,048 g, 40 mmol), và được làm lạnh về khoảng 0°C trong bể nước đá. Etyl

trifloaxetat (5,683 g, 40 mmol) được bổ sung để phản ứng trong 22 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và phần cặn được sấy bọt bằng bơm dầu chân không trong 18 giờ để tạo ra 5,835 g sản phẩm rắn thô W-1.

(7-2) Tổng hợp W-2:

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

(7-3) Tổng hợp W-3:

Sản phẩm thô W-2 (8,012 g, 10 mmol) được hòa tan trong 100 ml metanol, và được bổ sung 100 ml dung dịch metylamin nước (40% khối lượng) để phản ứng trong 23 giờ trong khi khuấy ở 50°C. Hạt không tan được loại bỏ khỏi hỗn hợp phản ứng bằng cách lọc. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn được bổ sung 200 ml dung môi hỗn hợp của DCM:metanol theo tỷ lệ thể tích 1:1, và pha hữu cơ thu được được rửa bằng 50 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã phân lập được chiết ba lần, mỗi lần bằng 50 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp, sấy khô bằng natri sulfat khan và được lọc. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và phần cặn được sấy bọt bằng bơm dầu chân không qua đêm, và được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel pha thường, 200-300 mesh. Cột này được đóng gói bằng ete dầu mỏ, được bổ sung trietylamin 1% khối lượng để trung hòa tính axit của silicagel, và được rửa giải gradien bằng diclometan:metanol:amoniac nước (25% khối lượng) = 1:1:0,05-1:1:0,25. Nước giải hấp được gom. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và phần cặn được sấy bọt bằng bơm dầu chân không để tạo ra 3,062 g sản phẩm tinh khiết W-3.

(7-4) Tổng hợp W-4:

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

(7-5) Tổng hợp W-5:

W-4 (1,61 g, 0,886 mmol) được hòa tan trong 125 ml diclometan, và được bổ sung axit dicloaxetic (3,5 ml, 42,43 mmol) để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Chất lỏng phản ứng thu được được làm trung hòa bằng cách bổ sung 150 ml pyridin. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel pha thường, 200-300 mesh, với trietylamin 10% khối lượng để trung hòa tính axit của silicagel. Cột được cân bằng với trietylamin 1‰ khối lượng và được rửa giải gradien bằng diclometan:metanol = 100:30-100:40. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 1,26 g sản phẩm tinh khiết W-5.

(7-6) Tổng hợp W-6:

W-5 (1,25 g, 0,793 mmol) và A-1 (1,21 g, 2,38 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả ở bước (1-7a) được trộn và hòa tan trong 12 ml diclometan, và được bổ sung 3-(dietoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT, 0,712 g, 2,38 mmol) sau đó là diisopropyletylamin (0,615 g, 4,76 mmol) để phản ứng trong 3 giờ

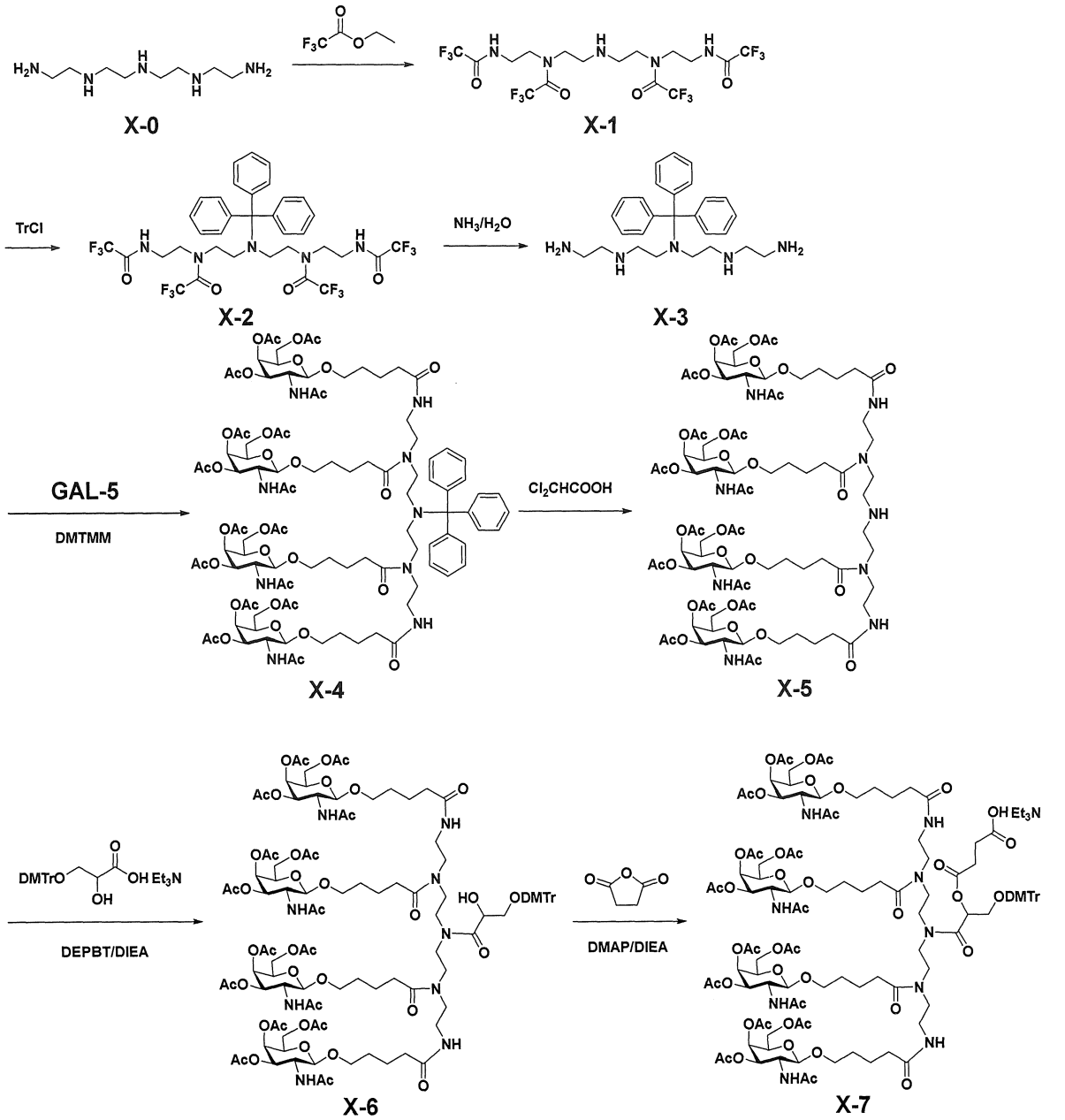
trong khi khuấy ở 25°C, được rửa bằng 80 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã phân lập được chiết ba lần, mỗi lần bằng 10 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp và rửa bằng 10 ml nước muối bão hòa. Pha hữu cơ thu được được kết hợp, được sấy khô bằng natri sulfat khan, lọc. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và phần cặn được sấy bọt qua đêm bằng bơm dầu chân không để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô này được cho tinh chế cột bằng cách sử dụng silicagel pha thường, 200-300 mesh, 185 g, với 20 ml trietylamin để trung hòa tính axit của silicagel. Cột được cân bằng với ete dầu mỏ chứa trietylamin 1% khối lượng và được rửa giải gradien bằng ete dầu mỏ:etyl axetat:diclometan:N,N-dimetylformamit = 1:1:1:0,1-1:1:1:0,7. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 1,57 g sản phẩm tinh khiết W-6.

(7-7) Tổng hợp W-7:

W-6 (1,238 g, 0,63 mmol), sucxinic anhydrit (0,189 g, 1,89 mmol) và 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 0,231 g, 1,89 mmol) được trộn và hòa tan trong 7 ml diclometan, và được bổ sung DIEA (0,407 g, 3,15 mmol) để phản ứng trong 24 giờ trong khi khuấy ở 25°C. Chất lỏng phản ứng thu được được rửa bằng 5 ml trietylamin phosphat 0,5 M. Pha nước đã phân lập được chiết ba lần, mỗi lần bằng 5 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô được cho tinh chế cột bằng cách sử dụng silicagel pha thường, 200-300 mesh, 30 g, với trietylamin 1% khối lượng để trung hòa tính axit của silicagel. Cột được cân bằng với diclometan và được rửa giải gradien bằng diclometan chứa trietylamin 1‰ khối lượng:metanol = 100:18-100:20. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 1,033 g sản phẩm tinh khiết, phân tử tiếp hợp W-7 (phân tử tiếp hợp 7). MS m/z: C101H146N7O38, [M-DMTr]+, tính được: 1763,92, đo được: 1763,21. Cấu trúc của phân tử tiếp hợp W-7 thu được được thể hiện bằng công thức (515).

Ví dụ điều chế 8 Điều chế phân tử tiếp hợp X-7 (phân tử tiếp hợp 8)

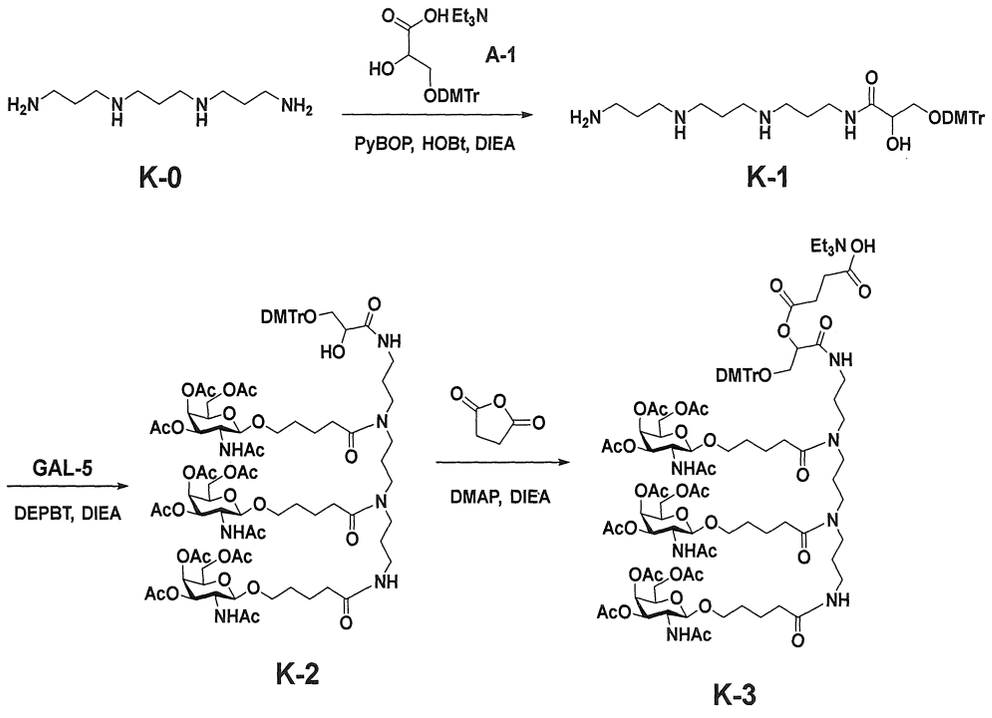
Mong đợi là phân tử tiếp hợp 8 (sau đây còn được gọi là phân tử tiếp hợp X-7) có thể được tổng hợp theo đường xử lý sau đây. Cấu trúc của phân tử tiếp hợp X-7 thu được được thể hiện bằng công thức (521). Phân tử tiếp hợp



Phân tử tiếp hợp Phân tử tiếp hợp

Ví dụ điều chế 9 Điều chế phân tử tiếp hợp K-3 (phân tử tiếp hợp so sánh 1)

Trong ví dụ điều chế này, phân tử tiếp hợp K-3 (sau đây còn được gọi là phân tử tiếp hợp so sánh 1) được tổng hợp theo phương pháp sau đây:



(9-1) Tổng hợp K-1:

A-1 (3,0 g, 6,0 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả ở bước (1-7a), PyBOP (6,2 g, 12,0 mmol), HOBt (1,6 g, 2,0 mmol) và diisopropyletylamin (DIPEA, 3,9 g, 30,0 mmol) được bổ sung vào 60 ml diclometan để phản ứng trong 10 phút trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng. Sau đó dung dịch trên được bổ sung vào K-0 (5,6 g, 30,0 mmol) để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ và 50 phút. Chất lỏng phản ứng được đổ vào 30 ml dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã phân lập được chiết ba lần, mỗi lần bằng 30 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp, rửa bằng dung dịch natri clorua bão hòa, được sấy khô bằng natri sulfat khan, sau đó lọc và cô, và được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel pha thường, 200-300 mesh, với gradien rửa giải của diclometan:metanol:amoniac nước (25% khối lượng) = 10:2:0,1- 4:4:1. Nước giải hấp được gom, cô để loại bỏ dung môi, và sấy bọt bằng bơm dầu chân không để tạo ra 2,2 g sản phẩm K-1 dưới dạng chất rắn màu trắng. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8,02 (s, 1H), 7,43 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,34 – 7,17 (m, 7H), 6,87 (d, J = 8,6 Hz, 4H), 4,05 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 3,74 (s, 6H), 3,20 – 3,01 (m, 5H), 2,60 – 2,38 (m, 12H), 1,60 – 1,39 (m, 8H), 1,24 (s, 1H). MS m/z: C33H47N4O5, [M+H]+, tính được: 579,35, đo được: 579,26.

(9-2) Tổng hợp K-2:

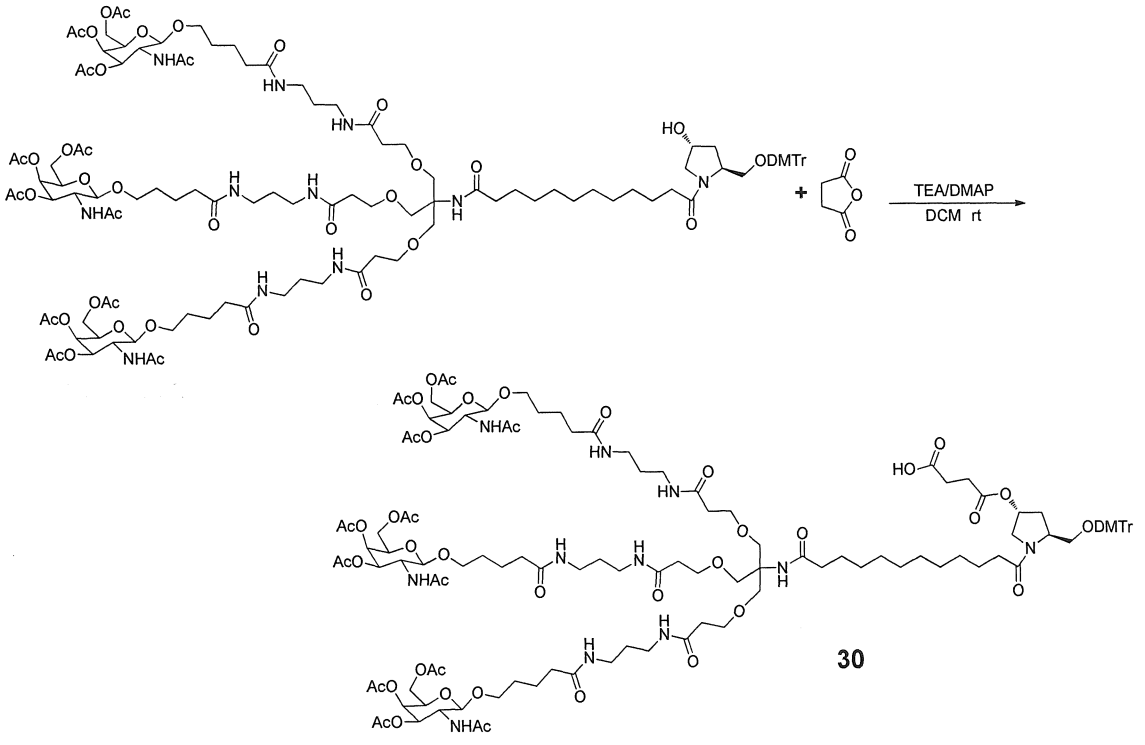
GAL-5 (483 mg, 1,08 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả ở bước (1-1), 3-(dietoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (359 mg, 1,2 mmol) và diisopropyletylamin (DIPEA, 310 mg, 2,4 mmol) được bổ sung vào 3 ml diclometan, và được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó K-1 (174 mg, 0,3 mmol) được bổ sung để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 16 giờ. Chất lỏng phản ứng được rót vào 10ml dung dịch natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã phân lập được chiết ba lần, mỗi lần bằng 10ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp, rửa bằng 10 ml dung dịch natri clorua bão hòa, được sấy khô bằng natri sulfat khan, sau đó lọc và cô, và tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel pha thường, 200-300 mesh, với gradien rửa giải của diclometan:metanol = 20:1. Nước giải hấp được gom, cô để loại bỏ dung môi, và được sấy bọt bằng bơm dầu chân không để tạo ra 205 mg sản phẩm K-2 dưới dạng chất rắn màu vàng.

(9-3) Tổng hợp K-3:

K-2 (205 mg, 0,11 mmol), sucxinic anhydrit (22 mg, 0,22 mmol), 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 27 mg, 0,22 mmol) và diisopropyletylamin (DIPEA, 71 mg, 0,55 mmol) được bổ sung vào 1,1 ml diclometan để phản ứng qua đêm trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng. Chất lỏng phản ứng được rửa ba lần, mỗi lần bằng 0,5 ml dung dịch trietylamin phosphat 0,5 M, và pha nước thu được từ mỗi lần rửa được chiết ngược một lần bằng 0,5 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp, sấy khô bằng natri sulfat khan, và được cô để loại bỏ dung môi, và sấy bọt bằng bơm dầu chân không để tạo ra 218 mg sản phẩm dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt, phân tử tiếp hợp K-3 (phân tử tiếp hợp so sánh 1).

Ví dụ điều chế 10 - Ví dụ điều chế này được sử dụng để minh họa quá trình tổng hợp phân tử tiếp hợp (GalNAc)3 (phân tử tiếp hợp so sánh 2).

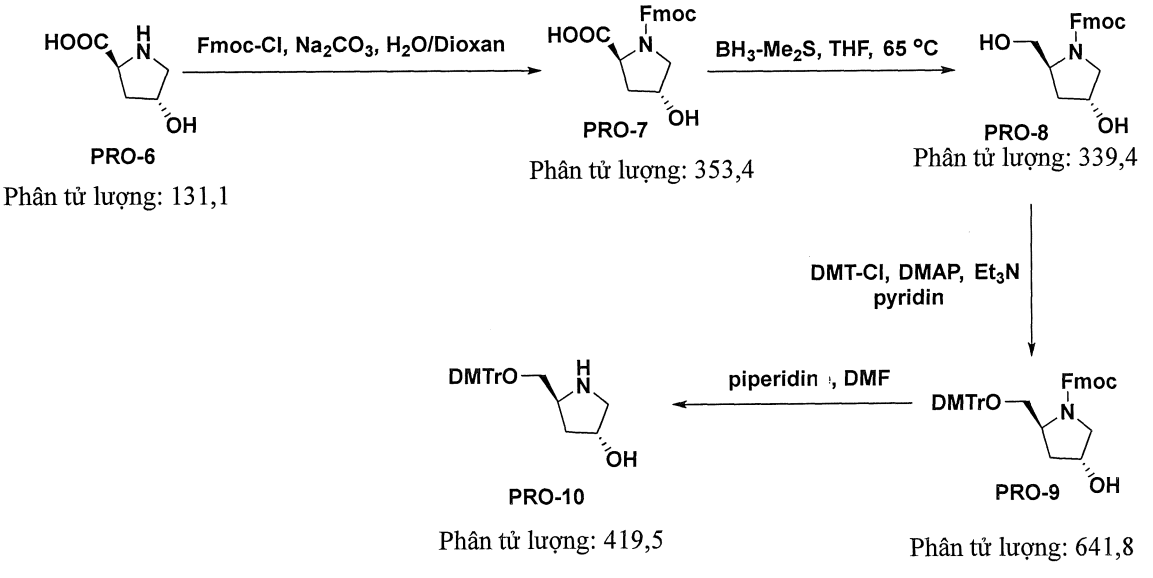
Trong ví dụ điều chế này, hợp chất 47 được tổng hợp theo phương pháp điều chế được mô tả trong ví dụ 1-4 của WO2014025805A1. Cấu trúc của hợp chất 47 được thể hiện trong công thức sau đây, trong bản mô tả này gọi là phân tử tiếp hợp (GalNAc)3 (phân tử tiếp hợp so sánh 2):



Ví dụ điều chế 11 - Ví dụ điều chế này được sử dụng để minh họa quá trình điều chế phân tử tiếp hợp FIN-2 (phân tử tiếp hợp so sánh 3).

Trong ví dụ điều chế này, phân tử tiếp hợp FIN-2 (phân tử tiếp hợp so sánh 3) được tổng hợp dựa trên phương pháp điều chế được mô tả trong tài liệu Rajeev et al., ChemBioChem 2015, 16, 903-908 theo đường xử lý sau đây:

(11-1) Tổng hợp hợp chất PRO-10



(11-1-1) Tổng hợp PRO-7

2,93 g PRO-6 (L-hydroxyprolin, CAS số: 51-35-4, mua từ Energy Chemical, 22,4 mmol) được hòa tan trong 22,5 ml 1,4-dioxan và được bổ sung 34 ml dung dịch Na_2CO_3 nước 10% (khối lượng/khối lượng). 6,954 g Fmoc-Cl (9-florenylmetyl cloformat, CAS số: 28920-43-6, mua từ Energy Chemical, 26,8 mmol) được hòa tan trong 56,5 ml 1,4-dioxan, được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng trên trong bể đá, và được để ấm tự nhiên lên nhiệt độ phòng để phản ứng qua đêm. Chất lỏng phản ứng được rót vào 150 ml nước đá, và được chiết ba lần, mỗi lần bằng 100 ml metyl t-butyl ete, pha hữu cơ thu được được loại bỏ. Pha nước còn lại được điều chỉnh đến độ pH $\leqslant$ 5 bằng axit hydroclorua đậm đặc, được chiết hai lần bằng 100 ml etyl axetat, và pha hữu cơ thu được được kết hợp và sấy khô bằng natri sulfat khan. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 7,83 g sản phẩm PRO-7 dưới dạng chất rắn bọt trắng. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,91 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 7,67 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,48 – 7,39 (m, 2H), 7,38 – 7,27 (m, 2H), 5,17 (s, 1H), 4,27 (s, 2H), 4,23 – 4,11 (m, 2H), 3,55 – 3,41 (m, 3H), 2,31 – 2,10 (m, 1H), 2,08 – 1,88 (m, 1H). HRMS (ESI) m/z tính được cho C20H19NO5 [M-H]-352,1190, đo được: 352,1033.

(11-1-2) Tổng hợp PRO-8

7,83 g PRO-7 (22,2 mmol) được hòa tan trong 80 ml THF, được gia nhiệt đến 65°C trong bể dầu, được bổ sung 36,6 ml dung dịch 2 mol/L của BH3-Me2S trong THF (CAS số 13292-87-0, mua từ J&K Scientific Ltd., 73,2 mmol) trong điều kiện hồi lưu, và hồi lưu liên tục để phản ứng trong 3 giờ. Chất lỏng phản ứng được rót ra, và chất rắn còn lại trong đó được hòa tan trong metanol. Bổ sung metanol vào chất lỏng phản ứng thu được trong khi khuấy cho tới khi không có khí thoát ra, được khuấy liên tục trong 30 phút. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế ba lần, mỗi lần bằng ete dầu mỏ để tạo ra 7,1 g sản phẩm PRO-8 dưới dạng chất rắn màu trắng. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,91 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 7,67 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,49 – 7,39 (m, 2H), 7,38 – 7,26 (m, 2H), 5,18 (dd, J = 6,1, 3,8 Hz, 1H), 4,28 (s, 2H), 4,23 – 4,13 (m, 2H), 3,55 – 3,38 (m, 2H), 2,32 – 2,11 (m, 1H), 2,08 – 1,89 (m, 1H). HRMS (ESI) m/z tính được cho C20H21NO4 [M+Na]+ 362,1368, đo được: 362,1012.

(11-1-3) Tổng hợp PRO-9

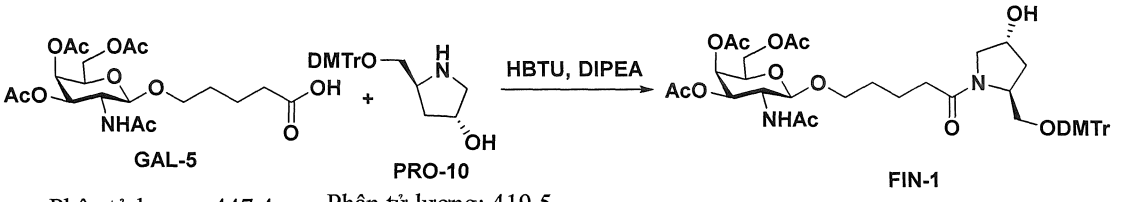
7,1 g PRO-8 (21 mmol) được hòa tan trong 100 ml pyridin, và được bổ sung 14,2 g DMTr-Cl (4,4'-dimetoxytrityl clorua, 42 mmol) để phản ứng trong 5 giờ trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm. Sản phẩm thô thu được được hòa tan trong etyl axetat và lọc để loại bỏ tạp chất muối. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel. Để tinh chế, sản phẩm thô đã hòa tan trong DCM được nạp lên trên cột silicagel được xử lý sơ bộ bằng pyridin để kiềm hóa cột. DMTr-Cl được rửa giải bằng DCM chứa pyridin 1% (thể tích/thể tích), và sau đó sản phẩm được rửa giải bằng etyl axetat. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 8,2 g sản phẩm PRO-9 dưới dạng chất rắn màu trắng. HRMS (ESI) m/z tính được cho C41H39NO6 [M+Na]+ 664,2675, đo được: 664,2348; C18 RP-HPLC (số Lot: JJS160324-1); độ tinh khiết: 94,20%.

(11-1-4) Tổng hợp PRO-10

8,2 g PRO-9 (12,8 mmol) được hòa tan trong 64 ml DMF và được bổ sung 40 ml piperidin (384 mmol) để phản ứng trong 30 phút trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng. Chất lỏng phản ứng được rót vào 300 ml nước đá và được chiết ba lần, mỗi lần bằng 150 ml etyl axetat. Pha hữu cơ thu được được kết hợp, rửa bằng 200 ml nước muối bão hòa, và pha hữu cơ thu được từ bước rửa được sấy khô bằng natri sulfat khan. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel. Để tinh chế, sản phẩm thô đã hòa tan trong DCM được nạp lên trên cột silicagel được xử lý sơ bộ bằng pyridin để kiềm hóa cột. Fmoc được rửa giải bằng DCM chứa pyridin 1% (thể tích/thể tích), và sau đó sản phẩm được rửa giải bằng etyl axetat. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 4,65 g sản phẩm PRO-10 dưới dạng chất rắn màu trắng. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,40 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,35 – 7,18 (m, 7H), 6,93 – 6,84 (m, 4H), 4,56 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 4,12 (s, 1H), 3,74 (s, 6H), 3,46 – 3,37 (m, 1H), 2,88 (ddd, J = 18,5, 10,0, 5,5 Hz, 2H), 2,75 (dd, J = 8,7, 5,8 Hz, 1H), 2,62 (dd, J = 11,0, 2,7 Hz, 1H), 1,74 – 1,65 (m, 1H), 1,40 (ddd, J = 12,9, 8,5, 5,9 Hz, 1H); HRMS (ESI) m/z tính

được cho C26H29NO4 [M+Na]+ 442,1994, đo được: 442,1999; C18 RP-HPLC (số Lot: JJS160329-1), độ tinh khiết: 97,07%.

(11-2) Tổng hợp FIN-1

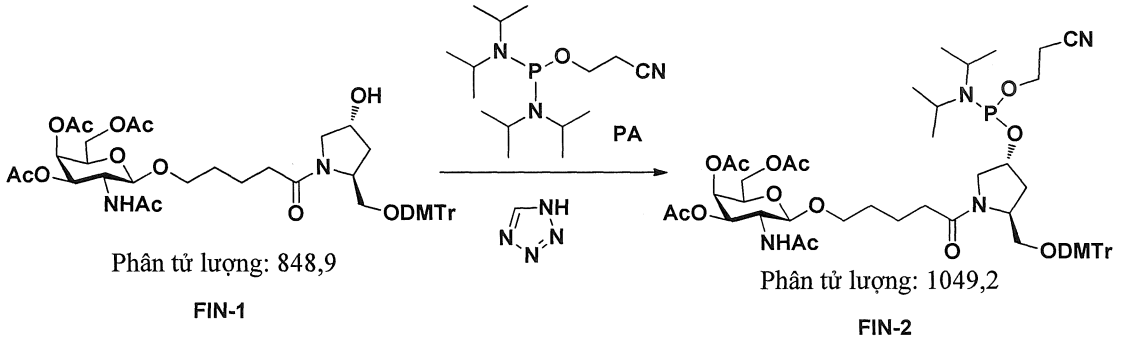


Phân tử lượng: 447,4 Phân tử lượng: 419,5 Phân tử lượng: 848,9

GAL-5 (4,5 g, 10 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả ở bước (1-1) được hòa tan trong 40 ml DMF, được bổ sung tuần tự 3,9 g DIPEA (N,N-diisopropyletylamin, CAS số: 7087-68-5, mua từ Aladdin Inc., 30 mmol) và 3,8 g HBTU (benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexaflophosphat, CAS số: 94790-37-2, mua từ Aladdin Inc., 11 mmol), và được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 10 phút để thu được chất lỏng phản ứng. PRO-10 (4,2 g, 10 mmol) thu được ở bước (12-4) được hòa tan trong 40 ml DMF, sau đó được bổ sung vào chất lỏng phản ứng trên. Chất lỏng phản ứng thu được được sấy khô bằng cách bổ sung natri sulfat khan và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Chất lỏng phản ứng được rót vào 120 ml nước đá và chiết ba lần, mỗi lần bằng 60ml etyl axetat. Pha hữu cơ thu được được kết hợp, rửa bằng 20ml nước và 20ml nước muối bão hòa, một cách tương ứng. Pha hữu cơ thu được từ bước rửa được phân lập, sấy khô bằng natri sulfat khan. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel. Để tinh chế, mẫu được nạp lên trên cột silicagel được xử lý sơ bộ bằng pyridin để kiềm hóa cột, và được rửa giải bằng dung dịch diclometan (DCM) chứa trietylamin 1% (thể tích/thể tích) và metanol 1% (thể tích/thể tích). Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 6,5 g sản phẩm FIN-1 dưới dạng chất rắn bọt màu vàng nhạt. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,83 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 7,32 (t, J = 6,6 Hz, 4H), 7,20 (td, J = 8,9, 3,5 Hz, 5H), 6,93 – 6,84 (m, 4H), 5,21 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 5,04 – 4,90 (m, 2H), 4,49 (s, 1H), 4,40 (d, J = 4,4 Hz, 0,8H), 4,31 (d, J = 5,0 Hz, 0,2H), 4,15 (s, 1H), 4,03 (s, 3H), 3,93 (s, 1H), 3,74 (s, 7H), 3,59 (dt, J = 12,0, 6,0 Hz, 1H), 3,50 – 3,40 (m, 1H), 3,39 – 3,25 (m, 3H), 3,13 (dd, J = 8,9, 5,2 Hz, 1H), 3,00 (dq, J = 9,3,

5,3, 4,3 Hz, 1H), 2,22 (s, 2H), 2,07 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 1,90 (s, 4H), 1,74 (s, 3H), 1,50 (s, 3H), 1,36 (s, 1H). C18 RP-HPLC (số Lot: LJ160422), độ tinh khiết: 95,45%.

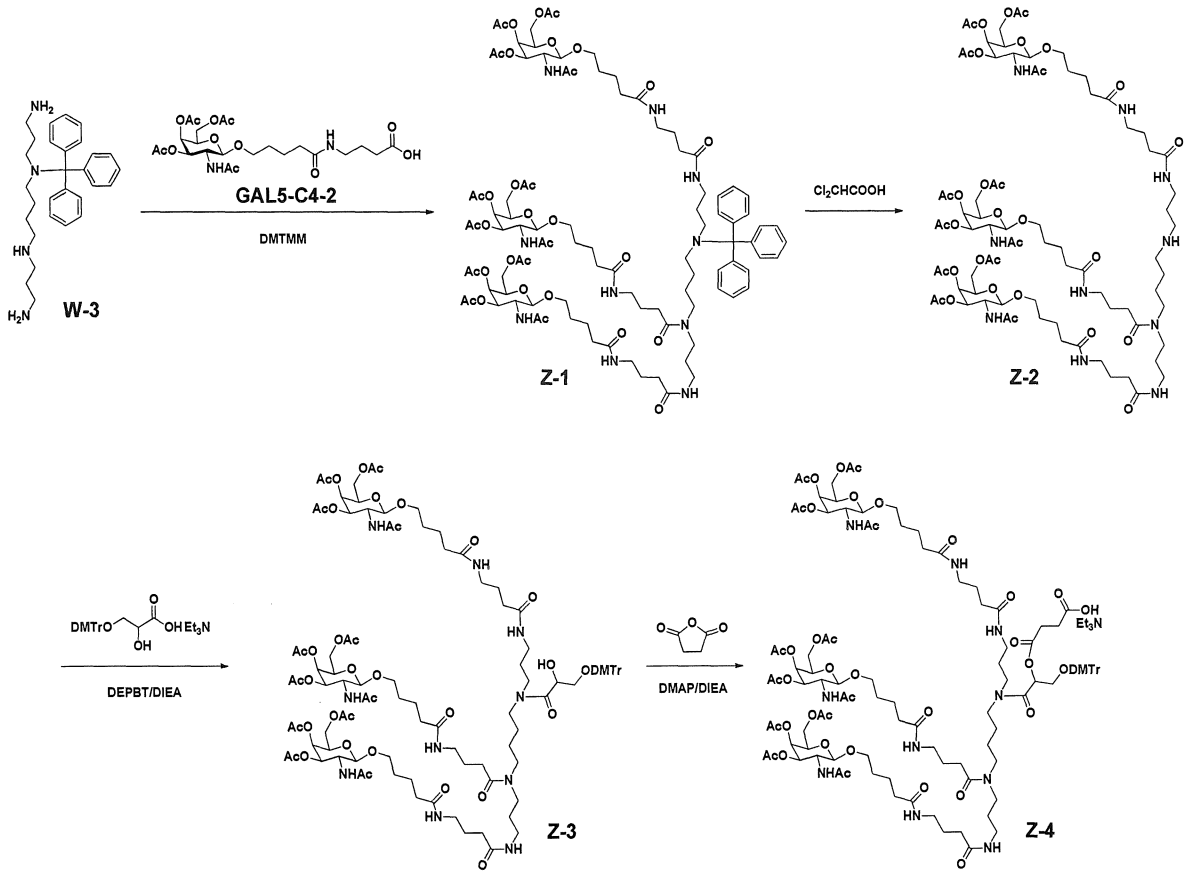
(11-3) Tổng hợp FIN-2



FIN-1 (3,0 g, 3,53 mmol) thu được ở bước (11-2) được hòa tan trong 10 ml DMF, được bổ sung 2,13 g PA (2-xyanoetyl N,N,N',N'-tetraisopropylphosphorodiamidit, Adamas Inc., sản phẩm số 11356B, 7,06 mmol) và 346 mg tetrazol (CAS số: 288-94-8, mua từ Aladdin Inc., 4,94 mmol) trong môi trường khí nitơ, và được khuấy để phản ứng ở nhiệt độ phòng. 10 ml DMF được bổ sung và được khuấy liên tục để phản ứng trong 1 giờ. Dung môi được loại bỏ bằng cách làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột silicagel. Để tinh chế, sản phẩm thô đã hòa tan trong DCM được nạp lên trên cột silicagel được xử lý sơ bộ bằng pyridin để kiềm hóa cột, và được rửa giải bằng etyl axetat. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 4,5 g sản phẩm thô dưới dạng xi-rô không màu. Sản phẩm thô được hòa tan hoàn toàn trong dung dịch axetonitril nước 50% (thể tích/thể tích) và được tinh chế bằng cách sử dụng cột áp suất trung bình (C-18, 330 g, 300 Å) được xử lý sơ bộ bằng dung dịch pyridin 1% (thể tích/thể tích) trong axetonitril để kiềm hóa cột. Sản phẩm được gom bằng cách rửa giải gradien và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 2,2 g sản phẩm dưới dạng bột màu trắng, phân tử tiếp hợp FIN-2 (phân tử tiếp hợp so sánh 3). 31P NMR (162 MHz, CDCl3) δ 148,04, 147,94, 147,62, 147,19, độ tinh khiết theo 31P NMR: 92%; độ tinh khiết theo C18 RP-HPLC: 90,54%.

Ví dụ điều chế 12 - Ví dụ điều chế này được sử dụng để minh họa quá trình điều chế phân tử tiếp hợp Z-4 (phân tử tiếp hợp 153).

Trong ví dụ điều chế này, phân tử tiếp hợp 153 (sau đây còn được gọi là phân tử tiếp hợp Z-4) được tổng hợp theo phương pháp sau đây.



(12-1) tổng hợp Z-1:

W-3 (1,50 g, 3,37 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả ở bước (7-3) và GAL5-C4-2 (7,18 g, 13,48 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả ở bước (2-2) được trộn và hòa tan trong 34 ml diclometan, được bổ sung diisopropyletylamin (3,48 g, 26,96 mmol) sau đó là 3-(dietoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT, 4,04 g, 13,48 mmol) để phản ứng trong 4,5 giờ trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng. Dung dịch lỏng thu được được pha loãng với 100 ml diclometan, rửa bằng 80 ml dung dịch natri bicacbonat bão hòa và 80 ml nước muối bão hòa, một cách tương ứng. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp, sấy khô bằng natri sulfat khan, và lọc. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô, được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel pha thường, 200-300 mesh. Cột này được đóng gói bằng

ete dầu mỏ, được bổ sung trietylamin 1% khối lượng để trung hòa tính axit của silicagel, và được rửa giải gradien bằng diclometan:metanol = 30:1-15:1. Nước giải hấp được gom và làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 3,97 g sản phẩm tinh khiết Z-1. MS m/z: C98H143N10O33, [M+H]+, tính được: 1987,98, đo được: 1987,90.

(12-2) tổng hợp Z-2:

Z-1 (3,97 g, 2,00 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả ở (12-1) được hòa tan trong 250 ml diclometan, và được bổ sung axit dicloaxetic (10,941 g, 84,85 mmol) để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Pyridin được bổ sung để làm trung hòa dung dịch phản ứng thu được về trung tính. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Cột được nạp 200 g silicagel pha thường 200-300 mesh, và với pyridin 10% khối lượng để trung hòa tính axit của silicagel. Cột được cân bằng với pyridin 1‰ khối lượng và được rửa giải gradien bằng diclometan:metanol = 10:1-2:1. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 3,49 g sản phẩm tinh khiết Z-2. MS m/z: C79H129N10O33, [M+H]+, tính được: 1746,94, đo được: 1746,90.

(12-3) tổng hợp Z-3:

Z-2 (3,49 g, 2,0 mmol) và A-1 (3,06 g, 6,0 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả ở bước (1-7a) được trộn và hòa tan trong 30 ml diclometan, và được bổ sung 3-(dietoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT, 1,80 g, 6,0 mmol) sau đó là diisopropyletylamin (1,55 g, 12,0 mmol) để phản ứng trong 3 giờ trong khi khuấy ở 25°C. 100 ml diclometan được bổ sung vào dung dịch phản ứng thu được để pha loãng. Pha hữu cơ được rửa hai lần bằng 30ml natri bicacbonat bão hòa. Pha nước được chiết bằng 10 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp và rửa bằng 50 ml nước muối bão hòa. Và pha hữu cơ thu được được kết hợp và sấy khô bằng natri sulfat khan, và lọc. Dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và phần cặn được sấy bọt qua đêm bằng bơm dầu chân không để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô được cho tinh chế cột bằng cách sử dụng silicagel pha thường, 200-300 mesh, 200 g, với 20 ml trietylamin để trung hòa tính axit của silicagel. Cột được cân bằng với ete dầu mỏ chứa trietylamin 1% khối lượng và được rửa giải gradien bằng diclometan:metanol = 25:1-15:1. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất

giảm để tạo ra 2,2 g sản phẩm tinh khiết Z-3. MS m/z: C103H151N10O38, [M+H]+, tính được: 2136,02, đo được: 2136,20.

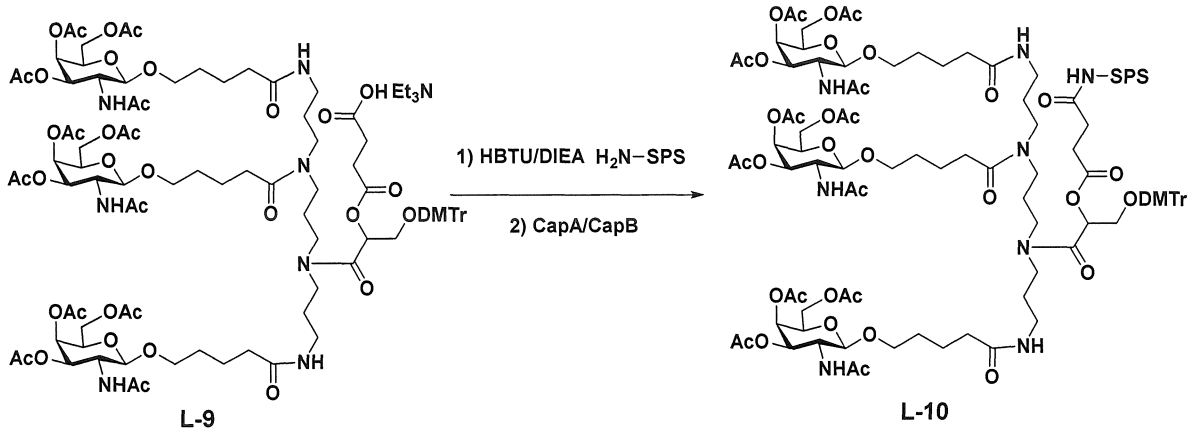
(12-4) tổng hợp Z-4:

Z-3 (2,10 g, 0,983 mmol) được hòa tan trong 14,8 ml diclometan chứa DIEA (635mg, 4,915 mmol), 4-dimetylaminopyridin (DMAP, 240 mg, 1,966 mmol) được bổ sung vào dung dịch thu được và được khuấy đến khi trong. Anhydrit sucxinic (197 mg, 1,966 mmol) được bổ sung để phản ứng trong 18 giờ trong khi khuấy ở 25°C. 50 ml diclometan được bổ sung vào dung dịch phản ứng thu được để pha loãng, và rửa bằng 80 ml trietylamin phosphat 0,5 M. Pha nước được chiết hai lần bằng 50 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra sản phẩm thô. Sản phẩm thô được cho tinh chế cột bằng cách sử dụng silicagel pha thường, 200-300 mesh, 188 g, với trietylamin 1% khối lượng để trung hòa tính axit của silicagel. Cột được cân bằng với diclometan và được rửa giải gradien bằng diclometan chứa trietylamin 1‰ khối lượng:metanol = 10:1-3:1. Nước giải hấp được gom, và dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra 1,95 g sản phẩm tinh khiết, phân tử tiếp hợp Z-4 (phân tử tiếp hợp 12). MS m/z: C107H155N10O41, [M+H]+, tính được: 1935,07, đo được: 1935,29. Cấu trúc của phân tử tiếp hợp Z-4 thu được được thể hiện bằng công thức (422).

Ví dụ điều chế 13 Điều chế thể tiếp hợp L10-siHBa1 (thể tiếp hợp 9)

Trong ví dụ điều chế này, thể tiếp hợp L10-siHBa1 (sau đây còn được gọi là thể tiếp hợp 9) được điều chế từ phân tử tiếp hợp L-9 (phân tử tiếp hợp 1) theo phương pháp sau đây.

(13-1) Tổng hợp hợp chất L-10:



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

Phân tử tiếp hợp L-9 (0,233 g, 0,1126 mmol) thu được ở bước (1-8), O-benzotriazol-tetrametyluroni hexaflophosphat (HBTU, 0,064 g, 0,1689 mmol) và diisopropyletylamin (DIPEA, 0,029 g, 0,2252 mmol) được trộn và hòa tan trong 19 ml axetonitril, và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Nhựa aminometyl (0,901 g, 100-200 mesh, lượng nạp amino: 400 μmol/g, mua từ Tianjin Nankai HECHENG S&T Co., Ltd.) được bổ sung vào chất lỏng phản ứng. Phản ứng được thực hiện trên máy lắc ở 25°C và 220 vòng/phút trong 15 giờ, sau đó lọc. Phần cặn được súc rửa hai lần, mỗi lần bằng 30 ml DCM, ba lần, mỗi lần bằng 30 ml axetonitril, và một lần bằng 30 ml etyl ete, và được sấy bọt trong 2 giờ bằng bơm dầu chân không. Sau đó phản ứng phủ được thực hiện theo tỷ lệ nạp được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2 Tỷ lệ nạp của phản ứng phủ

Nguyên liệu ban đầu	Lượng	Mức	Số Lot	Nhà sản xuất
Cap1	20 ml	——	——	——
Cap2	2,3 ml	——	——	——
DMAP	0,01 g	tinh khiết phân tích	I1422139	Aladdin
axetonitril	2,3 ml	tinh khiết quang phổ	O15161001	CINC (Shanghai) Co., Ltd

Trong bảng trên, Cap 1 và Cap 2 là dung dịch của chất phản ứng phủ. Cap 1 là dung dịch của N-metylimidazol 20% thể tích trong hỗn hợp pyridin/axetonitril, trong đó tỷ lệ thể tích của pyridin với axetonitril là 3:5. Cap 2 là dung dịch của anhydrit axetic 20% thể tích trong axetonitril.

Cap1, Cap2, 4-dimetylaminopyridin (DMAP) và axetonitril được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng trên. Phản ứng được thực hiện trên máy lắc ở 25°C và 200 vòng/phút trong 5 giờ. Chất lỏng phản ứng được lọc. Phần cặn được rửa ba lần, mỗi lần bằng 30 ml axetonitril, dung môi được làm bay hơi đến khô, và hỗn hợp được sấy khô qua đêm trong điều kiện áp suất giảm bằng bơm dầu chân không để tạo ra 1,100 g hợp chất L-10 (tức là, phân tử tiếp hợp L-9 liên kết với giá đỡ pha rắn), với lượng nạp 90,8 μmol/g. Cấu trúc của hợp chất L-10 có thể được thể hiện bằng công thức (523).

(13-2) Tổng hợp sợi có nghĩa của thể tiếp hợp L10-siHB1

Trong bước này, siARN của thể tiếp hợp siARN là trình tự được đánh số là siHBa1:

siHBa1

sợi có nghĩa: 5'- CCUUGAGGCAUACUUCAAA-3' (SEQ ID No: 1),

sợi đối nghĩa: 5'- UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU -3' (SEQ ID No: 2).

Monome nucleosit được liên kết từng cái một với nhau theo hướng 3' đến 5' theo trình tự ở trên bằng phương pháp tổng hợp pha rắn phosphoramidit bắt đầu từ hợp chất L-10 được điều chế ở bước trên. Việc liên kết của mỗi monome nucleosit bao gồm phản ứng bốn bước là giải bảo vệ, ghép đôi, phủ, và oxy hóa. Điều kiện tổng hợp được đưa ra như sau.

Monome nucleosit được cung cấp trong dung dịch axetonitril 0,1 M. Các điều kiện là như nhau đối với từng phản ứng giải bảo vệ, tức là, nhiệt độ là 25°C, thời gian phản ứng là 70 giây, dung dịch axit dicloaxetic trong diclometan (3% thể tích/thể tích) làm chất phản ứng giải bảo vệ, và tỷ lệ mol của axit dicloaxetic với nhóm bảo vệ trên giá đỡ pha rắn của 4,4'-dimetoxytrityl là 5:1.

Các điều kiện là như nhau đối với từng phản ứng ghép đôi, bao gồm nhiệt độ là 25°C, tỷ lệ mol của trình tự axit nucleic liên kết lên trên giá đỡ pha rắn với monome nucleosit là 1:10, tỷ lệ mol của trình tự axit nucleic liên kết lên trên giá đỡ pha rắn với chất phản ứng ghép đôi là 1:65, thời gian phản ứng là 600 giây, và dung dịch axetonitril 0,5 M của 5-etylthio-1H-tetrazol làm chất phản ứng ghép đôi.

Các điều kiện là như nhau đối với từng phản ứng phủ, bao gồm nhiệt độ là 25°C và thời gian phản ứng là 15 giây. Chất phản ứng phủ là dung dịch hỗn hợp của Cap 1 và Cap 2 theo tỷ lệ mol là 1:1; và tỷ lệ mol của chất phản ứng phủ với trình tự axit nucleic liên kết lên trên giá đỡ pha rắn là anhydrit axetic:N-metylimidazol:trình tự axit nucleic liên kết lên trên giá đỡ pha rắn = 1:1:1.

Các điều kiện là như nhau đối với từng phản ứng oxy hóa, bao gồm nhiệt độ là 25°C, thời gian phản ứng là 15 giây, và nước iot 0,05 M làm chất phản ứng oxy hóa; và tỷ lệ mol của iot với trình tự axit nucleic liên kết lên trên giá đỡ pha rắn ở bước ghép đôi là 30:1. Phản ứng được tiến hành trong dung môi hỗn hợp của tetrahydrofuran:nước:pyridin = 3:1:1.

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

amoniac nước, sản phẩm được hòa tan trong N-metylpyrolidon với lượng 0,4 ml/μmol, sau đó bổ sung 0,3 ml/μmol trietylamin và 0,6 ml/μmol trietylamin trihydroflorua, theo lượng của axit nucleic sợi đơn, nhờ đó loại bỏ sự bảo vệ 2'-TBDMS trên riboza. Tinh chế và khử muối: việc tinh chế axit nucleic đạt được bằng cách sử dụng cột sắc ký ion điều chế (Source 15Q) với sự rửa giải gradien của NaCl. Cụ thể là, dung môi rửa giải A:natri phosphat 20 mM (độ pH 8,1), dung môi:nước/axetonitril = 9:1 (thể tích/thể tích); dung môi rửa giải B:natri clorua 1,5 M, natri phosphat 20 mM (độ pH 8,1), dung môi:nước/axetonitril = 9:1 (thể tích/thể tích); gradien rửa giải: tỷ lệ của dung môi rửa giải A:dung môi rửa giải B = 100:0-50:50. Nước giải hấp được gom, kết hợp và khử muối bằng cách sử dụng cột sắc ký pha ngược. Điều kiện riêng bao gồm cột Sephadex được sử dụng để khử muối, với Sephadex-G25 làm chất độn và nước khử ion để rửa giải.

Phát hiện: độ tinh khiết được phát hiện bằng sắc ký trao đổi ion (IEX-HPLC) là 92,4%; và phân tử lượng được phân tích bằng sắc ký lỏng-phổ khối (LC-MS), với giá trị tính được là 7253,96 và giá trị đo được là 7253,12.

Vì vậy, trong bước này, phân tử tiếp hợp L-9 được liên kết với đầu tận 3' của sợi có nghĩa thu được, thu được sợi có nghĩa S của siARN trong đó phân tử tiếp hợp L-9 được tiếp hợp với đầu tận 3' của siARN.

(13-3) Tổng hợp sợi đối nghĩa

Trong bước này, sợi đối nghĩa AS của thể tiếp hợp L10-siHB1 được tổng hợp bằng cách sử dụng giá đỡ pha rắn đa năng (UnyLinker™ loaded NittoPhase®HL Solid Supports, Kinovate Life Sciences Inc.). Sợi đối nghĩa AS của siARN thu được bởi các điều kiện giống như trong quy trình tổng hợp sợi có nghĩa, bao gồm điều kiện của phản ứng giải bảo vệ, ghép đôi, phủ, và oxy hóa trong phương pháp tổng hợp pha rắn, điều kiện giải bảo vệ và phân cắt, và điều kiện phân lập.

Phát hiện: độ tinh khiết được phát hiện bằng IEX-HPLC là 93,2%; và phân tử lượng được phân tích bằng LC-MS, với giá trị tính được là 6675,04 và giá trị đo được là 6674,50.

(13-4) Tổng hợp thể tiếp hợp L10-siHBa1

Sợi S và sợi AS được hòa tan trong nước dùng cho tiêm để thu được dung dịch 40 mg/mL, một cách tương ứng. Chúng được trộn theo tỷ lệ đẳng mol, được gia nhiệt trong 15 phút ở 50°C, và sau đó được làm mát đến nhiệt độ phòng để tạo ra cấu trúc sợi kép qua liên kết hydro.

Sau khi hoàn tất quá trình tổng hợp ở trên, thể tiếp hợp được pha loãng đến nồng độ 0,2 mg/mL bằng cách sử dụng nước siêu tinh khiết (tự làm bằng công cụ nước siêu tinh khiết Milli-Q, với điện trở suất 18,2MΩ*cm (25°C)). Phân tử lượng được đo bằng LC-MS (mua từ Waters Corp., mô hình: LCT Premier). Kết quả là, các giá trị phân tử lượng tính được cho S và AS là 7253,96 và 6675,04 một cách tương ứng, và giá trị đo được của chúng là 7253,24 và 6674,61 một cách tương ứng. Được xác nhận rằng thể tiếp hợp đã tổng hợp là trình tự axit nucleic sợi kép được thiết kế đúng đích với phân tử tiếp hợp L9, vì giá trị đo được tương quan với giá trị tính được. Cấu trúc của thể tiếp hợp L10-siHBa1 (thể tiếp hợp 9) được thể hiện bằng công thức (3).

Ví dụ điều chế 14 Điều chế thể tiếp hợp 16-18, 24-26, 42-43, 62, 78, 105, 109, 111, 115, 144, và 154-171

Các thể tiếp hợp đã nêu được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp giống như ở ví dụ điều chế 13, ngoại trừ việc: 1) siARN được tiếp hợp có trình tự được thể hiện trong các bảng 3A-3G tương ứng với các thể tiếp hợp 16-18, 24-26, 42-43, 62, 78, 105, 109, 111, 115, 144, 157-163, và 167-171; 2) khi liên kết phosphorothioat tồn tại giữa hai nucleotit trong trình tự đích, thì bước phản ứng sulfua hóa sau đây được sử dụng để thay thế bước phản ứng oxy hóa trong quy trình liên kết sau đó của hai nucleotit; các điều kiện là như nhau đối với từng phản ứng sulfua hóa, bao gồm nhiệt độ là 25°C, thời gian phản ứng là 300 giây, và xanthan hydrit làm chất phản ứng sulfua hóa; tỷ lệ mol của chất phản ứng sulfua hóa với trình tự axit nucleic liên kết lên trên giá đỡ pha rắn ở bước ghép đôi là 120:1; phản ứng được tiến hành trong dung môi hỗn hợp của axetonitril:pyridin = 1:1; và 3) khi vị trí 2' của tất cả các nucleotit trong trình tự đích đều là nhóm hydroxyl được cải biến, thì bước loại bỏ sự bảo vệ 2'-TBDMS trên riboza không được bao gồm trong điều kiện phân cắt và giải bảo vệ. Do đó, các thể tiếp hợp 16-18, 24-26, 42-43, 62, 78, 105, 109, 111, 115, 144, 157-163 theo sáng chế được điều chế.

Ngoài ra, các thể tiếp hợp 154-156 và 164-166 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp giống như trong ví dụ điều chế 13, ngoại trừ: phân tử tiếp hợp sau đây được sử dụng để thay thế phân tử tiếp hợp L-9, một cách tương ứng: Thể tiếp hợp 164 được điều chế từ phân tử tiếp hợp P-9 (phân tử tiếp hợp 2) thu được trong ví dụ điều chế 2; thể tiếp hợp 155, 156 và 165 được điều chế từ phân tử tiếp hợp W-7 (phân tử tiếp hợp 7) thu được trong ví dụ điều chế 7; thể tiếp hợp 154 và 166 được điều chế từ Z-4 (phân tử tiếp hợp 12) thu được trong ví dụ điều chế 12, và các siARN được tiếp hợp có trình tự được thể hiện trong các bảng 3A-3G tương ứng với các thể tiếp hợp 154-156 và 164-166, một cách tương ứng, và thể tiếp hợp được đánh số riêng rẽ theo các bảng 3A-3G. Các cấu trúc của chúng được thể hiện bằng công thức (3), công thức (4), công thức (15) và công thức (22), một cách tương ứng. Phân tử lượng của các thể tiếp hợp được đo bằng LC-MS như sau:

Thể tiếp hợp 142: Giá trị tính được S: 7649,55, AS: 6991,46,

Giá trị đo được: S: 7649,1, AS: 6991;

Thể tiếp hợp170: Giá trị tính được S: 7649,55, AS: 6995,47,

Giá trị đo được: S: 7648,8, AS: 6994,8;

Thể tiếp hợp 171: Giá trị tính được S: 7649,55, AS: 7011,53,

Giá trị đo được: S: 7648,8, AS: 7010,9;

Thể tiếp hợp 115: Giá trị tính được S: 7584,5, AS: 7007,46,

Giá trị đo được: S: 7584, AS: 7006,2;

Thể tiếp hợp 109: Giá trị tính được S: 7584,5, AS: 6931,47,

Giá trị đo được: S: 7584, AS: 6930,9;

Thể tiếp hợp 106: Giá trị tính được S: 7572,47, AS: 6907,41,

Giá trị đo được: S: 7571,8, AS: 6906,9;

Thể tiếp hợp 113: Giá trị tính được S: 7584,5, AS: 7011,47,

Giá trị đo được: S: 7584, AS: 7011,3;

Thể tiếp hợp 17: Giá trị tính được S: 7504,34, AS: 6961,52,

Giá trị đo được: S: 7503,4, AS: 6960,9;

Thể tiếp hợp 25: Giá trị tính được S: 7504,34, AS: 7037,51,

Giá trị đo được: S: 7503,6, AS: 7036,9;

Thể tiếp hợp 18: Giá trị tính được S: 8218,83, AS: 7703,05,

Giá trị đo được: S: 8218, AS: 7702,5;

Thể tiếp hợp 16: Giá trị tính được S: 7516,37, AS: 6985,58,

Giá trị đo được: S: 7516,5, AS: 6984,9;

Thể tiếp hợp 159: Giá trị tính được S: 7504,34, AS: 7057,58,

Giá trị đo được: S: 7503,6, AS: 7057;

Thể tiếp hợp 160: Giá trị tính được S: 7504,34, AS: 7041,52,

Giá trị đo được: S: 7503,6, AS: 7040,8;

Thể tiếp hợp 161: Giá trị tính được S: 7516,37, AS: 7065,58,

Giá trị đo được: S: 7516,6, AS: 7064,5;

Thể tiếp hợp 162: Giá trị tính được S: 7504,34, AS: 7139.68,

Giá trị đo được: S: 7515,6, AS: 7138,9;

Thể tiếp hợp 163: Giá trị tính được S: 7516,37, AS: 7081,64,

Giá trị đo được: S: 7515,6, AS: 7080,9;

Thể tiếp hợp 62: Giá trị tính được S: 7485,3, AS: 7161,7,

Giá trị đo được: S: 7484,4, AS: 7160,9;

Thể tiếp hợp 78: Giá trị tính được S: 7423,22, AS: 7207,78,

Giá trị đo được: S: 7422,6, AS: 7207,2;

Thể tiếp hợp 42: Giá trị tính được S: 7407,22, AS: 7208,77,

Giá trị đo được: S: 7406,4, AS: 7208,1;

Thể tiếp hợp 43: Giá trị tính được S: 7407,22, AS: 7170,72,

Giá trị đo được: S: 7406,5, AS: 7170,1,

và các giá trị đo được này tương quan với giá trị tính được.

Bảng 3A thể tiếp hợp siARN

Bảng 3A

Thể tiếp hợp	Số	Hướng trình tự 5' - 3'		SEQ ID NO
Thể tiếp hợp 10	L10-siHBa1	S*	CCUUGAGGCAUACUUCAAA	1
		AS	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU	2
Thể tiếp hợp 11	L10-siHBa2	S	GACCUUGAGGCAUACUUCAAA	3
		AS	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCGG	4
Thể tiếp hợp 12	L10-siHBa1M1	S	CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	5
		AS	UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	6
Thể tiếp hợp 13	L10-siHBa1M2	S	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	7
		AS	UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	8
Thể tiếp hợp 14	L10-siHBa2M1	S	GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	9
		AS	UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	10
Thể tiếp hợp 15	L10-siHBa2M2	S	GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	11
		AS	UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	12
Thể tiếp hợp 16	L10-siHBa1M1S	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13

		AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	14
Thể tiếp hợp 17	L10-siHBa1M2S	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	15
		AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	16
Thể tiếp hợp 18	L10-siHBa2M1S	S	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	17
		AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	18
Thể tiếp hợp 19	L10-siHBa2M2S	S	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	19
		AS	UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	20
Thể tiếp hợp 20	L10-siHBa1M1P	S	CmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	5
		AS	VP-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	136
Thể tiếp hợp 21	L10-siHBa1M2P	S	CmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	7
		AS	VP-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmUm	137
Thể tiếp hợp 22	L10-siHBa2M1P	S	GmAmCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	9
		AS	VP-UmUfUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	138
Thể tiếp hợp 23	L10-siHBa2M2P	S	GmAmCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	11

		AS	VP-UmUfUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmGmGm	139
Thể tiếp hợp 24	L10-siHBa1M1SP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	140
Thể tiếp hợp 25	L10-siHBa1M2SP	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	15
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	141
Thể tiếp hợp 26	L10-siHBa2M1SP	S	GmsAmsCmCmUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	17
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	142
Thể tiếp hợp 27	L10-siHBa2M2SP	S	GmsAmsCmCmUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	19
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmUmCmsGmsGm	143
Thể tiếp hợp 28	L10-siHBa1M5SP	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	15
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	140
Thể tiếp hợp 29	L10-siHBa1M3SP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGmCfAmUfAmCmUmUmCmAmAmAm	144
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	140

Thể tiếp hợp 30	L10-siHBa1M4SP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	145
Thể tiếp hợp 31	P10-siHBa1M1SP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	140
Thể tiếp hợp 32	R5-siHBa1M1SP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	140
Thể tiếp hợp 33	LA5-siHBa1M1SP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	140
Thể tiếp hợp 34	LB5-siHBa1M1SP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	140
Thể tiếp hợp 35	V8-siHBa1M1SP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	140
Thể tiếp hợp 36	W8-siHBa1M1SP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13

		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	140
Thể tiếp hợp 37	X8-siHBa1M1SP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	140
Thể tiếp hợp 154	Z5-siHBa1M2SP	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	15
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	141
Thể tiếp hợp 155	W8-siHBa1M2SP	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	15
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	141
Thể tiếp hợp so sánh 4	K4-siHBa1M1SP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	140
Thể tiếp hợp so sánh 5	(GalNAc)3-siHBa1M1SP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	140
Thể tiếp hợp so sánh 6	FIN-siHBa1M1SP	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	13
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	140

Bảng 3B

Thể tiếp hợp	Số	Hướng trình tự 5' - 3'		SEQ ID NO
Thể tiếp hợp 38	L10-siHBb1M1S	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38
		AS	UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	39
Thể tiếp hợp 39	L10-siHBb2M1S	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38
		AS	UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	40
Thể tiếp hợp 40	L10-siHBb1M2	S	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	35
		AS	UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCm	36
Thể tiếp hợp 41	L10-siHBb2M2	S	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	35
		AS	UmAfGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmUmUm	37
Thể tiếp hợp 42	L10-siHBb1M1SP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	146
Thể tiếp hợp 43	L10-siHBb2M1SP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	147
Thể tiếp hợp 44		S	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	41

	L10-siHBb1M2SP	AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	148
Thể tiếp hợp 45	L10-siHBb2M2SP	S	UmsGmsCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	41
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGfAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	149
Thể tiếp hợp 46	L10-siHBb1M5SP	S	UmGmCmUmAfUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	41
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	146
Thể tiếp hợp 47	L10-siHBb1M3SP	S	UmsGmsCmUmAfUmGfCmCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	150
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	146
Thể tiếp hợp 48	L10-siHBb1M4SP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUfGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsGmsCm	151
Thể tiếp hợp 49	L10-siHBb4M1SP	S	GmsCmsUmGmCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	152
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmGmCmsGmsCm	153
Thể tiếp hợp 50	L10-siHBb1	S	UGCUAUGCCUCAUCUUCUA	29
		AS	UAGAAGAUGAGGCAUAGCAGC	30
Thể tiếp hợp 51	L10-siHBb2	S	UGCUAUGCCUCAUCUUCUA	29
		AS	UAGAAGAUGAGGCAUAGCAUU	31

Thể tiếp hợp 52	P10-siHBb2M1 SP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	147
Thể tiếp hợp 53	R5-siHBb2M1 SP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	147
Thể tiếp hợp 54	LA5-siHBb2M1 SP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	147
Thể tiếp hợp 55	LB5-siHBb2M1 SP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	147
Thể tiếp hợp 56	V8-siHBb2M1 SP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	147
Thể tiếp hợp 57	W8-siHBb2M1 SP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	147
Thể tiếp hợp 58		S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38

	X8-siHBb2M1SP	AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	147
Thể tiếp hợp so sánh 7	K4-siHBb2M1SP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	147
Thể tiếp hợp so sánh 8	GalNAc-siHBb2M1SP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	147
Thể tiếp hợp so sánh 9	FIN-siHBb2M1SP	S	UmsGmsCmUmAmUmGfCfCfUmCmAmUmCmUmUmCmUmAm	38
		AS	VP-UmsAfsGmAmAmGfAmUmGmAmGmGmCmAfUmAfGmCmAmsUmsUm	147

Bảng 3C

Thể tiếp hợp	Số	Hướng trình tự 5' - 3'		SEQ ID NO
Thể tiếp hợp 59	L10-siHBc1	S	UCUGUGCCUUCUCAUCUGA	52
		AS	UCAGAUGAGAAGGCACAGACG	53
Thể tiếp hợp 60	L10-siHBc1M1	S	UmCmUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	54
		AS	UmCfAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmCmGm	55
Thể tiếp hợp 61	L10-siHBc1M2	S	UmCmUmGmUfGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	56
		AS	UmCfAmGmAmUfGmAfGfAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmCmGm	57

Thể tiếp hợp 62	L10-siHBc1M1SP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	58
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	154
Thể tiếp hợp 63	L10-siHBc1M2SP	S	UmsCmsUmGmUfGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	60
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAfGfAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	155
Thể tiếp hợp 64	L10-siHBc1M3SP	S	UmsCmsUmGmUfGmCfCmUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	156
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	154
Thể tiếp hợp 65	L10-siHBc1M4SP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	58
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAfGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	157
Thể tiếp hợp 66	L10-siHBc1M5SP	S	UmsCmsUmGmUfGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	60
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	154
Thể tiếp hợp 67	L10-siHBc2M1SP	S	CmsGmsUmCmUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	158
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAfGfAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGmGmGm	159
Thể tiếp hợp 68		S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	58

	P10-siHBc1M1SP	AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	154
Thể tiếp hợp 69	R5-siHBc1M1SP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	58
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	154
Thể tiếp hợp 70	LA5-siHBc1M1SP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	58
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	154
Thể tiếp hợp 71	LB5-siHBc1M1SP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	58
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	154
Thể tiếp hợp 72	V8-siHBc1M1SP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	58
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	154
Thể tiếp hợp 73	W8-siHBc1M1SP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	58
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	154
Thể tiếp hợp 74	X8-siHBc1M1SP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	58
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	154

Thể tiếp hợp so sánh 10	K4-siHBc1M1SP	S	UmsCmsUmGmUmGmCfCfUfUmCmUmCmAmUmCmUmGmAm	58
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAmGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	154

Bảng 3D

Thể tiếp hợp	Số	Hướng trình tự 5' - 3'		SEQ ID NO
Thể tiếp hợp 75	L10-siHBd1	S	CGUGUGCACUUCGCUUCAA	66
		AS	UUGAAGCGAAGUGCACACGGU	67
Thể tiếp hợp 76	L10-siHBd1M1	S	CmGmUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	68
		AS	UmUfGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmGmUm	69
Thể tiếp hợp 77	L10-siHBd1M2	S	CmGmUmGmUfGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	70
		AS	UmUfGmAmAmGfCmGfAfAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmGmUm	71
Thể tiếp hợp 78	L10-siHBd1M1SP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	72
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	160
Thể tiếp hợp 79	L10-siHBd1M2SP	S	CmsGmsUmGmUfGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	74
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGfAfAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	161
Thể tiếp hợp 80		S	CmsGmsUmGmUfGmCfAmCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	162

	L10-siHBd1M3SP	AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	160
Thể tiếp hợp 81	L10-siHBd1M4SP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	72
		AS	VP-UmsCfsAmGmAmUfGmAfGmAmAmGmGmCfAmCfAmGmAmsCmsGm	163
Thể tiếp hợp 82	L10-siHBd1M5SP	S	CmsGmsUmGmUfGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	74
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	160
Thể tiếp hợp 83	L10-siHBd2M1SP	S	AmsCmsCmGmUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	164
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmGmUmsCmsCm	165
Thể tiếp hợp 84	P10-siHBd1M1SP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	72
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	160
Thể tiếp hợp 85	R5-siHBd1M1SP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	72
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	160
Thể tiếp hợp 86	LA5-siHBd1M1SP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	72
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	160

Thể tiếp hợp 87	LB5-siHBd1M1SP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	72
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	160
Thể tiếp hợp 88	V8-siHBd1M1SP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	72
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	160
Thể tiếp hợp 89	W8-siHBd1M1SP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	72
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	160
Thể tiếp hợp 90	X8-siHBd1M1SP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	72
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	160
Thể tiếp hợp so sánh 11	K4-siHBd1M1SP	S	CmsGmsUmGmUmGmCfAfCfUmUmCmGmCmUmUmCmAmAm	72
		AS	VP-UmsUfsGmAmAmGfCmGmAmAmGmUmGmCfAmCfAmCmGmsGmsUm	160

Bảng 3E

Thể tiếp hợp	Số	Hướng trình tự 5’ - 3’		SEQ ID NO
Thể tiếp hợp 91	L10-siAN1	S	CCAAGAGCACCAAGAACUA	80
		AS	UAGUUCUUGGUGCUCUUGGCU	81

Thể tiếp hợp 92	L10-siAN2	S	AGCCAAGAGCACCAAGAACUA	82
		AS	UAGUUCUUGGUGCUCUUGGCUU G	83
Thể tiếp hợp 93	L10-siAN1M1	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm	84
		AS	UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGm CmUfCmUfUmGmGmCmUm	85
Thể tiếp hợp 94	L10-siAN2M1	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCm CmAmAmGmAmAmCmUmAm	86
		AS	UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGm CmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	87
Thể tiếp hợp 95	L10-siAN1M2	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm	84
		AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUm GmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	88
Thể tiếp hợp 96	L10-siAN2M2	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCm CmAmAmGmAmAmCmUmAm	86
		AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUm GmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmG m	89
Thể tiếp hợp 97	L10-siAN1M3	S	CmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmA mAmGmAmAmCmUmAm	90
		AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUm GmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	88
Thể tiếp hợp 98	L10-siAN2M3	S	AmGmCmCmAmAmGmAmGfCfAfC mCmAmAmGmAmAmCmUmAm	91
		AS	UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUm GmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmG m	89
Thể tiếp hợp 99	L10-siAN1M1P	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAm AmGmAmAmCmUmAm	84

		AS	VP-UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	166
Thể tiếp hợp 100	L10-siAN2M1P	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	86
		AS	VP-UmAfGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	167
Thể tiếp hợp 101	L10-siAN1M2P	S	CmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	84
		AS	VP-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	168
Thể tiếp hợp 102	L10-siAN2M2P	S	AmGmCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	86
		AS	VP-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	169
Thể tiếp hợp 103	L10-siAN1M3P	S	CmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	90
		AS	VP-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUm	168
Thể tiếp hợp 104	L10-siAN2M3P	S	AmGmCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	91
		AS	VP-UmAfGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmUmGm	169
Thể tiếp hợp 105	L10-siAN1M1S	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	92
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	93
Thể tiếp hợp 106	L10-siAN2M1S	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	94

		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	95
Thể tiếp hợp 107	L10-siAN1M2S	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	92
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	96
Thể tiếp hợp 108	L10-siAN2M2S	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	94
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	97
Thể tiếp hợp 109	L10-siAN1M3S	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	96
Thể tiếp hợp 110	L10-siAN2M3S	S	AmsGmsCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	99
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	97
Thể tiếp hợp 111	L10-siAN1M1SP	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	92
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	170
Thể tiếp hợp 112	L10-siAN2M1SP	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	94
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUfGfGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	171
Thể tiếp hợp 113		S	CmsCmsAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	92

	L10-siAN1M2SP	AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	172
Thể tiếp hợp 114	L10-siAN2M2SP	S	AmsGmsCmCmAmAmGfAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	94
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	173
Thể tiếp hợp 115	L10-siAN1M3SP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	172
Thể tiếp hợp 116	L10-siAN2M3SP	S	AmsGmsCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	99
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	173
Thể tiếp hợp 117	L10-siAN1M4S	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUfGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	174
Thể tiếp hợp 118	L10-siAN1M4SP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUfGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	175
Thể tiếp hợp 119	L10-siAN1M5S	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCmAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	176
		AS	UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	177

Thể tiếp hợp 120	L10-siAN1M5SP	S	CmsCmsAmAmGfAmGfCmAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	176
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	178
Thể tiếp hợp 121	P10-siAN1M3SP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	172
Thể tiếp hợp 122	R5-siAN1M3SP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	172
Thể tiếp hợp 123	LA5-siAN1M3SP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	172
Thể tiếp hợp 124	LB5-siAN1M3SP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	172
Thể tiếp hợp 125	V8-siAN1M3SP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	172
Thể tiếp hợp 126		S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98

	W8-siAN1M3SP	AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	172
Thể tiếp hợp 127	X8-siAN1M3SP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	172
Thể tiếp hợp 156	W8-siAN1M3SPs	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
		AS	Ps-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	203
Thể tiếp hợp 157	L10-siAN1M3SPs	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
		AS	Ps-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	203
Thể tiếp hợp so sánh 12	K4-siAN1M3SP	S	CmsCmsAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	98
		AS	VP-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmsCmsUm	172

Bảng 3F

Thể tiếp hợp	Số	Hướng trình tự 5’ - 3’		SEQ ID NO
Thể tiếp hợp 128	L10-siAP1	S	CAAUAAAGCUGGACAAGAA	108
		AS	UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG	109
	L10-siAP2	S	CCCAAUAAAGCUGGACAAGAA	110

Thể tiếp hợp 129		AS	UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGGAG	111
Thể tiếp hợp 130	L10-siAP1M1	S	CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	112
		AS	UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	113
Thể tiếp hợp 131	L10-siAP2M1	S	CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	114
		AS	UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	115
Thể tiếp hợp 132	L10-siAP1M2	S	CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	116
		AS	UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	117
Thể tiếp hợp 133	L10-siAP2M2	S	CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	118
		AS	UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	119
Thể tiếp hợp 134	L10-siAP1M1P	S	CmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	112
		AS	VP-UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	179
Thể tiếp hợp 135	L10-siAP2M1P	S	CmCmCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	114
		AS	VP-UmUfCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	180
Thể tiếp hợp 136	L10-siAP1M2P	S	CmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	116

		AS	VP-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGm	181
Thể tiếp hợp 137	L10-siAP2M2P	S	CmCmCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	118
		AS	VP-UmUfCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmAmGm	182
Thể tiếp hợp 138	L10-siAP1M1S	S	CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	120
		AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	121
Thể tiếp hợp 139	L10-siAP2M1S	S	CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	122
		AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	123
Thể tiếp hợp 140	L10-siAP1M2S	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	124
		AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	125
Thể tiếp hợp 141	L10-siAP2M2S	S	CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	126
		AS	UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	127
Thể tiếp hợp 142	L10-siAP1M1SP	S	CmsAmsAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	120
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	183
Thể tiếp hợp 143		S	CmsCmsCmAmAmUmAfAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	122

	L10-siAP2M1SP	AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCfCfAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	184
Thể tiếp hợp 144	L10-siAP1M2SP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	124
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	185
Thể tiếp hợp 145	L10-siAP2M2SP	S	CmsCmsCmAmAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	126
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmGmGmsAmsGm	186
Thể tiếp hợp 146	P10-siAP1M2SP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	124
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	185
Thể tiếp hợp 147	R5-siAP1M2SP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	124
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	185
Thể tiếp hợp 148	LA5-siAP1M2SP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	124
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	185
Thể tiếp hợp 149	LB5-siAP1M2SP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	124
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	185

Thể tiếp hợp 150	V8-siAP1M2SP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	124
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	185
Thể tiếp hợp 151	W8-siAP1M2SP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	124
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	185
Thể tiếp hợp 152	X8-siAP1M2SP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	124
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	185
Thể tiếp hợp so sánh 13	K4-siAP1M3SP	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	124
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	185

Bảng 3G

Thể tiếp hợp	Số	Hướng trình tự 5' - 3'		SEQ ID NO
Thể tiếp hợp 158	L10-simTTR	S	AfsAmsCfAmGfUmGfUmUfCfUfUmGfCmUfCmUfAmUfAmAf	204
		AS	UmsUfsAmUfAmGfAmGfCmAfAmGmAmAfCmAfCmUfGmUfUmsUmsUm	205
Thể tiếp hợp 159	L10-siHBa1M2Sps	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	206

		AS	ps-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	207
Thể tiếp hợp 160	L10-siHBa1M2Sp	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	208
		AS	p-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	209
Thể tiếp hợp 161	L10-siHBa1M1Sp	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	210
		AS	p-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	211
Thể tiếp hợp 162	L10-siHBa1M1SpsT	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	212
		AS	ps-TmoesUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	213
Thể tiếp hợp 163	L10-siHBa1M1Sps	S	CmsCmsUmUmGmAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	214
		AS	ps-UmsUfsUmGmAmAfGmUmAmUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	215
Thể tiếp hợp 164	P10-siHBa1M2SP	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	216
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	217
Thể tiếp hợp 165	W8-siHBa1M2SP	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	218

		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	219
Thể tiếp hợp 166	Z5-siHBa1M2SP	S	CmsCmsUmUmGfAmGfGfCfAmUmAmCmUmUmCmAmAmAm	220
		AS	VP-UmsUfsUmGmAmAfGmUfAfUmGmCmCmUfCmAfAmGmGmsUmsUm	221
Thể tiếp hợp 167	L10-siP1M1Sp	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	222
		AS	p-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	223
Thể tiếp hợp 168	L10-siP1M1SP	S	GmsAmsAmAmGmUmAfUfGfUmCmAmAmCmGmAmAmUmAm	224
		AS	VP-UmsAfsUmUmCmGfUmUmGmAmCmAmUmAfCmUfUmUmCmsUmsUm	225
Thể tiếp hợp 169	L10-siAN2M1Sp	S	AmsGmsCmCmAmAmGmAmGfCfAfCmCmAmAmGmAmAmCmUmAm	226
		AS	p-UmsAfsGmUmUmCfUmUmGmGmUmGmCmUfCmUfUmGmGmCmUmsUmsGm	227
Thể tiếp hợp 170	L10-siAP1M1Sp	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	228
		AS	p-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	229
Thể tiếp hợp 171	L10-siAP1M1Sps	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	230

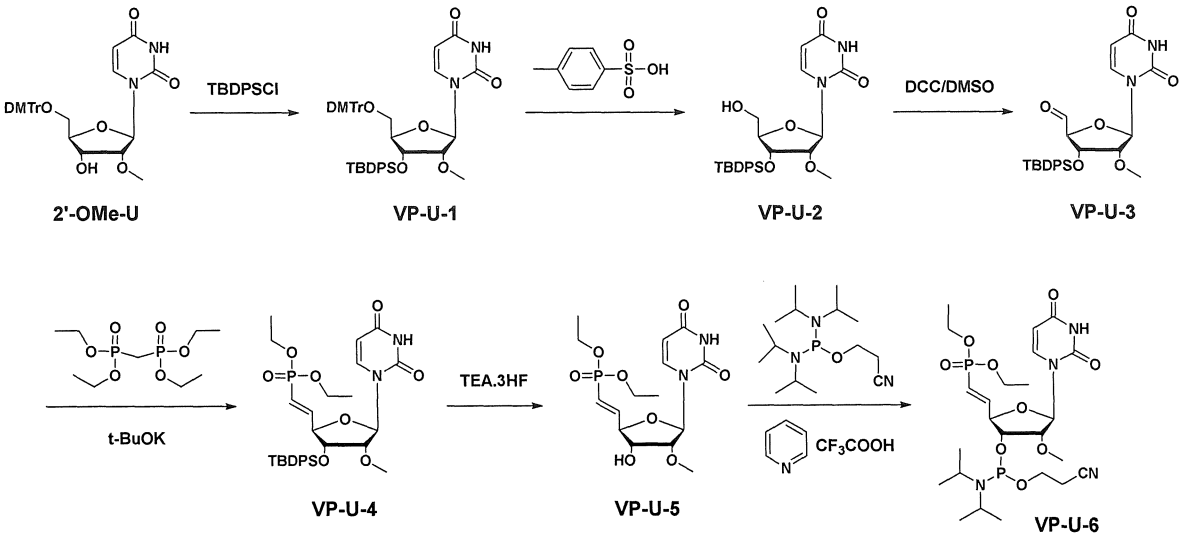
		AS	ps-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	231
Thể tiếp hợp so sánh 14	K4-simTTR	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	232
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	233
Thể tiếp hợp so sánh 15	AD-66810	S	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCfUmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	234
		AS	VP-UmsUfsCmUmUmGfUmCmCmAmGmCmUmUfUmAfUmUmGmsGmsGm	235
Thể tiếp hợp so sánh 16	AD-65695	S	AmsCmsAmUmAmUmUfUmGfAfUfCmAmGmUmCmUmUmUmUmUm	195
		AS	AmsAfsAmAmAmGfAmCmUmGmAmUmCmAfAmAfUmAmUmGmUmsUmsGm	196
Thể tiếp hợp so sánh 17	AD-69535	S	GmsCmsUmUmAmAmAmAmGfGmGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmAm	197
		AS	UmsGfsAmAmUmAmCmUmGmUmCmCfCmUfUmUmUmAmAmGmCmsAmsAm	198
So sánh siARN 18	X2M2	S	CmCmUmUmGAGGCmAUmACmUmUmCmAAAdTsdT	236
		AS	UfUmUfGAAGUfAUGCCUfCAAGGdTsdT	237

*S: sợi có nghĩa; AS: sợi đối nghĩa

Lưu ý: chữ in hoa C, G, U, và A chỉ thành phần bazơ của nucleotit; dT chỉ deoxythymin nucleotit; chữ in thường m chỉ rằng nucleotit liền kề phía bên trái của chữ

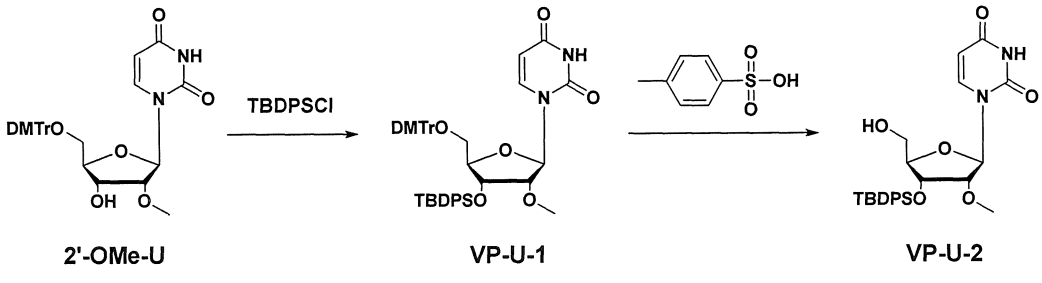
m là nucleotit cải biến bằng 2'-metoxy; chữ in thường f chỉ rằng nucleotit liền kề phía bên trái của chữ f là nucleotit cải biến bằng 2'-flo; chữ in thường s chỉ liên kết phosphorothioat giữa hai nucleotit liền kề cả hai bên của chữ s; VP chỉ rằng nucleotit liền kề phía bên phải của chữ VP là nucleotit cải biến bằng vinyl phosphat; P chỉ rằng nucleotit liền kề phía bên phải của chữ P là phosphat nucleotit; Ps chỉ rằng nucleotit liền kề phía bên phải của chữ Ps là nucleotit cải biến bằng phosphorothioat; Tmoe chỉ thymin nucleotit được cải biến bằng 2'-metoxyetoxyl.

Vinyl phosphat và uridin monome cải biến bằng 2'-metoxy (VP-Um) được tổng hợp theo phương pháp sau đây:



(14-1) tổng hợp VP-U-2

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

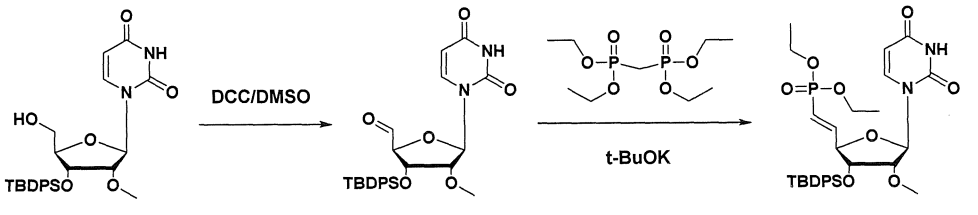


Uraxil nucleosit cải biến bằng 2'-metoxy (2'-OMe-U, 51,30 g, 91,6 mmol), tert-butyl diphenylclosilan (TBDPSCl, 50,35 g, 183,2 mmol), và imidazol (12,47 g, 183,2 mmol) được trộn và hòa tan trong 450 ml N,N-dimetylformamit (DMF) để phản ứng trong 20 giờ trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng. DMF được loại bỏ bằng cách bay hơi,

và phần cặn được hòa tan với 600 ml diclometan và rửa bằng 300 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha nước đã phân lập được chiết ba lần, mỗi lần bằng 300 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp, rửa bằng axit oxalic 5% cho tới khi thu được pha nước có độ pH<5. Dung môi được làm bay hơi đến khô để tạo ra sản phẩm thô VP-U-1, được sử dụng trực tiếp ở quá trình tổng hợp tiếp theo của VP-U-2.

Sản phẩm thô VP-U-1 được hòa tan trong 100 ml diclometan, và sau đó được khuấy trong 10 phút trong bể đá. 450 ml dung dịch axit p-toluensulfonic 2% (với dung môi hỗn hợp của metanol và diclometan theo tỷ lệ thể tích 3:7) đã được làm lạnh từ trước trong tủ lạnh ở 4°C được bổ sung để phản ứng trong 10 phút. Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 200 ml natri bicacbonat bão hòa. Pha hữu cơ thu được được rửa bằng cách bổ sung dung dịch natri bicacbonat bão hòa đến độ pH=8. Các pha nước được kết hợp và được chiết hai lần bằng 200 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp và rửa một lần bằng 200 ml nước muối bão hòa. Dung môi được làm bay hơi, và phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel pha thường, 200-300 mesh. Cột được đóng gói với ete dầu mỏ và được rửa giải gradien bằng ete dầu mỏ:etyl axetat:diclometan:metanol = 1:1:1:0,05-1:1:1:0,25. Nước giải hấp được gom, dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và phần cặn được sấy bọt bằng bơm dầu chân không để tạo ra tổng cộng 40,00 g sản phẩm tinh khiết VP-U-2. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,96 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,64 (dtd, J = 5,1, 4,0, 2,2 Hz, 4H), 7,41–7,30 (m, 6H), 6,79 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 5,73 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 4,94 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 4,12 (td, J = 4,6, 3,9 Hz, 1H), 4,05 (dd, J = 4,8, 4,0 Hz, 1H), 3,96 (t, J = 4,7 Hz, 1H), 3,68 (ddd, J = 11,8, 7,0, 4,6 Hz, 1H), 3,57 – 3,46 (m, 1H), 3,39 (s, 3H), 1,05 (s, 8H). MS m/z: C26H33N2O6Si, [M+H]+, tính được: 497,21, Đo được: 497,45.

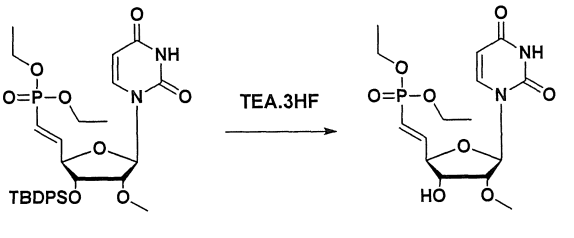
(14-2) tổng hợp VP-U-4:



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

VP-U-2 (19,84 g, 40,0 mmol), dixyclohexylcarbodiimit (DCC, 16,48 g, 80,0 mmol), pyridin (4,20 g, 53,2 mmol), và axit trifloaxetic (6,61 g, 53,2 mmol) được trộn và hòa tan trong 200 ml dimetyl sulfoxit (DMSO) để phản ứng trong 20 giờ trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng để thu được chất lỏng phản ứng. Riêng biệt, tetraetyl metylendiphosphat (21,44 g, 74,4 mmol) được hòa tan trong 120 ml THF, làm mát trong bể đá, được bổ sung t-BuOK (11,36 g, 101,2 mmol) ở nhiệt độ của bể đá để phản ứng trong 10 phút, được làm ấm đến nhiệt độ phòng để phản ứng trong 0,5 giờ và được bổ sung vào chất lỏng phản ứng trong khoảng hơn 1 giờ. Phản ứng được tiến hành trong 1 giờ ở nhiệt độ của bể đá và sau đó được làm ấm đến nhiệt độ phòng để phản ứng trong 18 giờ. Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung nước. Pha nước đã phân lập được chiết ba lần, mỗi lần bằng 200 ml diclometan. Tất cả các pha hữu cơ được kết hợp và được rửa một lần bằng 200 ml nước muối bão hòa. Dung môi được làm bay hơi đến khô, và phần cặn được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel pha thường, 200-300 mesh. Cột được đóng gói bằng ete dầu mỏ và được rửa giải gradien bằng ete dầu mỏ:etyl axetat = 1:1-1:4. Nước giải hấp được gom, dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và phần cặn được sấy bọt bằng bơm dầu chân không để tạo ra tổng cộng 14,00 g sản phẩm tinh khiết VP-U-4. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,96 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,64 (dtd, J = 5,1, 4,0, 2,2 Hz, 4H), 7,41 – 7,30 (m, 6H), 6,82 – 6,71 (m, 2H), 5,90 (ddd, J = 25,9, 15,0, 1,0 Hz, 1H), 5,73 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 4,36 – 4,21 (m, 3H), 4,18 (t, J = 4,9 Hz, 1H), 4,05 (ddq, J = 9,7, 8,5, 6,9 Hz, 2H), 3,87 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 3,39 (s, 3H), 1,32 (td, J = 6,9, 0,7 Hz, 6H), 1,05 (s, 8H). MS m/z: C31H42N2O8PSi, [M+H]+, tính được: 629,24, đo được: 629,51.

(14-3) tổng hợp VP-U-5:

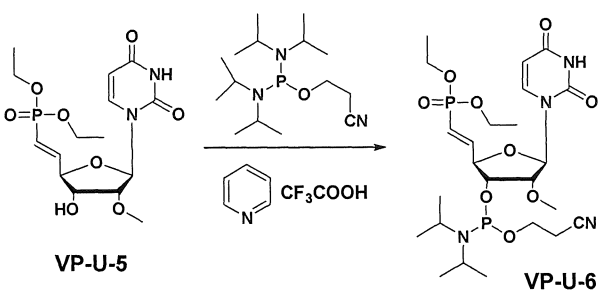


VP-U-4 VP-U-5

VP-U-4 (14,00 g, 22,29 mmol) được hòa tan trong 100 ml tetrahydrofuran, được bổ sung trietylamin trihydroflorua (17,96 g, 111,45 mmol), và được khuấy ở nhiệt độ

phòng trong 20 giờ để phản ứng hoàn toàn. Sản phẩm thô thu được bằng cách làm bay hơi trực tiếp dung môi đến khô sau đó là phân hủy trong diclometan và bay hơi đến khô hai lần bằng 50 ml diclometan. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel pha thường, 200-300 mesh. Cột được đóng gói với ete dầu mỏ và được rửa giải gradien bằng ete dầu mỏ:etyl axetat:diclometan:metanol = 1:1:1:0,05-1:1:1:0,25. Nước giải hấp được gom, dung môi được làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm, và phần cặn được sấy bọt bằng bơm dầu chân không để tạo ra tổng cộng 6,70 g sản phẩm tinh khiết VP-U-5. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7,96 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,77 (dd, J = 15,0, 6,2 Hz, 1H), 5,99 – 5,82 (m, 2H), 5,73 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 5,27 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 5,10 (dd, J = 5,3, 4,7 Hz, 1H), 4,29 (ddq, J = 9,8, 8,6, 7,0 Hz, 2H), 4,17 (ddd, J = 6,2, 5,2, 1,0 Hz, 1H), 4,12 – 3,98 (m, 3H), 3,39 (s, 2H), 1,32 (td, J = 6,9, 0,6 Hz, 6H). MS m/z: C15H24N2O8P, [M+H]+, tính được: 391,13, đo được: 391,38.

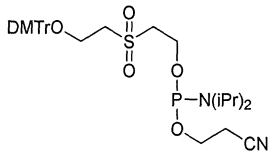
(14-4) tổng hợp VP-U-6:



VP-U-5 (391 mg, 1,0 mmol), pyridin trifloaxetat (0,232 g, 1,2 mmol), N-metylimidazol (0,099 g, 1,2 mmol), và 2-xyanoetyl N,N,N',N'-tetraisopropylphosphorodiamidit (0,452 g, 1,5 mmol) được bổ sung vào 10 ml diclometan khan trong môi trường argon để phản ứng trong 5 giờ trong khi khuấy ở nhiệt độ phòng. Dung môi được làm bay hơi đến khô, và sau đó phần cặn được tinh chế bằng sắc ký cột (silicagel pha thường 200-300 mesh, với gradien rửa giải của diclometan:axetonitril (chứa trietylamin 0,5% khối lượng) = 3:1-1:3). Nước giải hấp được gom và được cô để loại bỏ dung môi để tạo ra tổng cộng 508 mg sản phẩm đích VP-U-6. 31P NMR (161 MHz, DMSO-d6) δ 150,34, 150,29, 17,07, 15,50. MS m/z: C24H41N4O9P2, [M+H]+, tính được: 591,23, đo được: 591,55. Điều này chỉ rằng VP-U-6 là sản phẩm đích VP-Um, liên quan đến quá trình tổng hợp sợi ARN làm monome nucleosit.

Cải biến 5'-phosphat este được liên kết với đầu tận 5' bằng cách sử dụng phương pháp sau đây:

Để làm nguyên liệu ban đầu, monome cấu trúc phosphoryl hóa với cấu trúc sau đây có công thức CPR-I (mua bởi Suzhou GenePharma Inc. as Cat#13-2601-XX) được sử dụng:



(CPR-I)

Sau khi tất cả các nucleosit của sợi đối nghĩa được liên kết, monome có công thức (CPR-I) được liên kết với đầu tận 5' của sợi đối nghĩa bằng phản ứng bốn bước là giải bảo vệ, ghép đôi, phủ, và oxy hóa theo phương pháp tổng hợp phosphoramidit pha rắn của axit nucleic, sau đó cắt giảm và giải bảo vệ theo điều kiện sau đây, vì vậy thu được sợi đối nghĩa:

Trình tự nucleotit đã tổng hợp liên kết với giá đỡ được bổ sung vào amoniac nước 25% khối lượng để phản ứng trong 16 giờ ở 55°C, và amoniac nước ở lượng 0,5 ml/μmol đối với trình tự nucleotit. Chất lỏng được loại bỏ, và phần cặn được cô trong chân không đến khô. Sau khi xử lý bằng amoniac nước, sản phẩm được hòa tan trong N-metylpyrolidon ở lượng 0,4 ml/μmol, sau đó là bổ sung 0,3 ml/μmol trietylamin và 0,6 ml/μmol trietylamin trihydroflorua, đối với lượng của axit nucleic sợi đơn, nhờ đó loại bỏ sự bảo vệ 2'-TBDMS trên riboza. Tinh chế và khử muối: việc tinh chế axit nucleic đạt được bằng cách sử dụng cột sắc ký ion điều chế (Source 15Q) với sự rửa giải gradien của NaCl. Cụ thể là, dung môi rửa giải A:natri phosphat 20 mM (độ pH 8,1), dung môi:nước/axetonitril = 9:1 (thể tích/thể tích); dung môi rửa giải B:natri clorua 1,5 M, natri phosphat 20 mM (độ pH 8,1), dung môi:nước/axetonitril = 9:1 (thể tích/thể tích); gradien rửa giải: tỷ lệ của dung môi rửa giải A: dung môi rửa giải B = 100:0-50:50. Nước giải hấp được gom, kết hợp và khử muối bằng cách sử dụng cột sắc ký pha ngược. Điều kiện riêng bao gồm cột Sephadex được sử dụng để khử muối, với Sephadex-G25 làm chất độn và nước khử ion để rửa giải.

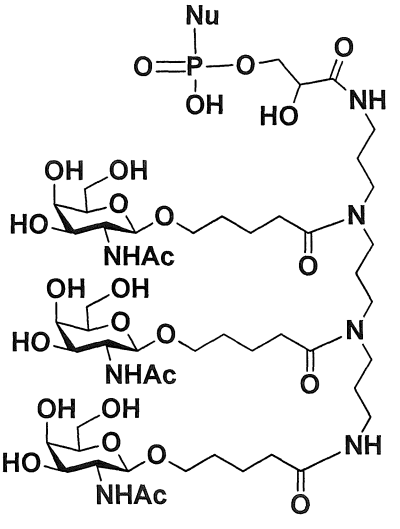
Trong trường hợp trong đó sản phẩm đích có cải biến 5'-phosphorothioat, quy trình giống như trên được sử dụng, ngoại trừ điều kiện phản ứng oxy hóa trên được thay thế bằng điều kiện phản ứng sulfua hóa trong liên kết, nhờ đó thực hiện phản ứng sulfua hóa.

Với sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa được tổng hợp ở trên, độ tinh khiết được xác định bằng sắc ký trao đổi ion (IEX-HPLC), và phân tử lượng được phân tích bằng LC-MS, và được xác nhận rằng trình tự axit nucleic đã tổng hợp tương ứng với siARN tương ứng trong các ví dụ và ví dụ so sánh ở bảng 5.

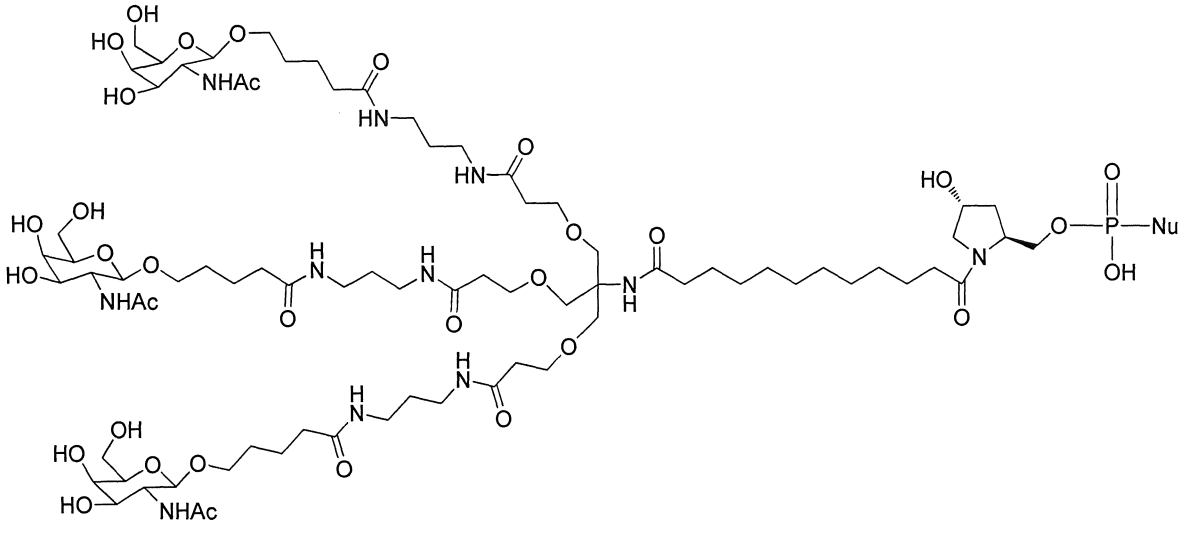
Ví dụ điều chế 15 Điều chế phần còn lại của thể tiếp hợp ở bảng 3A-3G

Mặt khác, mong đợi là phần còn lại của thể tiếp hợp ở bảng 3A-3G có thể được điều chế bằng cách sử dụng cùng phương pháp như trong ví dụ điều chế 13, ngoại trừ: 1) Như với các thể tiếp hợp 31-37, 52-58, 68-74, 84-90, 121-127 và 146-152, các thể tiếp hợp so sánh 4-5, 7-8 và 10-13, phân tử tiếp hợp L-9 được thay thế bằng phân tử tiếp hợp 2-8 hoặc 12 và phân tử tiếp hợp so sánh 1-2 thu được từ các ví dụ 2-10 hoặc 12 (ví dụ, khi phân tử tiếp hợp L-9 được thay thế bằng phân tử tiếp hợp P-9 (phân tử tiếp hợp 2) dự đoán rằng có thể thu được các thể tiếp hợp 31, 52, 68, 84, 121 và 146 được đánh số với thể tiếp hợp P10. Khi phân tử tiếp hợp L-9 được thay thế bằng phân tử tiếp hợp R-4 (phân tử tiếp hợp 3), dự đoán rằng có thể thu được các thể tiếp hợp 32, 53, 69, 85, 122 và 147 được đánh số với thể tiếp hợp R5, và v.v.; 2) siARN được tiếp hợp có trình tự được thể hiện ở bảng 3A-3G tương ứng với các thể tiếp hợp 10-15, 19-23, 27-41, 44-61, 63-77, 79-104, 106-108, 110, 112-114, 116-141 và 143-152, và các thể tiếp hợp so sánh 4-5, 7-8 và 10-17; 3) khi liên kết phosphorothioat tồn tại giữa hai nucleotit trong trình tự đích, bước phản ứng sulfua hóa được mô tả trong ví dụ điều chế 13 được sử dụng để thay thế bước phản ứng oxy hóa trong quy trình liên kết sau đó của hai nucleotit; và 4) khi vị trí 2' của tất cả các nucleotit trong trình tự đích đều là nhóm hydroxyl được cải biến, thì bước loại bỏ sự bảo vệ 2'-TBDMS trên riboza không được bao gồm trong các điều kiện phân cắt và giải bảo vệ. Do đó, dự đoán rằng có thể thu được các thể tiếp hợp 10-15, 19-23, 27-41, 44-61, 63-77, 79-104, 106-108, 110, 112-114, 116-141 và 143-152, và các thể tiếp hợp so sánh 4-5, 7-8 và 10-17, và các thể tiếp hợp này được đánh số riêng theo bảng 3A-3G. Thể tiếp hợp theo sáng chế được thể hiện bằng các công thức

(3), (4), (7), (12), (13), (14), (15), (21), và (22) một cách tương ứng, và thể tiếp hợp so sánh được thể hiện bằng các công thức (901) và (902) một cách tương ứng:



Công thức (901)



Công thức (902)

trong đó, Nu là siARN ở các thể tiếp hợp so sánh 4-5, 7-8 và 10-13.

Ví dụ điều chế 16 Tổng hợp thể tiếp hợp so sánh 6 và 9

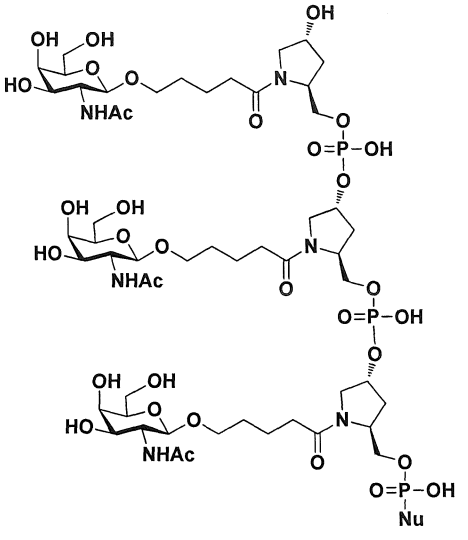
Các thể tiếp hợp so sánh 6 và 9 được tổng hợp bằng cách sử dụng FIN-2 thu được ở bước (11-3) trên. Điều kiện để tổng hợp pha rắn ARN và giải bảo vệ giống như tổng hợp pha rắn của axit nucleic được mô tả ở bước (11-2) nêu trên. Sự khác nhau duy nhất là FIN_FIN_FIN đầu tiên được tiếp hợp với đầu tận 3' của sợi có nghĩa của ARN qua

ba chu kỳ phản ứng của FIN-2, sau đó là tổng hợp pha rắn bằng cách sử dụng giá đỡ pha rắn đa năng (UnyLinker™ loaded NittoPhase®HL Solid Supports).

Việc nối nhóm tiếp hợp FIN_FIN_FIN được tiến hành theo phương pháp được mô tả trong tài liệu Rajeev et al., Chem Bio Chem 2015, 16, 903-908. Cụ thể là, đầu tiên nhóm bảo vệ hydroxy được loại bỏ khỏi giá đỡ pha rắn đa năng nêu trên, và sau đó giá đỡ pha rắn được cho tiếp xúc và ghép đôi với phân tử tiếp hợp FIN-2 trong điều kiện ghép đôi và chất ghép đôi, và phân tử tiếp hợp FIN đã nối với giá đỡ pha rắn thu được sau phản ứng phủ và oxy hóa. Ngoài ra, nhóm bảo vệ hydroxy DMTr được loại bỏ khỏi phân tử tiếp hợp FIN đã nối với giá đỡ pha rắn, và giá đỡ pha rắn này còn tiếp xúc và ghép đôi với một phân tử tiếp hợp FIN-2 khác, sau đó là phản ứng phủ và oxy hóa. Sau một chu kỳ giải bảo vệ-ghép đôi-phủ-oxy hóa khác nữa, phân tử tiếp hợp FIN-2 thứ ba được nối, và vì thế thu được nhóm tiếp hợp (FIN_FIN_FIN) được nối với giá đỡ pha rắn. Sau đó, bắt đầu với nhóm tiếp hợp được nối với giá đỡ pha rắn, các monome nucleotit do đó được kết nối, và cuối cùng thu được sợi có nghĩa ARN với nhóm tiếp hợp (FIN_FIN_FIN) được tiếp hợp với đầu 3'.

Trong phản ứng ở trên, điều kiện, dung môi và chất của quy trình giải bảo vệ, ghép đôi, phủ, và oxy hóa là theo quy trình tổng hợp pha rắn ARN được mô tả ở bước (11-2).

Tiếp theo, bước phân cắt và giải bảo vệ, tinh chế và khử muối, phát hiện, và ủ được thực hiện bằng phương pháp giống như trong ví dụ điều chế 12 để cuối cùng thu được thể tiếp hợp so sánh 6 và 9 (sau đây đôi khi cũng được gọi đơn giản là thể tiếp hợp FIN). Phân tử lượng được đo bằng LC-MS (mua từ Waters Corp., mô hình: LCT Premier). Được xác nhận rằng thể tiếp hợp FIN-siHBa1M1SP được tổng hợp là hợp chất được thiết kế nhắm đích, vì giá trị đo được tương quan với giá trị lý thuyết. Cấu trúc của nó là như được thể hiện bằng công thức (903):



Công thức (903)

trong đó, Nu là siARN ở thể tiếp hợp so sánh 6 hoặc 9.

Sau khi điều chế thể tiếp hợp ở trên, chúng được làm đông khô thành bột rắn qua quy trình tiêu chuẩn và được lưu trữ cho đến khi sử dụng. Khi được yêu cầu, chúng có thể được phân giải bằng kiểu như nước dùng cho tiêm hoặc nước muối bình thường thành dung dịch ở nồng độ mong muốn.

Ví dụ thử nghiệm 1 - Thử nghiệm này minh họa độc tính của thể tiếp hợp siARN theo sáng chế.

Trong chuột nhắt C57BL/6J, thể tiếp hợp 24 được dùng dưới da cho mỗi con chuột, một cách tương ứng, với liều đơn 100 mg/kg hoặc 200 mg/kg (bởi siARN, ở dạng dung dịch nước NaCl 0,9% khối lượng, mỗi 10 mL/kg được sử dụng ở nồng độ 10 mg/mL hoặc 20 mg/mL). Trong thời gian sử dụng để quan sát liên tục, không xảy ra hiện tượng động vật chết, không quan sát thấy có triệu chứng lâm sàng liên quan đến đáp ứng thuốc bất lợi, và không phát hiện ra bất thường trong xét nghiệm bệnh lý lâm sàng hoặc giải phẫu tổng thể, cả hai đều được tiến hành tại 24 giờ sau khi sử dụng. Vì vậy, kết quả trên chỉ ra độc tính tương đối thấp của thể tiếp hợp theo sáng chế ở cấp độ động vật.

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

Ví dụ thử nghiệm 2-1 Độ ổn định ở dịch tiêu lysosom *in vitro*.

Thể tiếp hợp 24, 25, 42, 43, 62, 78, và trình tự so sánh 1 (mỗi loại này được cung cấp ở dạng dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng ở 20 µM đối với siARN, 12 µl đối với mỗi nhóm, một cách tương ứng) được trộn kỹ riêng rẽ với 27,2 µL dung dịch natri xitrat nước (độ pH 5,0), 4,08 µL nước khử ion và 2,72 µL Tritosom chuột cống (mua từ Xenotech Inc., Cat. R0610LT, số 1610069, ở nồng độ cuối là 0,2 mU/µL), và ủ ở nhiệt độ không đổi là 37°C. 5 µL mẫu được lấy tại mỗi thời điểm là 0 giờ, 5 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, và 8 giờ một cách tương ứng, mỗi mẫu được bổ sung vào 15 µL dung dịch ure nước 9 M để làm biến tính, và 4 µL chất đệm nạp (mua từ Solarbio Inc., Cat. 20160830) được bổ sung, sau đó bảo quản lạnh ngay lập tức trong tủ đông -80°C để dừng phản ứng. 0 giờ là thời điểm khi mẫu được trộn kỹ với dịch tiêu lysosom và lấy ra ngay. Đối với các mẫu không được xử lý bằng dịch tiêu lysosom, thì 1,5 µL mỗi thể tiếp hợp ở trên ở các lượng bằng nhau (20 µM) được trộn kỹ với 7,5 µL dung dịch natri xitrat nước (độ pH 5,0) và 1 µL nước khử ion, mỗi hỗn hợp này được bổ sung vào 15 µL dung dịch ure nước 9 M để làm biến tính, và 4 µL chất đệm nạp (mua từ Solarbio Inc., Cat. 20160830) được bổ sung, sau đó bảo quản lạnh ngay lập tức trong tủ đông -80°C để dừng phản ứng. Các mẫu đối chứng cho mỗi mẫu này được đánh dấu là Con trong điện di đồ. 16% khối lượng của gel polyacrylamit không biến tính được điều chế. Mỗi mẫu đã bảo quản lạnh đều được trộn với 4 µL chất đệm nạp (mua từ Solarbio Inc., dung dịch thủy sinh của EDTA 20 mM, glyxerol 36% khối lượng, và bromophenol xanh 0,06% khối lượng) và sau đó 20 µL hỗn hợp này được nạp vào gel để thực hiện điện di trong 10 phút trong 20 mA và sau đó 30 phút trong 40 mA. Sau khi kết thúc quy trình điện di, gel được nhuộm bằng thuốc nhuộm Gelred (BioTium, Cat. 13G1203) trong 10 phút sau đó chụp hình. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 1A. Trình tự so sánh 1 là như sau: sợi có nghĩa: 5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAA-3' (SEQ ID NO: 250); sợi đối nghĩa: 5'-UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU-3' (SEQ ID NO: 251).

Theo cùng một phương pháp, độ ổn định của các thể tiếp hợp 105, 109, 111 và 115 ở 6 giờ được đo, kết quả của chúng được thể hiện trên Fig. 1B.

Fig. 1A và Fig. 1B thể hiện kết quả bán định lượng của thử nghiệm độ ổn định của thể tiếp hợp siARN ở Tritosom *in vitro*. Đã chứng minh được rằng thể tiếp hợp theo

sáng chế có thể vẫn không bị thoái biến trong thời gian dài ở Tritosom, thể hiện độ ổn định tốt.

Ví dụ thử nghiệm 2-2 Độ ổn định ở huyết tương người *in vitro*.

Thể tiếp hợp 24, 25, 42, 43, 62, 78, và trình tự so sánh 1 (mỗi loại này được cung cấp ở dạng dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng ở 20 μM đối với siARN, 12 μl đối với mỗi nhóm) được trộn kỹ riêng rẽ với 108 μL huyết tương người 90% (được pha loãng trong PBS) và được ủ ở nhiệt độ không đổi là 37°C. 10 μL mẫu được lấy tại mỗi thời điểm là 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ một cách tương ứng, và cấp đông ngay lập tức trong nitơ lỏng và bảo quản lạnh trong tủ đông -80°C để sử dụng. Trong khi đó, mỗi trong số các thể tiếp hợp ở trên ở lượng mol bằng nhau (2 μM, 2μL) được trộn kỹ với 8 μL 1x PBS, vì vậy thu được 10 μL mẫu không được xử lý bằng huyết tương người (được đánh dấu là Con). 20% khối lượng của gel polyacrylamit không biến tính được điều chế. Mỗi mẫu đã bảo quản lạnh đều được trộn với 4 μL chất đệm nạp (dung dịch thủy sinh của EDTA 20 mM, glyxerol 36% khối lượng, và bromophenol xanh 0,06% khối lượng) và sau đó được nạp vào gel để thực hiện điện di trong 60 phút trong dòng điện không đổi 80 mA. Sau khi kết thúc quy trình điện di, gel được nhuộm bằng thuốc nhuộm 1x Sybr Gold (Invitrogen, Cat. 11494) trong 15 phút sau đó chụp hình. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 2A. Trình tự so sánh 1 là như sau: sợi có nghĩa: 5'-CCUUGAGGCAUACUUCAAA-3' (SEQ ID NO: 250); sợi đối nghĩa: 5'-UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUU-3' (SEQ ID NO: 251).

Theo cùng một phương pháp, độ ổn định của thể tiếp hợp 105, 109, 111 và 115 ở 72 giờ được đo, kết quả của chúng được thể hiện trên Fig. 2B.

Fig. 2A và Fig. 2B thể hiện kết quả bán định lượng của thử nghiệm độ ổn định của thể tiếp hợp siARN thử nghiệm trong huyết tương người *in vitro*. Đã chứng minh được rằng trong huyết tương người, thể tiếp hợp theo sáng chế vẫn không bị thoái biến trong lên đến 72 giờ, thể hiện độ ổn định tốt trong huyết tương người.

Ví dụ thử nghiệm 2-3 Độ ổn định ở huyết tương khỉ *in vitro*.

Thể tiếp hợp 24, 25, 42, 43, 62, 78, và trình tự so sánh 2 (mỗi loại này được cung cấp ở dạng dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng ở 20 μM một cách tương ứng đối với

siARN, 12 µl đối với mỗi nhóm, trong đó trình tự so sánh 2 là siARN với sợi có nghĩa có trình tự được thể hiện bởi SEQ ID NO: 80 và sợi đối nghĩa có trình tự được thể hiện bởi SEQ ID NO: 81, trong khi không được tiếp hợp với phân tử tiếp hợp bất kỳ) được trộn kỹ riêng rẽ với 108 µL huyết tương khỉ đuôi dài 90% (huyết tương khỉ, mua từ HONGQUAN Bio, Cat. HQ70082, được pha loãng trong PBS) và được ủ ở nhiệt độ không đổi là 37°C. 10 µL mẫu được lấy tại mỗi thời điểm là 0 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ một cách tương ứng, và cấp đông ngay lập tức trong nitơ lỏng và bảo quản lạnh trong tủ đông -80°C. Sau khi lấy mẫu tại mỗi thời điểm, mỗi mẫu được pha loãng 5 lần bằng 1×PBS (độ pH 7,4) và sau đó được lấy với thể tích 10 µL để sử dụng. Trong khi đó, mỗi thể tiếp hợp ở trên ở lượng mol bằng nhau (2 µM, 2µL) được trộn kỹ với 8 µL 1x PBS, vì vậy thu được 10 µL mẫu không được xử lý bằng huyết tương khỉ (được đánh dấu là Con). 20% khối lượng của gel polyacrylamit không biến tính được điều chế. Mỗi mẫu đã pha loãng đều được trộn với 4 µL chất đệm nạp (dung dịch thủy sinh của EDTA 20 mM, glyxerol 36% khối lượng, và bromophenol xanh 0,06% khối lượng) và sau đó được nạp vào gel để thực hiện điện di trong 60 phút trong dòng điện không đổi 80 mA. Sau khi kết thúc việc điện di, gel được nhuộm bằng thuốc nhuộm 1x Sybr Gold (Invitrogen, Cat. 11494) trong 15 phút sau đó chụp hình. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 3A.

Độ ổn định của thể tiếp hợp 105, 109, 111 và 115 ở 72 giờ được đo theo cùng một phương pháp, kết quả của chúng được thể hiện trên Fig. 3B.

Fig. 3A và Fig. 3B thể hiện kết quả bán định lượng của thử nghiệm độ ổn định của thể tiếp hợp siARN được thử nghiệm ở huyết tương khỉ *in vitro*. Đã chứng minh được rằng ở huyết tương khỉ đuôi dài, thể tiếp hợp theo sáng chế vẫn không bị thoái biến trong lên đến 72 giờ, thể hiện độ ổn định tốt ở huyết tương khỉ.

Ví dụ thử nghiệm 3 Thử nghiệm này minh họa dược động học của thể tiếp hợp 24 và 25 ở chuột cống *in vivo*

Trong ví dụ thử nghiệm này, thể tiếp hợp 24 và 25 được dùng cho chuột cống ở mỗi nhóm thử nghiệm (10 con mỗi nhóm, một nửa là cái và một nửa là đực) bằng cách tiêm dưới da, một cách tương ứng, với liều đơn 10 mg/kg và 50 mg/kg. Tiếp theo, nồng độ thuốc ở huyết tương, mô gan và mô thận của chuột cống được đo ở mỗi thời điểm.

Đầu tiên, chuột cống SD được chia ngẫu nhiên thành các nhóm theo trọng lượng cơ thể và giới tính của chúng bằng cách sử dụng hệ thống dữ liệu PRISTIMA 7.2.0, sau đó lần lượt sử dụng các thể tiếp hợp theo liều lượng được thiết kế. Liều lượng thuốc cho tất cả các con vật được tính theo trọng lượng cơ thể. Một liều đơn được sử dụng dưới da, với liều 10 mg/kg và 50 mg/kg lần lượt ở dạng 1mg/ml và 5 mg/ml dung dịch NaCl nước 0,9% và thể tích là 10 ml/kg. Máu toàn phần của chuột cống được gom từ tĩnh mạch cổ trước khi sử dụng và ở 5 phút (±30 giây), 30 phút (±1 phút), 1 giờ (±2 phút), 2 giờ (±2 phút), 6 giờ (±5 phút), 24 giờ (±10 phút), 48 giờ (±20 phút), 72 giờ (±20 phút), 120 giờ (±30 phút), và 168 giờ (±30 phút) sau khi sử dụng. Sau đó, các mẫu máu toàn phần này được ly tâm ở 2-8°C trong 1800 x g trong 10 phút để tách huyết tương. Khoảng 70 µL thể tích mẫu huyết tương được đặt trong một ống, và phần còn lại của cùng mẫu đó được đặt trong một ống khác, cả hai đều được bảo quản lạnh ở nhiệt độ từ -70°C đến -86°C để kiểm tra. Mô gan và thận của chuột cống được gom ở khoảng 24, 48, 72, 120, và 168 giờ sau khi sử dụng bằng phương pháp bao gồm bước gây mê chuột cống bằng pentobarbital natri theo cân nặng của chúng (60 mg/kg bằng cách tiêm nội khí quản), trợ tử chuột cống bằng cách gom máu từ động mạch chủ bụng, và thực hiện giải phẫu tổng thể. Gan và thận của mỗi con chuột cống được lấy mẫu và lưu trữ trong ống cryo 1 mL ở nhiệt độ dưới -68°C cho đến khi đo và phân tích.

Nồng độ của thể tiếp hợp của thể tiếp hợp 24 và 25 trong huyết tương, mô gan và thận của chuột cống được đo định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao có dò huỳnh quang (HPLC-FLD) theo các bước sau đây:

(1) mài mô cho đến khi thu được khối lượng mô không lớn hơn 80 mg, sau đó bổ sung dung dịch ly giải mô và tế bào (nhà cung cấp: Epicentre, Cat. MTC096H) để tạo ra thể đồng nhất mô là 66,7 mg/mL;

(2) cho thể đồng nhất mô này vào nghiền bằng sóng âm (150 W, 30 s) để phá vỡ tế bào;

(3) đối với mỗi nhóm mẫu mô, bổ sung 75 µL mẫu mô vào đĩa PCR 96 lỗ, bổ sung 5 µL proteinaza K (nhà cung cấp: Invitrogen, Cat. 25530-015) và 10 µL dung dịch hỗn hợp nước của axetonitril 10% khối lượng và Tween 20 0,01% khối lượng;

đối với mỗi nhóm mẫu huyết tương, bổ sung 20 µL huyết tương vào đĩa PCR 96 lỗ, bổ sung 45 µL dung dịch ly giải mô và tế bào, 5 µL proteinaza K, và 20 µL hỗn hợp lỏng của axetonitril 10% khối lượng và Tween 20 0,01% khối lượng;

(4) đóng các đĩa này và đặt chúng vào dụng cụ PCR (nhà cung cấp: Applied Biosystems, mẫu: GeneAmp® PCR hệ thống 9700) và ủ ở 65°C trong 45 phút;

(5) sau khi hoàn tất việc ủ, bổ sung 10 µl dung dịch KCl nước 3 M (nhà cung cấp: Sigma-aldrich, Cat. 60135-250ML), lắc kỹ, và ly tâm ở 3200 rcf ở 4°C trong 15 phút;

(6) đối với mỗi nhóm mẫu mô, bổ sung 80 µL phần dịch nổi trên bề mặt vào 120 µL hỗn hợp lai (công thức: 0,5 ml đầu dò PNA 6 µM (nhà cung cấp: TAHE-PNA), 1 ml Trizma 200 mM/độ pH = 8, 5 ml dung dịch ure nước 8 M, 3,5 ml H_2O, 2 ml axetonitril);

đối với mỗi nhóm mẫu huyết tương, bổ sung 40 µL phần dịch nổi trên bề mặt vào 160 µL hỗn hợp lai (công thức: 0,5 ml đầu dò PNA 6 µM, 1 ml Trizma 200 mM/độ pH = 8, 5 ml dung dịch ure nước 8 M, 7,5 ml H_2O, 2 ml axetonitril);

(7) đóng các đĩa lại và đặt chúng trong thiết bị PCR, ủ ở 95°C trong 15 phút, sau đó ngay lập tức đặt trên đá trong 5 phút;

(8) chuyển các mẫu này đến đĩa 96 lỗ mới có đáy dạng nón, lắc kỹ, và ly tâm ở 3200 rcf trong 1 phút;

(9) bơm các mẫu này để đo và phân tích định lượng bằng cách sử dụng HPLC-FLD (nhà cung cấp hệ thống pha lỏng: Thermo Fisher, mẫu sắc ký: ultimate 3000).

Các kết quả phân tích có thể được tìm thấy trên Fig. 4-Fig. 11. Fig. 4-Fig. 7 thể hiện profin chuyển hóa theo thời gian của nồng độ PK/TK trong huyết tương ở huyết tương chuột cống và nồng độ PK/TK trong mô ở gan và thận chuột cống đối với thể tiếp hợp 24, một cách tương ứng; Fig. 8-Fig. 11 thể hiện profin chuyển hóa theo thời gian của nồng độ PK/TK trong huyết tương ở huyết tương chuột cống và nồng độ PK/TK trong mô ở gan và thận chuột cống đối với thể tiếp hợp 25, một cách tương ứng. Cụ thể là,

Fig. 4 là profin chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ PK/TK trong huyết tương đối với thể tiếp hợp 24 ở huyết tương chuột cống với liều 10 mg/kg.

Fig. 5 là profin chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ PK/TK trong mô đối với thể tiếp hợp 24 ở gan và thận chuột cống với liều 10 mg/kg.

Fig. 6 là profin chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ PK/TK trong huyết tương đối với thể tiếp hợp 24 ở huyết tương chuột cống với liều 50 mg/kg.

Fig. 7 là profin chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ PK/TK trong mô đối với thể tiếp hợp 24 ở gan và thận chuột cống với liều 50 mg/kg.

Fig. 8 là profin chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ PK/TK trong huyết tương đối với thể tiếp hợp 25 ở huyết tương chuột cống với liều 10 mg/kg.

Fig. 9 là profin chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ PK/TK trong mô đối với thể tiếp hợp 25 ở gan và thận chuột cống với liều 10 mg/kg.

Fig. 10 là profin chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ PK/TK trong huyết tương đối với thể tiếp hợp 25 ở huyết tương chuột cống với liều 50 mg/kg.

Fig. 11 là profin chuyển hóa theo thời gian thể hiện nồng độ PK/TK trong mô đối với thể tiếp hợp 25 ở gan và thận chuột cống với liều 50 mg/kg.

Như có thể thấy từ kết quả trên Fig. 4-Fig. 11, nồng độ đối với thể tiếp hợp 24 và 25 ở huyết tương chuột cống được giảm nhanh dưới giới hạn phát hiện trong vòng vài giờ, trong khi nồng độ ở mức tương đối ổn định được duy trì trên ít nhất 168 giờ trong mô gan chuột cống, ở liều lượng thấp (10 mg/kg) hoặc ở liều lượng tương đối cao (50 mg/kg). Điều này cho thấy rằng thể tiếp hợp siARN thu được bằng cách tiếp hợp phân tử tiếp hợp L-9 có thể được làm giàu một cách đặc hiệu và đáng kể trong gan và vẫn ổn định, thể hiện mức độ nhắm đích cao.

Ví dụ thử nghiệm 4 Thử nghiệm này chứng minh tác dụng ức chế đến mARN đích do thể tiếp hợp tạo ra từ các phân tử tiếp hợp khác nhau gây ra ở chuột nhắt C57BL/6J

Đầu tiên, chuột nhắt C57BL/6J (đều là cái) được chia ngẫu nhiên thành các nhóm. Các nhóm thử nghiệm được đánh số với thể tiếp hợp 158 (5 con chuột nhắt), thể tiếp hợp so sánh 14 (5 con chuột nhắt), và nhóm đối chứng PBS (8 con chuột nhắt), một cách tương ứng. Tất cả các động vật đều được định liều theo trọng lượng cơ thể, và được cho dùng dưới da ở các liều đơn khác nhau là 1 mg/kg hoặc 0,1 mg/kg. Thể tích định liều là

5 ml/kg. Đối với các liều khác nhau, thể tiếp hợp được hòa tan trong dung dịch nước 0,9% của natri clorua ở nồng độ 0,2 mg/mL và 0,02 mg/mL. Các con vật này được làm chết 72 giờ sau khi sử dụng, và gan được gom; mô gan được đồng nhất bằng máy đồng hóa mô, và ARN tổng được chiết bằng RNAVzol (VIGOROUS, lot: 161G) theo quy trình tiêu chuẩn để chiết ARN tổng.

Mức biểu hiện của TTR mARN ở mô gan được phát hiện bởi PCR định lượng dựa trên huỳnh quang thời gian thực. Cụ thể là, tổng ARN được chiết được phiên mã ngược thành cADN sử dụng hệ thống phiên mã ngược (Promega, Lot#0000223677, REF: A3500) theo hướng dẫn. Thiết bị PCR huỳnh quanh định lượng (ABI step One) sau đó được sử dụng để phát hiện hiệu quả ức chế của siARN đến sự biểu hiện mTTR mARN ở mô gan. Theo phương pháp phát hiện này, gen GAPDH được sử dụng làm gen nội tham chiếu, và sự biểu hiện mTTR và GAPDH được phát hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi cho TTR và đoạn mồi cho GAPDH, một cách tương ứng.

Trình tự của đoạn mồi phát hiện được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4 Trình tự của đoạn mồi phát hiện

Gen	Đoạn mồi nghịch	Đoạn mồi thuận
mTTR	5'- CCGTCTGTGCCTTCTCATCT -3' (SEQ ID NO: 187)	5'- TAATCTCCTCCCCCAACTCC -3' (SEQ ID NO: 188)
GAPDH	5'- AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3' (SEQ ID NO: 189)	5'- AGGGGCCATCCACAGTCTTC -3' (SEQ ID NO: 190)

Theo phương pháp PCR thời gian thực này, sự biểu hiện của mTTR mARN được biểu hiện bằng phần trăm lượng biểu hiện gen TTR còn lại, và được tính như sau:

Lượng biểu hiện gen TTR còn lại = (số bản sao của gen TTR ở nhóm thử nghiệm/số bản sao của GAPDH ở nhóm thử nghiệm)/(số bản sao của gen TTR ở nhóm đối chứng/số bản sao GAPDH ở nhóm đối chứng) × 100%

Tỷ lệ ức chế mARN của thể tiếp hợp sau đó được tính theo công thức sau đây:

Tỷ lệ ức chế mARN = (1- lượng biểu hiện gen TTR còn lại) × 100%,

Trong đó, nhóm đối chứng là chuột nhắt mà PBS được sử dụng trong thử nghiệm, và mỗi nhóm thử nghiệm là nhóm chuột nhắt sử dụng các thể tiếp hợp siARN khác nhau. Các kết quả được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5 Hiệu quả ức chế của mTTR mARN ở chuột nhắt

Thể tiếp hợp siARN	Số thứ tự mẫu	Tỷ lệ ức chế mARN (%)	
		1mg/kg	0,1mg/kg
Thể tiếp hợp 158	L10-simTTR	94	51
Thể tiếp hợp so sánh 14	K4--simTTR	74	18

Kết quả này chứng minh rằng, dù với cùng trình tự siARN và cải biến, thì tỷ lệ ức chế mARN đích của thể tiếp hợp 158 cao hơn đáng kể so với tỷ lệ đó của thể tiếp hợp so sánh 14.

Trong ví dụ thử nghiệm 5 đến ví dụ thử nghiệm 11 sau đây, đặc tính và hiệu quả của thể tiếp hợp siARN ở bảng 3A đến 3F được kiểm tra bằng thử nghiệm theo vị trí đích của siARN và sự tương quan trình tự.

Ví dụ thử nghiệm 5 - Thử nghiệm để xác minh hiệu quả của thể tiếp hợp siARN ở bảng 3A

Ví dụ thử nghiệm 5-1 - Thử nghiệm để xác minh tác dụng ngoài đích của thể tiếp hợp 26

Theo phương pháp được mô tả trong tài liệu Kumico Ui-Tei et. al., Functional dissection of siARN sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect. Nucleic Acids Research, 2008.36(7), 2136-2151, plasmit dùng cho quy trình phát hiện được xây dựng cấu trúc và đồng chuyển nhiễm với thể tiếp hợp

siARN cần được phát hiện vào tế bào HEK293A; và mức biểu hiện của gen báo cáo luciferaza kép được đo bằng cách sử dụng kit phát hiện gen báo cáo luciferaza kép. Các bước cụ thể là như sau:

Cấu trúc của plasmit dùng cho quy trình phát hiện

Bốn plasmit tái tổ hợp được xây dựng cấu trúc bằng cách sử dụng plasmit psiCHECK™-2 (Promega™), trong đó GSCM được biểu hiện là plasmit trúng đích; và PSCM, GSSM, và PSSM được biểu hiện là plasmit ngoài đích:

(1) GSCM, chứa trình tự đích, trình tự đích này được cắt bổ sung hoàn toàn với tất cả 21 trình tự nucleotit của sợi đối nghĩa ở thể tiếp hợp cần được phát hiện.

(2) PSCM, chứa trình tự đích, trình tự đích này được cắt bổ sung hoàn toàn với tất cả 21 trình tự nucleotit của sợi có nghĩa ở thể tiếp hợp cần được phát hiện.

(3) GSSM, chứa trình tự đích, trình tự đích này được cắt bổ sung hoàn toàn với trình tự nucleotit ở vị trí 1-8 từ đầu 5' của sợi đối nghĩa ở thể tiếp hợp cần được phát hiện. Trình tự nucleotit ở vị trí 9-21 từ đầu 5' của sợi đối nghĩa ở thể tiếp hợp cần được phát hiện không hợp đôi bổ sung với trình tự đích tương ứng của nó. Quy tắc không hợp đôi là: nucleotit G, C, A hoặc U ở vị trí bất kỳ giữa 9 và 21 từ đầu 5' của sợi đối nghĩa ở thể tiếp hợp cần được phát hiện không hợp đôi một cách tương ứng với nucleotit T, A, C hoặc G, ở vị trí tương ứng của trình tự đích.

(4) PSSM, chứa trình tự đích, trình tự đích này được cắt bổ sung với trình tự nucleotit ở vị trí 1-8 từ đầu 5' của sợi có nghĩa ở thể tiếp hợp cần được phát hiện. Trình tự nucleotit ở vị trí 9-21 từ đầu 5' của sợi đối nghĩa ở thể tiếp hợp cần được phát hiện không hợp đôi bổ sung với trình tự đích tương ứng của nó. Quy tắc không hợp đôi là: nucleotit G, C, A hoặc U ở vị trí bất kỳ giữa 9 và 21 từ đầu 5' của sợi có nghĩa ở thể tiếp hợp cần được phát hiện không hợp đôi một cách tương ứng với nucleotit T, A, C hoặc G, ở vị trí tương ứng của trình tự đích.

Trình tự đích được xen vào vị trí Xho I/Not I của plasmit psiCHECK™-2.

Chuyển nhiễm

Trong đĩa 96 lỗ, siARN và mỗi trong các plasmit ở trên được đồng chuyển nhiễm theo hướng dẫn của LipofectamineTM 2000 (Invitrogen), mỗi plasmit có 11 nhóm siARN tương ứng ở một số nồng độ nhất định, một cách tương ứng. Cụ thể là, 10 ng plasmit được chuyển nhiễm trong mỗi lỗ; và nồng độ cuối cùng của siARN được đồng chuyển nhiễm trong mỗi lỗ nằm trong khoảng từ 100 nM đến 0,0001 nM (pha loãng theo dãy 4 lần), 3 lỗ lặp lại trong mỗi nhóm, sử dụng 0,2 μL LipofectamineTM 2000 trong mỗi lỗ.

Phát hiện

24 giờ sau khi đồng chuyển nhiễm, các tế bào HEK293A được phân giải bằng cách sử dụng kit xét nghiệm gen báo cáo luxiferaza kép (Promega, cat. E2940) theo hướng dẫn sử dụng để phát hiện mức biểu hiện của gen báo cáo luxiferaza kép. Đối với mỗi nhóm thử nghiệm của một số nồng độ nhất định, nhóm không được điều trị bằng thể tiếp hợp được sử dụng làm đối chứng (con). Mức Renilla luxiferaza protein (Ren) được chuẩn hóa thành mức firefly luxiferaza protein (Fir). Các đường cong đáp ứng liều được vẽ biểu đồ bởi kết quả hoạt tính đo được ở các nồng độ siARN khác nhau, và các đường cong này được mẫu hóa bằng cách sử dụng hàm log (chất ức chế) so với đáp ứng-Độ dốc biến thiên của phần mềm Graphpad 5.0 với công thức dưới đây:

$$Y = \text{Bot} + \frac{\text{Top-Bot}}{1 + 10^{(\text{LogIC50-X}) \times \text{HillSlope}}}$$

trong đó

Y là mức biểu hiện của mARN còn lại,

X là logarit của nồng độ của siARN được chuyển nhiễm,

Bot là giá trị Y ở đáy của đường tiệm cận,

Top là giá trị Y ở đỉnh của đường tiệm cận,

$LogIC_{50}$ là giá trị X mà ở đó Y là giá trị trung bình giữa đáy và đỉnh của đường tiệm cận, và HillSlope là độ dốc của đường cong.

IC_{50} của thể tiếp hợp cần được phát hiện tương ứng với GSCM được xác định qua phép tính dựa trên đường cong tác dụng-liều, và sau đó được so sánh với PSCM, GSSM hoặc PSSM.

Đối với thể tiếp hợp 24, kết quả được thể hiện trên Fig. 12A-Fig. 12D, và giá trị IC_{50} của thể tiếp hợp 24 tương ứng với GSCM được tính là 0,0019 nM; so với PSCM, GSSM hoặc PSSM, thể tiếp hợp 24 không thể hiện tác dụng ức chế đáng kể ở mỗi nồng độ siARN, biểu thị rằng thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có hoạt tính tương đối cao *in vitro* và tác dụng ngoài đích thấp.

Ví dụ thử nghiệm 5-2 - Thử nghiệm này minh họa hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp siARN ở bảng 3A về sự biểu hiện của HBV mARN *in vivo*.

Trong ví dụ thử nghiệm này, hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp 16 và 24 trong sự biểu hiện của HBV mARN trong chuột nhắt chuyển gen HBV C57BL/6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri/J được khảo sát.

Đầu tiên, chuột nhắt C57BL/6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri/J được chia ngẫu nhiên thành các nhóm dựa trên hàm lượng HBsAg ở huyết thanh (tất cả đều là cái, 4 con trong mỗi nhóm) và được đánh số một cách tương ứng là thể tiếp hợp 16 và thể tiếp hợp 24, và nhóm nước muối bình thường (NS) được bổ sung làm nhóm đối chứng. Liều lượng thuốc cho tất cả các động vật được tính theo trọng lượng cơ thể. Một liều đơn được sử dụng dưới da, với liều lượng 1 mg/kg, tương ứng với nồng độ thể tiếp hợp là 0,2 mg/ml và 0,02 mg/ml trong dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng và thể tích liều lượng là 5 ml/kg. Động vật được làm chết vào ngày 14 sau khi sử dụng. Gan được gom và được giữ với ARN sau đó (Sigma Aldrich), và mô gan được đồng nhất với máy đồng hóa mô. Sau đó ARN tổng được chiết và thu được bằng cách sử dụng Trizol theo quy trình tiêu chuẩn để chiết ARN tổng.

Mức biểu hiện của HBV mARN ở mô gan được đo bằng qPCR huỳnh quang thời gian thực. Cụ thể là, ARN tổng đã chiết được phiên mã ngược thành cADN bằng cách sử dụng kit phiên mã ngược ImProm-II™ (Promega) theo hướng dẫn của chúng, và sau đó hiệu quả ức chế của siARN trong việc biểu hiện của HBV mARN ở mô gan được đo bằng cách sử dụng kit qPCR huỳnh quang (Beijing Cowin Biosicences Co., Ltd). Theo

phương pháp qPCR huỳnh quang này, gen β-actin được sử dụng làm gen nội đối chứng, HBV và β-actin được phát hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi cho HBV và β-actin, một cách tương ứng.

Trình tự của đoạn mồi dùng cho quy trình phát hiện được thể hiện ở bảng 5A.

Bảng 5A Trình tự của đoạn mồi để phát hiện

Gen	Đoạn mồi nghịch	Đoạn mồi thuận
HBV	5'- CCGTCTGTGCCTTCTCATCT -3' (SEQ ID NO: 187)	5'- TAATCTCCTCCCCCAACTCC -3' (SEQ ID NO: 188)
β-actin	5'- AGCTTCTTTGCAGCTCCTTCGTTG -3' (SEQ ID NO: 191)	5'- TTCTGACCCATTCCCACCATCACA-3' (SEQ ID NO: 192)

Theo phương pháp qPCR huỳnh quang này, sự biểu hiện của HBV mARN được biểu thị dưới dạng mức biểu hiện còn lại của gen HBV và được tính bằng công thức sau đây:

Mức biểu hiện còn lại của gen HBV = (số bản sao của gen HBV ở nhóm thử nghiệm/số bản sao của gen β-actin ở nhóm thử nghiệm)/(số bản sao của gen HBV ở nhóm đối chứng/số bản sao của gen β-actin ở nhóm đối chứng) × 100%, được đánh dấu là mức biểu hiện HBV X/β-actin mARN.

Sau đó, tỷ lệ ức chế kháng mARN của thể tiếp hợp được tính theo công thức sau đây:

Tỷ lệ ức chế kháng mARN = (1- mức biểu hiện còn lại của gen HBV) × 100%,

trong đó, nhóm đối chứng là nhóm chuột nhắt đối chứng được sử dụng với NS ở thử nghiệm này và mỗi nhóm thử nghiệm là nhóm chuột nhắt được sử dụng với các thể tiếp hợp siARN khác nhau, một cách tương ứng. Kết quả được thể hiện trên Fig. 13.

Trong các thử nghiệm khác, hai thí nghiệm tiếp tục được diễn ra theo phương pháp dưới đây:

Phương pháp giống như trên được sử dụng, ngoại trừ siARN tiếp hợp được dùng để thử nghiệm được thay thế bằng các thể tiếp hợp 17, 25, 159 và 160, và dữ liệu được thu thập ở ngày 7; và

Phương pháp giống như trên được sử dụng, ngoại trừ siARN tiếp hợp được dùng để thử nghiệm được thay thế bằng các thể tiếp hợp 24, 161, 162 và 163, và dữ liệu được thu thập ở ngày 28, và mỗi thể tiếp hợp được dùng với liều lượng 1 mg/kg và 0,3 mg/kg (trong đó thể tích liều lượng vẫn như cũ, trong khi nồng độ của dung dịch tiếp hợp được điều chỉnh một cách tương ứng). Kết quả của chúng được thể hiện một cách tương ứng trên Fig. 14 và Fig. 15.

Như có thể thấy từ kết quả trên, trong một vài thử nghiệm với các thời điểm thử nghiệm khác nhau, tất cả các thể tiếp hợp ở trên theo sáng chế đều thể hiện hoạt tính ức chế cao trong việc biểu hiện của HBV mARN ở chuột nhắt *in vivo*.

Ví dụ thử nghiệm 5-3 - Thử nghiệm này minh họa hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp siARN với các phân tử tiếp hợp khác nhau ở bảng 3A trong việc biểu hiện HBsAg và HBV ADN ở huyết thanh chuột nhắt chuyển gen HBV.

Theo phương pháp của ví dụ thử nghiệm 4, ở chuột nhắt 44Bri HBV, trình tự dùng cho quy trình phát hiện trong bảng 5A được sử dụng làm đoạn mồi để xác định hiệu quả ức chế của các thể tiếp hợp 25, 164, 165 và 166 với mARN đích. Kết quả của chúng được thể hiện một cách tương ứng ở bảng 6A.

Bảng 6A Hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp siARN đến mARN đích

Thể tiếp hợp siARN	Số	Hiệu quả ức chế mARN (%)	
		1mg/kg	0,1mg/kg
Thể tiếp hợp 25	L10- siHBa1M2SP	91	40
Thể tiếp hợp 164	P10- siHBa1M2SP	92	65
Thể tiếp hợp 165	W8- siHBa1M2SP	96	74
Thể tiếp hợp 166	Z5- siHBa1M2SP	96	78

Như có thể thấy từ bảng 6A, thể tiếp hợp siARN tạo ra bởi các phân tử tiếp hợp khác nhau theo sáng chế thể hiện hiệu quả ức chế ưu việt với mARN đích ở chuột nhắt *in vivo*.

Ví dụ thử nghiệm 5-4 - Thử nghiệm này minh họa thử nghiệm phụ thuộc thời gian của hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp siARN ở bảng 3A với HBsAg và HBV ADN ở huyết thanh chuột nhắt chuyển gen HBV.

Mô hình chuột nhắt AAV-HBV được sử dụng. Sau khi thiết lập thành công mô hình động vật, các con chuột nhắt này được chia ngẫu nhiên thành các nhóm dựa trên hàm lượng HBsAg ở huyết thanh (5 con chuột nhắt mỗi nhóm). Thể tiếp hợp 24, 25 và thể tiếp hợp so sánh 15 được sử dụng một cách tương ứng cho mỗi nhóm, và NS được sử dụng làm đối chứng trống. Các liều lượng thuốc cho tất cả các động vật đều được tính theo trọng lượng cơ thể. Một liều đơn được sử dụng dưới da, với liều lượng 3 mg/kg, và được cung cấp ở 0,6 mg/ml trong dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng và thể tích 5 ml/kg. Máu được lấy từ búi tĩnh mạch mắt chuột nhắt trước khi sử dụng và ở ngày 7, 14, 21, 28, 56, 84, 112, 140, 154, 168 và 182 sau khi sử dụng, và mức HBsAg trong huyết thanh được đo trong từng thời điểm. Trong quy trình thử nghiệm, thí nghiệm với đối tượng được kết thúc một khi hàm lượng HBsAg trong huyết thanh gần bằng hoặc vượt quá giá trị ban đầu ở kết quả thử nghiệm của chúng.

Máu được lấy từ hốc mắt khoảng 100 µl mỗi lần, và huyết thanh không ít hơn 20 µl sau khi ly tâm. Mức biểu hiện của HBsAg trong huyết thanh được đo bằng cách sử

dụng kit HBsAg CLIA (Autobio, CL0310). Mức biểu hiện của HBV ADN được đo bằng cách chiết ADN từ huyết thanh dựa trên hướng dẫn của kit QIAamp 96 DNA Blood sau đó là qPCR.

Mức biểu hiện HBsAg được chuẩn hóa = (hàm lượng HBsAg sau khi sử dụng/hàm lượng HBsAg trước khi sử dụng) × 100%.

Tỷ lệ ức chế kháng HBsAg = (1 - hàm lượng HBsAg sau khi sử dụng/hàm lượng HBsAg trước khi sử dụng) × 100%, trong đó hàm lượng HBsAg được biểu thị dưới dạng đương lượng (UI) của HBsAg trong mỗi mililit (ml) huyết thanh.

Mức biểu hiện HBV ADN được chuẩn hóa = (hàm lượng HBV ADN sau khi sử dụng/hàm lượng HBV ADN trước khi sử dụng) × 100%.

Tỷ lệ ức chế kháng HBV ADN = (1 - hàm lượng HBV ADN sau khi sử dụng/hàm lượng HBV ADN trước khi sử dụng) × 100%,

trong đó hàm lượng HBV ADN được biểu thị dưới dạng số bản sao của HBV ADN trong mỗi mililit (ml) huyết thanh.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 16 và Fig. 17. Như có thể thấy từ kết quả trên Fig. 16, nhóm đối chứng âm NS không thể hiện hiệu quả ức chế ở các thời điểm khác nhau sau khi sử dụng; ngược lại, cả thể tiếp hợp 24 và 25 đều thể hiện hiệu quả ức chế tốt kháng HBsAg ở các thời điểm khác nhau sau khi sử dụng. Cụ thể là, thể tiếp hợp 24 ở liều 3mg/kg thể hiện một cách nhất quán tỷ lệ ức chế cao kháng HBsAg trong huyết thanh trong khoảng thời gian lên đến 140 ngày, biểu thị là nó có thể ức chế một cách ổn định và hiệu quả sự biểu hiện của gen HBV trong khoảng thời gian dài hơn.

Như có thể thấy từ kết quả trên Fig. 17, thể tiếp hợp siARN trong mỗi ví dụ cũng thể hiện sự ức chế hiệu quả kháng sự biểu hiện của HBV ADN và duy trì tỷ lệ ức chế tương đối cao trong khoảng thời gian lên đến 84 ngày.

Ngược lại, dù thể tiếp hợp so sánh 15 đạt được các hiệu quả ức chế mARN gần giống nhau như ở mỗi ví dụ trong 28 ngày đầu tiên, hiệu quả ức chế giảm đi đáng kể sau đó, vì vậy thời lượng có hiệu quả ức chế của chúng được thể hiện trên Fig.16 và Fig.17

là ngắn hơn đáng kể so với thời lượng có hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp 24 và 25 ở cùng một mức liều.

Theo phương pháp giống như trên, bốn thử nghiệm nữa tiếp tục được tiến hành, trong đó huyết thanh HBsAg được đo, ngoại trừ:

Trong mô hình chuột nhắt nồng độ thấp AAV-HBV, 3 mg/kg và 1 mg/kg thể tiếp hợp 25 được định liều một cách tương ứng, NS được sử dụng làm đối chứng, thử nghiệm tiếp tục cho đến ngày 140, và kết quả được thể hiện trên Fig. 18;

Trong mô hình M-Tg, 3 mg/kg và 1 mg/kg thể tiếp hợp 17 và 25 được định liều một cách tương ứng, PBS được định liều làm đối chứng, thử nghiệm tiếp tục cho đến ngày 70, và kết quả được thể hiện trên Fig. 19;

Trong mô hình M-Tg, 5 mg/kg, 1 mg/kg và 0,2 mg/kg thể tiếp hợp 26 và 5 mg/kg thể tiếp hợp so sánh 15 được định liều một cách tương ứng, PBS được định liều làm đối chứng, thử nghiệm tiếp tục cho đến ngày 78, và kết quả được thể hiện trên Fig. 20;

Trong mô hình bản sao 1.28, 3 mg/kg và 1mg/kg thể tiếp hợp 24 được định liều một cách tương ứng, thử nghiệm tiếp tục cho đến ngày 210, và kết quả được thể hiện trên Fig. 21.

Với các liều lượng khác nhau ở trên, mỗi thể tiếp hợp được sử dụng ở cùng một thể tích liều, trong khi nồng độ của dung dịch tiếp hợp được điều chỉnh riêng rẽ, để được định liều theo đó.

Từ kết quả trên Fig. 18-Fig. 21, có thể thấy rằng thể tiếp hợp siARN theo sáng chế thể hiện hiệu quả ức chế kéo dài và hiệu quả với huyết thanh HBsAg ở các mô hình động vật khác nhau, và tính phụ thuộc liều đều đặn được tiết lộ.

Ví dụ thử nghiệm 6 - Thử nghiệm để xác minh hiệu quả của thể tiếp hợp siARN ở bảng 3B-3D

Ví dụ thử nghiệm 6-1 – Thử nghiệm tác dụng ngoài đích đối với thể tiếp hợp 43, 62 và 78.

Theo phương pháp được mô tả ở ví dụ thử nghiệm 5-1, tác dụng ngoài đích của thể tiếp hợp 43, 62 và 78 được thí nghiệm riêng rẽ, ngoại trừ: đối với mỗi thể tiếp hợp,

trình tự đích ghép đôi bổ sung hoàn toàn với trình tự sợi đối nghĩa của siARN trong thể tiếp hợp tương ứng được sử dụng để xây dựng cấu trúc plasmit trúng đích GSCM, trong khi trình tự đích hoàn toàn giống với trình tự sợi đối nghĩa, ghép đôi bổ sung với vị trí 1-8 của trình tự sợi đối nghĩa hoặc giống với vị trí 1-8 của trình tự sợi đối nghĩa của siARN trong thể tiếp hợp tương ứng được sử dụng một cách tương ứng để xây dựng cấu trúc plasmit ngoài đích GSSM, PSCM và PSSM. Kết quả được thể hiện trên Fig. 22-FIG. 24, một cách tương ứng. Từ kết quả trên Fig. 22-Fig. 24, có thể thấy rằng tất cả các thể tiếp hợp ở trên không chỉ có hiệu quả ức chế ưu việt với mARN đích, mà còn thể hiện tác dụng ngoài đích thấp.

Thể tiếp hợp thử nghiệm 6-2 - Thử nghiệm này minh họa hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp theo sáng chế trong việc biểu hiện của HBV mARN ở chuột nhắt *in vivo*.

Trong ví dụ thử nghiệm này, hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp 25, 42, 43, 62 và 78 trong việc biểu hiện HBV mARN ở chuột nhắt chuyển gen HBV C57BL/6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri/J được khảo sát.

Đầu tiên, chuột nhắt C57BL/6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri/J được chia ngẫu nhiên thành các nhóm dựa trên hàm lượng HBsAg trong huyết thanh (tất cả đều là cái, 4 con chuột nhắt mỗi nhóm) và được đánh số riêng rẽ, và nhóm NS được thêm vào làm nhóm đối chứng. Các liều lượng thuốc cho tất cả các động vật đều được tính theo trọng lượng cơ thể. Một liều đơn của thể tiếp hợp 24 hoặc 42 được sử dụng dưới da, mỗi thể tiếp hợp ở liều lượng 1 mg/kg hoặc 0,1 ml/kg, một cách tương ứng là 0,2 mg/ml và 0,02 mg/ml thể tiếp hợp trong dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng và thể tích liều lượng là 5 ml/kg. Động vật được làm chết vào ngày 7 sau khi sử dụng. Gan được gom và được giữ với ARN sau đó (Sigma Aldrich), và mô gan được đồng nhất với máy đồng hóa mô. Sau đó ARN tổng được chiết và thu được bằng cách sử dụng Trizol theo quy trình tiêu chuẩn để chiết ARN tổng.

Mức biểu hiện của HBV mARN ở mô gan được đo bằng qPCR huỳnh quang thời gian thực. Cụ thể là, ARN tổng đã chiết được phiên mã ngược thành cADN bằng cách sử dụng kit phiên mã ngược ImProm-II™ (Promega) theo hướng dẫn của nó, và sau đó hiệu quả ức chế của siARN trong việc biểu hiện HBV mARN ở mô gan được đo bằng cách sử dụng kit qPCR huỳnh quang (Beijing Cowin Biosicences Co., Ltd). Theo

phương pháp qPCR huỳnh quang này, gen β-actin được sử dụng làm gen nội đối chứng, HBV và β-actin được phát hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi cho HBV và β-actin, một cách tương ứng.

Trình tự của đoạn mồi dùng cho quy trình phát hiện được thể hiện ở bảng 5A.

Theo phương pháp qPCR huỳnh quang này, việc tính toán mức biểu hiện của HBV mARN cũng như tỷ lệ ức chế kháng mARN đối với các thể tiếp hợp là theo ví dụ thử nghiệm 5-2.

trong đó, nhóm đối chứng là nhóm chuột nhắt đối chứng được cho sử dụng NS ở thử nghiệm này và mỗi nhóm thử nghiệm là nhóm chuột nhắt được cho sử dụng các thể tiếp hợp siARN khác nhau, một cách tương ứng. Kết quả được thể hiện trên Fig. 25.

Trong các thử nghiệm khác, hai thử nghiệm tiếp tục được tiến hành theo phương pháp dưới đây:

Phương pháp giống như trên được sử dụng, ngoại trừ siARN tiếp hợp được sử dụng để thử nghiệm được thay thế bằng các thể tiếp hợp 43, 62, 78 và 25, và dữ liệu được thu thập ở ngày 7, kết quả được thể hiện trên Fig. 26; và

Phương pháp giống như trên được sử dụng, ngoại trừ siARN tiếp hợp được sử dụng để thử nghiệm được thay thế bằng các thể tiếp hợp 42, 43 và 25, và mỗi trong số thể tiếp hợp 42 và thể tiếp hợp 25 được sử dụng ở liều lượng 1 mg/kg và 0,1 mg/kg (trong đó thể tích liều lượng vẫn như cũ, trong khi nồng độ dung dịch tiếp hợp được điều chỉnh một cách tương ứng). Ngoài ra, trình tự của đoạn mồi dùng cho quy trình phát hiện được thay thế bằng trình tự được thể hiện ở bảng 5B. Kết quả được thể hiện trên Fig. 27.

Bảng 5B Trình tự của đoạn mồi dùng cho quy trình phát hiện

Gen	Đoạn mồi nghịch	Đoạn mồi thuận
HBV	5'- CCGTCTGTGCCTTCTCATCT -3' (SEQ ID NO: 187)	5'- TAATCTCCTCCCCCAACTCC - 3' (SEQ ID NO: 188)
β-actin	5'- AGCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT TG -3' (SEQ ID NO: 191)	5'- TTCTGACCCATTCCCACCATCA CA-3' (SEQ ID NO: 192)

Như có thể thấy từ Fig. 26 và Fig. 27, tất cả các thể tiếp hợp ở trên theo sáng chế thể hiện hoạt tính ức chế cao trong việc biểu hiện HBV mARN ở chuột nhắt *in vivo*. Ngoài ra, hiệu quả ức chế của chúng với các loại HBV mARN khác nhau vẫn cơ bản là như nhau.

Ví dụ thử nghiệm 6-3 - Thử nghiệm này minh họa thử nghiệm phụ thuộc thời gian của hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp siARN ở bảng 3B trong sự biểu hiện của HBsAg và HBV ADN ở huyết thanh chuột nhắt chuyển gen HBV.

Mô hình chuột nhắt nồng độ thấp AAV-HBV được sử dụng. Sau khi thiết lập thành công mô hình động vật, các con chuột nhắt này được chia ngẫu nhiên thành các nhóm dựa trên hàm lượng HBsAg trong huyết thanh (5 con chuột nhắt mỗi nhóm). Thể tiếp hợp 43 được sử dụng một cách tương ứng cho mỗi nhóm, và PBS được dùng làm đối chứng trống. Các liều lượng thuốc cho tất cả các động vật được tính theo trọng lượng cơ thể. Một liều đơn được sử dụng dưới da, với liều lượng 3 mg/kg hoặc 1 mg/kg, đối với 0,6 mg/ml hoặc 0,2 mg/ml thể tiếp hợp trong dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng và thể tích là 5 ml/kg. Máu được lấy từ búi tĩnh mạch mắt chuột nhắt trước khi sử dụng và ở ngày 7, 14, 21, 28, 56, 84, 112, 126 và 140 sau khi sử dụng, và mức HBsAg trong huyết thanh được đo trong mỗi thời điểm.

Máu được lấy từ hốc mắt khoảng 100 µl mỗi lần, và huyết thanh không ít hơn 20 µl sau khi ly tâm. Hàm lượng HBsAg trong huyết thanh được đo bằng cách sử dụng kit HBsAg CLIA (Autobio, CL0310).

Mức biểu hiện HBsAg được chuẩn hóa = (hàm lượng HBsAg sau khi sử dụng/hàm lượng HBsAg trước khi sử dụng) × 100%.

Tỷ lệ ức chế kháng HBsAg = (1 - hàm lượng HBsAg sau khi sử dụng/hàm lượng HBsAg trước khi sử dụng) × 100%, trong đó hàm lượng HBsAg được biểu thị dưới dạng đương lượng (UI) của HBsAg trong mỗi mililit (ml) huyết thanh.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 28. Như có thể thấy từ kết quả của Fig. 28, nhóm đối chứng âm NS không thể hiện hiệu quả ức chế ở các thời điểm khác nhau sau khi sử dụng; ngược lại, thể tiếp hợp 43 thể hiện hiệu quả ức chế ưu việt kháng HBsAg ở các thời điểm khác nhau sau khi sử dụng, và thể hiện một cách nhất quán tỷ lệ ức chế cao kháng HBsAg trong huyết thanh trong khoảng thời gian lên đến 100 ngày, biểu thị rằng nó có thể ức chế một cách ổn định và hiệu quả sự biểu hiện của gen HBV trong khoảng thời gian dài hơn.

Trong các thử nghiệm khác, theo phương pháp được mô tả ở trên, ở mô hình chuột nhắt M-Tg, 3 mg/kg và 1 mg/kg thể tiếp hợp 24, 62 và 78 được định liều một cách tương ứng, đối với 0,6 mg/ml hoặc 0,2 mg/ml thể tiếp hợp trong dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng và thể tích là 5 ml/kg. Thử nghiệm tiếp tục cho đến ngày 85, và kết quả được thể hiện trên Fig. 29 và Fig. 30.

Từ kết quả của Fig. 29, có thể thấy rằng tất cả các thể tiếp hợp 24, 62 và 78 đều thể hiện hiệu quả ức chế kéo dài và hiệu quả với huyết thanh HBsAg lên đến 85 ngày. Từ kết quả trên Fig. 30, ở ngày 85 sau khi sử dụng, các thể tiếp hợp 24 và 78 với liều lượng 3 mg/kg vẫn thể hiện độ ức chế 68,6% và 62% của HBV mARN, một cách tương ứng.

Trong các thử nghiệm khác, theo phương pháp được mô tả ở trên, ở mô hình chuột nhắt bản sao 1.28, 3 mg/kg và 1 mg/kg thể tiếp hợp 43 được định liều một cách tương ứng, đối với 0,6 mg/ml hoặc 0,2 mg/ml thể tiếp hợp trong dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng và thể tích là 5 ml/kg. Thử nghiệm tiếp tục cho đến ngày 85. Hiệu quả

ức chế với HBsAg và HBV ADN được đo theo ví dụ thử nghiệm 5-4, và kết quả được thể hiện trên Fig. 31 và Fig. 32.

Từ kết quả trên Fig. 31 và Fig. 32, có thể thấy rằng ở mô hình chuột nhắt bản sao 1.28, thể tiếp hợp 43 liên tục thể hiện hiệu quả ức chế với sự biểu hiện của HBV cũng như HBV ADN lên đến 85 ngày.

Ví dụ thử nghiệm 7 - Thử nghiệm để xác minh hiệu quả của thể tiếp hợp 167 và 168

Ví dụ thử nghiệm 7-1 - Thử nghiệm này minh họa rằng thể tiếp hợp siARN theo sáng chế không chỉ có hoạt tính tương đối cao *in vitro*, mà còn thể hiện tác dụng ngoài đích thấp.

Trong ví dụ thử nghiệm này, thể tiếp hợp 168 được khảo sát trong hệ thống psiCHECK *in vitro* cho hoạt tính trúng đích và tác dụng ngoài đích. Nói cụ thể, thể tiếp hợp 168 được thí nghiệm về hoạt tính nhắm đích trình tự đích trùng khớp hoàn toàn (trong đó trình tự nucleotit này bổ sung hoàn toàn hoặc giống với trình tự nucleotit của toàn bộ độ dài của sợi đối nghĩa của thể tiếp hợp 168) hoặc nhắm đích trình tự đích trùng khớp vùng giống (trong đó trình tự nucleotit này bổ sung hoặc giống với trình tự nucleotit của vị trí 1-8 của sợi đối nghĩa của thể tiếp hợp 168).

Theo phương pháp được mô tả ở ví dụ thử nghiệm 5-1, thể tiếp hợp 168 được thí nghiệm, ngoại trừ, trình tự đích ghép đôi bổ sung hoàn toàn với trình tự sợi đối nghĩa của siARN ở thể tiếp hợp 168 được sử dụng để xây dựng cấu trúc plasmit trúng đích GSCM, trong khi trình tự đích hoàn toàn giống với trình tự sợi đối nghĩa, ghép đôi bổ sung với vị trí 1-8 của sợi đối nghĩa trình tự hoặc giống với vị trí 1-8 của trình tự sợi đối nghĩa của siARN ở thể tiếp hợp 168 được sử dụng một cách tương ứng để xây dựng cấu trúc plasmit ngoài đích GSSM, PSCM và PSSM. Từ kết quả thí nghiệm, có thể thấy rằng tất cả các thể tiếp hợp ở trên đều không chỉ có hiệu quả ức chế ưu việt với mARN đích (với IC_{50}=0,0513 nM), mà còn thể hiện tác dụng ngoài đích thấp.

Ví dụ thử nghiệm 7-2 - Thử nghiệm này minh họa độ ổn định của thể tiếp hợp siARN trong dịch tiêu lysosom *in vitro*.

Thể tiếp hợp 167, và trình tự so sánh 1 thu được ở ví dụ điều chế 1 (mỗi loại được cung cấp ở dạng dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng tại 20 μM đối với siARN, 6 μl

đối với mỗi nhóm, một cách tương ứng, và trình tự so sánh 1 được đánh dấu là NC) được trộn kỹ riêng rẽ với 27,2 µL dung dịch natri xitrat nước (độ pH 5,0), 4,08 µL nước khử ion và 2,72 µL Tritosom chuột cống (mua từ Xenotech Inc., Cat. R0610LT, ở nồng độ cuối là 0,2 mU/µL), và ủ ở nhiệt độ không đổi là 37°C. 5 µL mẫu được lấy tại mỗi thời điểm là 0 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 6 giờ, và 24 giờ một cách tương ứng, mỗi mẫu được bổ sung vào 15 µL dung dịch ure nước 9 M để làm biến tính, và bảo quản lạnh ngay lập tức ở -80°C tủ đông để sử dụng, trong đó 0 giờ là thời điểm khi thể tiếp hợp siARN được trộn kỹ với dịch tiêu lysosom và được lấy ra ngay để thử nghiệm. Trong khi đó, như đối với thể tiếp hợp 167 và trình tự so sánh 1, tỷ lệ mol bằng nhau của siARN (20 µM, 1,5 µL) được trộn kỹ riêng rẽ với 7,5 µL dung dịch natri xitrat nước (độ pH 5,0) và 1 µL nước khử ion, sau đó được bổ sung vào 30 µL dung dịch ure nước 9 M để làm biến tính, và sau đó được trộn kỹ với 8 µL 6x chất đệm nạp (dung dịch thủy sinh của EDTA 20 mM, glyxerol 36% khối lượng, và bromophenol xanh 0,06% khối lượng) và bảo quản lạnh ngay lập tức trong tủ đông -80°C để dừng phản ứng, theo đó tạo ra được các mẫu để thử nghiệm mà không được xử lý bằng dịch tiêu lysosom (được đánh dấu là M trong điện di đồ). 16% khối lượng của gel polyacrylamit không biến tính được điều chế. 20 µL mỗi mẫu để thử nghiệm được nạp riêng rẽ vào gel này để thực hiện điện di trong 60 phút trong dòng điện không đổi 80 mA. Sau khi kết thúc việc điện di, gel được nhuộm bằng thuốc nhuộm 1x Sybr Gold (Invitrogen, Cat. 11494) trong 15 phút sau đó chụp hình. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 33.

Độ ổn định ở dịch tiêu lysosom có nguồn gốc từ chuột cống của thể tiếp hợp 167 và trình tự so sánh 1 (được đánh dấu là NC trên Fig. 34) được đo theo cùng phương pháp, ngoại trừ dịch tiêu lysosom có nguồn gốc từ người được thay thế bằng dịch tiêu lysosom có nguồn gốc từ chuột cống (Tritosom gan chuột cống mua từ Xenotech Inc., Cat. R0610.LT, ở nồng độ cuối là 0,2 mU/µL). Kết quả của nó được thể hiện trên Fig. 34.

Fig. 33 và Fig. 34 chỉ ra rằng thể tiếp hợp theo sáng chế có thể vẫn không bị thoái biến trong ít nhất 24 giờ cả ở dịch tiêu lysosom có nguồn gốc từ người và chuột cống, thể hiện độ ổn định tốt.

Thể tiếp hợp thử nghiệm 7-3 - Thử nghiệm này minh họa hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp theo sáng chế trong việc biểu hiện HBV mARN ở chuột nhắt *in vivo*.

Trong ví dụ thử nghiệm này, hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp 167 và 168 trong việc biểu hiện HBV mARN ở chuột nhắt chuyển gen HBV C57BL/6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri/J được khảo sát.

Đầu tiên, chuột nhắt C57BL/6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri/J được chia ngẫu nhiên thành các nhóm dựa trên hàm lượng HBsAg trong huyết thanh (tất cả đều là cái, 5 con chuột nhắt mỗi nhóm) và nhóm PBS và thể tiếp hợp 167 và 168 được sử dụng riêng rẽ. Trong đó, 5 mg/kg 1x PBS được sử dụng dưới da cho mỗi động vật đối với nhóm PBS. Như đối với thể tiếp hợp 167 hoặc 168, liều đơn thể tiếp hợp được sử dụng dưới da, mỗi thể với liều lượng 1 mg/kg là 0,2 mg/ml thể tiếp hợp trong dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng và thể tích liều lượng là 5 ml/kg. Các còn này được làm chết vào ngày 28 sau khi sử dụng. Gan được gom và được giữ với ARN sau đó (Sigma Aldrich), và mô gan được đồng nhất với máy đồng hóa mô. Sau đó ARN tổng được chiết và thu được bằng cách sử dụng Trizol theo quy trình tiêu chuẩn để chiết ARN tổng.

Mức biểu hiện của HBV mARN trong mô gan được đo bằng qPCR huỳnh quang thời gian thực. Cụ thể là, ARN tổng đã chiết được phiên mã ngược thành cADN bằng cách sử dụng kit phiên mã ngược ImProm-II™ (Promega) theo hướng dẫn của nó, và sau đó hiệu quả ức chế của siARN trong việc biểu hiện của HBV mARN trong mô gan được đo bằng cách sử dụng kit qPCR huỳnh quang (Beijing Cowin Biosicences Co., Ltd). Theo phương pháp qPCR huỳnh quang này, gen β-actin được sử dụng làm gen nội đối chứng, HBV và β-actin được phát hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi cho HBV và β-actin, một cách tương ứng.

Trình tự của đoạn mồi dùng cho quy trình phát hiện được thể hiện ở bảng 5G.

Bảng 5G Trình tự của đoạn mồi dùng cho quy trình phát hiện

Gen	Đoạn mồi nghịch	Đoạn mồi thuận
HBV	5'- GTCTTTTGGGTTTTGCTGCC -3' (SEQ ID NO: 238)	5'- GCAACGGGGTAAAGGTTCAG -3' (SEQ ID NO: 239)
β-actin	5'- GGTCGGAGTCAACGGATTT -3' (SEQ ID NO: 240)	5'- CCAGCATCGCCCCACTTGA -3' (SEQ ID NO: 241)

Theo phương pháp qPCR huỳnh quang này, việc tính toán sự biểu hiện của HBV mARN cũng như tỷ lệ ức chế kháng mARN đối với các thể tiếp hợp theo ví dụ thử nghiệm 5-2. Kết quả được thể hiện ở bảng 6G.

Trong các thử nghiệm khác, phương pháp giống như trên được sử dụng, ngoại trừ siARN tiếp hợp được dùng để thử nghiệm được thay thế bằng thể tiếp hợp 167 và 168, và liều lượng sử dụng thay đổi, kết quả được thể hiện ở bảng 6G.

Bảng 6G Ức chế sự biểu hiện HBV MARN bằng thể tiếp hợp siARN ở gan chuột nhắt

Thể tiếp hợp	Liều (mg/kg)	Ức chế với HBV mARN gan (%)
--	NA	0
Thể tiếp hợp 167	1	77,41
Thể tiếp hợp 168	1	88,27
Thể tiếp hợp 168	0,3	57,95

Như có thể thấy từ kết quả ở trên, tất cả các thể tiếp hợp ở trên theo sáng chế đều thể hiện hoạt tính ức chế cao đối với việc biểu hiện của HBV mARN ở chuột nhắt *in vivo*, minh họa hiệu quả phân phối tốt *in vivo* của thể tiếp hợp siARN theo sáng chế.

Ví dụ thử nghiệm 7-4 - Thử nghiệm này minh họa thử nghiệm phụ thuộc thời gian của hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp siARN ở bảng 3B trong việc biểu hiện của HBsAg và HBV ADN ở huyết thanh chuột nhắt chuyển gen HBV.

Trong mô hình bản sao 1.28, các con chuột nhắt này được chia ngẫu nhiên thành các nhóm (6 con chuột nhắt mỗi nhóm, một nửa là cái và một nửa là đực). Nước muối bình thường và các liều lượng khác nhau của thể tiếp hợp 168 được sử dụng một cách tương ứng cho mỗi nhóm, và đối với nhóm NS, 5 ml/kg nước muối bình thường được sử dụng dưới da. Đối với nhóm tiếp hợp, liều lượng thuốc cho tất cả các động vật được tính theo trọng lượng cơ thể. Một liều đơn được sử dụng dưới da, với liều lượng 3 mg/kg hoặc 1 mg/kg, đối với 0,6 mg/ml hoặc 0,2 mg/ml thể tiếp hợp trong dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng và thể tích là 5 ml/kg. Máu được lấy từ búi tĩnh mạch mắt chuột nhắt trước khi sử dụng và ở ngày 7, 13, 21, 28, 42, 56, 70, 84, 98, 112, 126, 140 và 154 sau khi sử dụng, và HBsAg, HBeAg cũng như mức HBV ADN trong huyết thanh được đo trong mỗi thời điểm.

Máu được lấy từ hốc mắt khoảng 100 µl mỗi lần, và huyết thanh không ít hơn 20 µl sau khi ly tâm. Hàm lượng HBsAg trong huyết thanh được đo bằng cách sử dụng kit HBsAg CLIA (Autobio, CL0310). Hàm lượng HBeAg trong huyết thanh được đo bằng cách sử dụng kit HBsAg CLIA (Autobio, CL0310). Mức biểu hiện của HBV ADN được đo bằng cách chiết ADN từ huyết thanh dựa trên hướng dẫn của kit QIAamp 96 DNA Blood sau đó là qPCR.

Mức biểu hiện HBsAg được chuẩn hóa = (hàm lượng HBsAg sau khi sử dụng/hàm lượng HBsAg trước khi sử dụng) × 100%.

Tỷ lệ ức chế kháng HBsAg = (1 - hàm lượng HBsAg sau khi sử dụng/hàm lượng HBsAg trước khi sử dụng) × 100%, trong đó hàm lượng HBsAg được biểu thị dưới dạng đương lượng (UI) của HBsAg trong mỗi mililit (ml) huyết thanh.

Mức biểu hiện HBeAg được chuẩn hóa = (hàm lượng HBeAg sau khi sử dụng/hàm lượng HBeAg trước khi sử dụng) × 100%.

Tỷ lệ ức chế kháng HBeAg = (1 - hàm lượng HBeAg sau khi sử dụng/hàm lượng HBeAg trước khi sử dụng) × 100%, trong đó hàm lượng HBeAg được biểu thị dưới dạng đương lượng (UI) của HBeAg trong mỗi mililit (ml) huyết thanh.

Mức biểu hiện HBV ADN được chuẩn hóa = (hàm lượng HBV ADN sau khi sử dụng/hàm lượng HBsAg trước khi sử dụng) × 100%.

Tỷ lệ ức chế kháng HBV ADN = (1 - hàm lượng HBV ADN sau khi sử dụng/hàm lượng HBV ADN trước khi sử dụng) × 100%,

trong đó hàm lượng HBV ADN được biểu thị ở dạng số bản sao của HBV ADN trong mỗi mililit (ml) huyết thanh.

Kết quả được thể hiện trên Fig. 35-Fig. 37. Như có thể thấy từ kết quả trên Fig. 35, nhóm đối chứng âm NS không thể hiện hiệu quả ức chế ở các thời điểm khác nhau sau khi sử dụng; ngược lại, cả hai thể tiếp hợp 168 đều thể hiện hiệu quả ức chế tốt kháng HBsAg ở các thời điểm khác nhau sau khi sử dụng, cụ thể là nhóm 3 mg/kg thể hiện một cách nhất quán tỷ lệ ức chế trên 90% kháng HBsAg trong huyết thanh trong khoảng thời gian lên đến 100 ngày, biểu thị rằng nó có thể ức chế một cách ổn định và hiệu quả sự biểu hiện của gen HBV trong khoảng thời gian dài hơn.

Như có thể thấy từ kết quả trên Fig. 36, thể tiếp hợp siARN cũng có thể ức chế sự biểu hiện HBeAg. Trong đó, cả hai nhóm 3 mg/kg đều thể hiện một cách nhất quán tỷ lệ ức chế trên 50% kháng HBeAg trong huyết thanh trong khoảng thời gian lên đến 70 ngày.

Từ kết quả trên Fig. 37, có thể thấy rằng thể tiếp hợp cũng thể hiện hiệu quả ức chế hiệu quả đối với sự biểu hiện của HBV ADN và thể hiện tỷ lệ ức chế tương đối cao kháng HBV ADN trong khoảng thời gian lên đến 154 ngày.

Ví dụ thử nghiệm 8 - Thử nghiệm để xác minh hiệu quả của thể tiếp hợp siARN ở bảng 3E

Ví dụ thử nghiệm 8-1 - Thử nghiệm này minh họa hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp siARN ở bảng 3E trong việc biểu hiện ANGPTL3 mARN *in vivo*.

Trong ví dụ thử nghiệm này, tỷ lệ ức chế của thể tiếp hợp 105, 109, 111 và 115 đối với sự biểu hiện của ANGPTL3 trong mô gan của chuột nhắt BALB/c bình thường được khảo sát.

Chuột nhắt BALB/c bình thường (6-8 tuần tuổi, mua từ Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.) được chia ngẫu nhiên thành các nhóm (5 con chuột nhắt mỗi nhóm). Thể tiếp hợp 105, 109, 111, 115 và PBS được sử dụng riêng rẽ cho chuột nhắt trong mỗi nhóm. Các liều lượng thuốc cho tất cả các động vật được tính theo trọng lượng cơ thể. Một liều đơn được sử dụng dưới da, với liều lượng 3 mg/kg và 0,3 mg/kg (bằng lượng siARN) như 0,3 mg/ml và 0,03 mg/ml dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng và thể tích liều lượng là 10 ml/kg đối với thể tiếp hợp siARN. Chuột nhắt được làm chết theo mẻ một cách tương ứng ở ngày 14 và ngày 28 sau khi sử dụng. Gan được gom và được giữ với ARN sau đó (Sigma Aldrich), và mô gan được đồng nhất với máy đồng hóa mô. Sau đó ARN tổng được chiết và thu được bằng cách sử dụng Trizol (Thermo Fisher) theo quy trình tiêu chuẩn để chiết ARN tổng.

Mức biểu hiện của ANGPTL3 mARN ở mô gan được đo bằng qPCR huỳnh quang thời gian thực. Cụ thể là, ARN tổng đã chiết được phiên mã ngược thành cADN bằng cách sử dụng kit phiên mã ngược ImProm-II™ (Promega) theo hướng dẫn của chúng, và sau đó hiệu quả ức chế của siARN trong việc biểu hiện ANGPTL3 mARN ở mô gan được đo bằng cách sử dụng kit qPCR huỳnh quang (Beijing Cowin Biosicences Co., Ltd). Theo phương pháp qPCR huỳnh quang này, gen GAPDH được sử dụng làm gen nội đối chứng, và ANGPTL3 và GAPDH được phát hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi cho ANGPTL3 và GAPDH, một cách tương ứng.

Trình tự của đoạn mồi dùng cho quy trình phát hiện được thể hiện ở bảng 5E.

Gen	Đoạn mồi nghịch	Đoạn mồi thuận
ANGPTL3 chuột nhắt	5'-GAGGAGCAGCTAACCAACTTAAT-3' (SEQ ID NO: 199)	5'-TCTGCATGTGCTGTTGACTTAAT-3' (SEQ ID NO: 200)

GAPDH chuột nhắt	5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTC-3' (SEQ ID NO: 201)	5'-TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTGA-3' (SEQ ID NO: 202)

Mức biểu hiện của ANGPTL3 mARN được tính bằng công thức: mức biểu hiện của ANGPTL3 mARN = (mức biểu hiện của ANGPTL3 mARN ở nhóm thử nghiệm/mức biểu hiện của GAPDH mARN ở nhóm thử nghiệm)/(mức biểu hiện của ANGPTL3 mARN ở nhóm đối chứng/mức biểu hiện của GAPDH mARN ở nhóm đối chứng) × 100%.

Tỷ lệ ức chế kháng ANGPTL3 mARN bởi thể tiếp hợp được tính bằng công thức: mức biểu hiện của ANGPTL3 mARN = (1 – mức biểu hiện của ANGPTL3 mARN ở nhóm thử nghiệm/mức biểu hiện của GAPDH mARN ở nhóm thử nghiệm)/(mức biểu hiện của ANGPTL3 mARN ở nhóm đối chứng/mức biểu hiện của GAPDH mARN ở nhóm đối chứng) × 100%. Nhóm đối chứng là nhóm chuột nhắt đối chứng được cho sử dụng PBS ở thử nghiệm này và mỗi nhóm thử nghiệm là nhóm chuột nhắt được cho sử dụng các thể tiếp hợp siARN khác nhau, một cách tương ứng. Kết quả được thể hiện trên Fig. 38A và Fig. 38B.

Như có thể thấy từ kết quả trên Fig. 38A và Fig. 38B, tất cả các thể tiếp hợp siARN ở trên đều thể hiện hoạt tính ức chế ưu việt kháng lại sự biểu hiện của ANGPTL3 mARN.

Máu (khoảng 100 μL) được lấy từ hốc mắt của đối tượng thử nghiệm ở trên và ly tâm để thu được huyết thanh. Hàm lượng của tổng cholesterol (CHO) và triglyxerit (TG) trong huyết thanh còn đo được bằng cách sử dụng máy phân tích sinh hóa huyết thanh hoàn toàn tự động PM1P000/3 (SABA, Italia). Kết quả về lipit trong máu được chuẩn hóa và tỷ lệ ức chế kháng nồng độ lipit trong máu được tính bằng công thức: tỷ lệ ức chế = (1 - hàm lượng lipit trong máu ở nhóm thử nghiệm sau khi sử dụng/hàm lượng lipit trong máu ở nhóm thử nghiệm trước khi sử dụng) × 100%. Lipit trong máu dùng để chỉ tổng cholesterol hoặc triglyxerit. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 39A và Fig. 39B.

Như có thể thấy từ kết quả trên Fig. 39A và Fig. 39B, trong huyết thanh của chuột nhắt được điều trị bằng các liều lượng khác nhau của thể tiếp hợp 105, 109, 111 và 115, cả hàm lượng của CHO và TG đều giảm đáng kể, và sự giảm nồng độ lipit trong máu được quan sát cho đến ít nhất 28 ngày sau khi sử dụng.

Thể tiếp hợp thử nghiệm 8-2 - Thử nghiệm này minh họa tác dụng đến lipit trong máu đối với thể tiếp hợp siARN theo sáng chế.

Chuột nhắt Tg(APOC3)3707Bres được chia ngẫu nhiên thành các nhóm dựa trên hàm lượng TG > 2mmol/L (5 con chuột nhắt mỗi nhóm) và đối với mỗi nhóm, đối chứng âm PBS và thể tiếp hợp 115 được sử dụng riêng rẽ. Các liều lượng thuốc cho tất cả các động vật được tính theo trọng lượng cơ thể. Một liều đơn thể tiếp hợp được sử dụng dưới da, mỗi loại với liều lượng 3 mg/kg hoặc 1 mg/kg, mỗi loại như 0,6 mg/ml hoặc 0,2 mg/ml thể tiếp hợp trong dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng và thể tích liều lượng là 5 ml/kg. Máu được lấy từ hốc mắt của chuột nhắt trước khi sử dụng và 7, 14, 21, 28, 35, 56, 70, 84, 98, 112, 126, 140, 154 và 168 ngày sau khi sử dụng, và hàm lượng của CHO và TG trong huyết thanh được đo.

Máu được lấy từ hốc mắt khoảng 0,1 ml mỗi lần, và huyết thanh không ít hơn 20 µl sau khi ly tâm. Hàm lượng của tổng cholesterol (CHO) và triglyxerit (TG) trong huyết thanh bằng cách sử dụng máy phân tích sinh hóa huyết thanh hoàn toàn tự động PM1P000/3 (SABA, Italia).

Kết quả về lipit trong máu được chuẩn hóa: Mức lipit trong máu được chuẩn hóa = (hàm lượng lipit trong máu ở nhóm thử nghiệm sau khi sử dụng/hàm lượng lipit trong máu ở nhóm thử nghiệm trước khi sử dụng), và tỷ lệ ức chế kháng nồng độ lipit trong máu = (1 - hàm lượng lipit trong máu ở nhóm thử nghiệm sau khi sử dụng/hàm lượng lipit trong máu ở nhóm thử nghiệm trước khi sử dụng) × 100%. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 40A và Fig. 40B.

Như có thể thấy từ kết quả trên Fig. 40A và Fig. 40B, ở các thời điểm khác nhau sau khi sử dụng, thể tiếp hợp 115 thể hiện hiệu quả đáng kể trong việc làm giảm TG và CHO lên đến 168 ngày, biểu thị sự ức chế ổn định và hiệu quả trong thời gian dài kháng lại sự biểu hiện của mức biểu hiện gen ANGPTL3 ở chuột nhắt *in vivo*.

Trong các thử nghiệm khác, phương pháp giống như trên được sử dụng, ngoại trừ: chuột nhắt mô hình ob/ob được sử dụng; thể tiếp hợp 111, 115 và thể tiếp hợp so sánh 16 được sử dụng riêng rẽ, mỗi loại ở liều lượng 3 mg/kg và 1 mg/kg; và dữ liệu được thu thập vào ngày 0, 7, 14, 21, 28, 35 và 41 sau khi sử dụng. Kết quả được thể hiện trên Fig. 41A-Fig. 41B.

Như có thể thấy từ kết quả trên Fig. 41A-Fig. 41B, có thể thấy rằng thể tiếp hợp 111 và 115 theo sáng chế có thể làm giảm liên tục nồng độ lipit trong máu ở chuột nhắt ob/ob *in vivo* trong 41 ngày, thể hiện hoạt tính ức chế ưu việt.

Trong các thử nghiệm khác, phương pháp giống như trên được sử dụng, ngoại trừ: thể tiếp hợp 111 và thể tiếp hợp so sánh 16 được sử dụng riêng rẽ, mỗi loại với liều lượng 3 mg/kg và 1 mg/kg một cách tương ứng như 0,6 mg/ml và 0,2 mg/ml của dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng, và thể tích liều lượng là 5 ml/kg; và giá trị CHO và TG được thử nghiệm ở ngày 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56 và 70 sau khi sử dụng. Kết quả được thể hiện trên Fig. 42A-Fig. 42D.

Như có thể thấy từ kết quả trên Fig. 42A-Fig. 42D, có thể thấy rằng thể tiếp hợp 111 theo sáng chế có thể làm giảm liên tục lipit trong máu trong 70 ngày, tốt hơn so với thể tiếp hợp so sánh 16 trong cùng một mức liều lượng.

Ví dụ thử nghiệm 8-3 - Thử nghiệm này minh họa hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp siARN với các phân tử tiếp hợp khác nhau ở bảng 3A kháng lại sự biểu hiện của ANGPTL3 mARN và tác dụng đến lipit trong máu ở động vật linh trưởng không phải người.

Như đối với khỉ có hội chứng chuyển hóa (tất cả đều là đực), 12 con được chia nhóm là 8 đối với nhóm thử nghiệm định lượng thể tiếp hợp 169 và 4 đối với nhóm đối chứng định lượng thể tiếp hợp 25; dữ liệu gốc về khỉ được thử nghiệm và quan sát trong 3 tuần, máu được lấy hàng tuần, đo nồng độ lipit trong máu (TG, CHO, HDL). Sau đó, thể tiếp hợp 169 và thể tiếp hợp 25 (là thể tiếp hợp so sánh như siARN của nó nhắm đích mARN hoàn toàn không liên quan) được sử dụng. Các liều lượng thuốc cho tất cả các động vật được tính theo trọng lượng cơ thể. Một liều đơn được sử dụng dưới da, với liều lượng 9 mg/kg (bằng lượng siARN) như 100 mg/ml dung dịch NaCl nước 0,9%

khối lượng và thể tích liều lượng không nhiều hơn 2 ml đối với mỗi vị trí sử dụng. Máu được lấy trước và ngày 7, 14, 21, 28 và 35 sau khi sử dụng, nồng độ TG và CHO trong huyết thanh được thử nghiệm trong mỗi thời điểm.

Kết quả về lipit trong máu được chuẩn hóa và nồng độ lipit trong máu được chuẩn hóa = (hàm lượng lipit trong máu ở nhóm thử nghiệm sau khi sử dụng/hàm lượng lipit trong máu ở nhóm thử nghiệm trước khi sử dụng), và tỷ lệ ức chế kháng mức lipit trong máu = (1 - hàm lượng lipit trong máu ở nhóm thử nghiệm sau khi sử dụng/hàm lượng lipit trong máu ở nhóm thử nghiệm trước khi sử dụng) × 100%. Trong đó hàm lượng lipit trong máu ở nhóm thử nghiệm trước khi sử dụng là giá trị trung bình của lipit trong máu trong 3 tuần trước khi sử dụng, và được đánh dấu là D0 trên Fig. 43A và Fig. 43B.

Trong ngày 0 (chính ngày sử dụng) và ngày 28, sinh thiết xuyên gan qua da được tiến hành để đo mức biểu hiện mARN của ANGPTL3 ở mô gan. Gan được gom và được giữ với ARN sau đó (Sigma Aldrich), và mô gan được đồng nhất với máy đồng hóa mô. Sau đó ARN tổng được chiết và thu được bằng cách sử dụng Trizol theo quy trình tiêu chuẩn để chiết ARN tổng.

Mức biểu hiện của ANGPTL3 mARN ở mô gan được đo bằng qPCR huỳnh quang thời gian thực. Cụ thể là, ARN tổng đã chiết được phiên mã ngược thành cADN bằng cách sử dụng kit phiên mã ngược ImProm-II™ (Promega) theo hướng dẫn của nó, và sau đó hiệu quả ức chế của siARN đối với sự biểu hiện của ANGPTL3 mARN ở mô gan được đo bằng cách sử dụng kit qPCR huỳnh quang (Beijing Cowin Biosicences Co., Ltd). Theo phương pháp qPCR huỳnh quang này, gen GAPDH được sử dụng làm gen nội đối chứng, ANGPTL3 và GAPDH được phát hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi cho ANGPTL3 và GAPDH, một cách tương ứng.

Trình tự của đoạn mồi dùng cho quy trình phát hiện được thể hiện ở bảng 6E.

Bảng 6E Trình tự của đoạn mồi dùng cho quy trình phát hiện

Gen	Đoạn mồi nghịch (5'-3')	Đoạn mồi thuận (5'-3')
ANGPTL3 khỉ	CTGGTGGTGGCATGATGAGT (SEQ ID NO: 242)	CTCTTCTCCGCTCTGGCTTAG (SEQ ID NO: 243)
GAPDH khỉ	GGGAGCCAAAAGGGTCATCA (SEQ ID NO: 244)	CGTGGACTGTGGTCATGAGT (SEQ ID NO: 245)

Việc tính toán mức biểu hiện của ANGPTL3 mARN và tỷ lệ ức chế kháng ANGPTL3 mARN là theo ví dụ thử nghiệm (8-1). Nhóm đối chứng là nhóm khỉ đối chứng được cho sử dụng PBS trong thử nghiệm này và mỗi nhóm thử nghiệm là nhóm khỉ được cho sử dụng các thể tiếp hợp siARN khác nhau, một cách tương ứng. Kết quả được thể hiện trên Fig. 43A- Fig. 43C.

Như có thể thấy từ kết quả trên Fig. 43A- Fig. 43C, thể tiếp hợp 169 thể hiện sự giảm đáng kể TG và ức chế kháng lại sự biểu hiện của gen ANGPTL3, giảm 82,7% gen ANGPTL3 mARN ở ngày 28 sau khi sử dụng.

Ví dụ thử nghiệm 9 - Thử nghiệm để xác minh hiệu quả của thể tiếp hợp siARN ở bảng 3F

Ví dụ thử nghiệm 9-1 - Thử nghiệm này minh họa hiệu quả ức chế của thể tiếp hợp siARN ở bảng 3F kháng lại sự biểu hiện của APOC3 mARN *in vivo*.

Trong ví dụ thử nghiệm này, tỷ lệ ức chế của thể tiếp hợp 144 trong sự biểu hiện của APOC3 ở mô gan của chuột nhắt chuyển gen APOC3 của người (B6; CBA-Tg(APOC3)3707Bres/J, mua từ Jackson Lab) *in vivo* được khảo sát.

Chuột nhắt chuyển gen APOC3 của người (6-8 tuần tuổi, triglyxerit > 2mmol/L) được chia ngẫu nhiên thành các nhóm (5 con chuột nhắt mỗi nhóm). Thể tiếp hợp 144 và thể tiếp hợp 25 (là thể tiếp hợp so sánh như siARN của chúng nhắm đích mARN hoàn toàn không liên quan) được dùng cho chuột nhắt ở mỗi nhóm một cách tương ứng. Các liều lượng thuốc cho tất cả các động vật được tính theo trọng lượng cơ thể. Một liều đơn

được sử dụng dưới da, với liều lượng 1 mg/kg và 0,1 mg/kg (bằng lượng siARN) một cách tương ứng như 0,2 mg/ml và 0,02 mg/ml của dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng và thể tích liều lượng là 5 ml/kg đối với thể tiếp hợp siARN. Chuột nhắt được làm chết ở ngày 14 sau khi sử dụng. Gan được gom và được giữ với ARN sau đó (Sigma Aldrich), và mô gan được đồng nhất với máy đồng hóa mô. Sau đó ARN tổng được chiết và thu được bằng cách sử dụng Trizol (Thermo Fisher) theo quy trình tiêu chuẩn để chiết ARN tổng.

Mức biểu hiện của APOC3 mARN ở mô gan được đo bởi qPCR huỳnh quang thời gian thực. Cụ thể là, ARN tổng đã chiết được phiên mã ngược thành cADN bằng cách sử dụng kit phiên mã ngược ImProm-II™ (Promega) theo hướng dẫn của chúng, và sau đó hiệu quả ức chế của siARN trong việc biểu hiện APOC3 mARN ở mô gan được đo bằng cách sử dụng kit qPCR huỳnh quang (Beijing Cowin Biosicences Co., Ltd). Theo phương pháp qPCR huỳnh quang này, gen β-actin được sử dụng làm gen nội đối chứng, và APOC3 và β-actin được phát hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi cho APOC3 và β-actin, một cách tương ứng.

Trình tự của đoạn mồi dùng cho quy trình phát hiện được thể hiện ở bảng 7F.

Bảng 7F Trình tự của đoạn mồi dùng cho quy trình phát hiện

Gen	Đoạn mồi nghịch	Đoạn mồi thuận
APOC3 người	5'-GTGACCGATGGCTTCAGTTC-3' (SEQ ID NO: 248)	5'-ATGGATAGGCAGGTGGACTT-3' (SEQ ID NO: 249)
β-actin chuột nhắt	5'-AGCTTCTTTGCAGCTCCTTCGTTG-3' (SEQ ID NO: 246)	5'-TTCTGACCCATTCCCACCATCACA-3' (SEQ ID NO: 247)

Mức biểu hiện của APOC3 mARN được tính bằng công thức: mức biểu hiện của APOC3 mARN = (mức biểu hiện của APOC3 mARN ở nhóm thử nghiệm/mức biểu

hiện của β-actin m ARN ở nhóm thử nghiệm)/(mức biểu hiện của APOC3 mARN ở nhóm đối chứng/mức biểu hiện của β-actin mARN ở nhóm đối chứng) × 100%.

Tỷ lệ ức chế của thể tiếp hợp kháng lại sự biểu hiện của APOC3 mARN được tính bằng công thức: tỷ lệ ức chế = [1-(mức biểu hiện của APOC3 mARN ở nhóm thử nghiệm/mức biểu hiện của β-actin mARN ở nhóm thử nghiệm)/(mức biểu hiện của APOC3 mARN ở nhóm đối chứng/mức biểu hiện của β-actin mARN ở nhóm đối chứng) × 100%. Trong bản mô tả này, nhóm đối chứng là nhóm chuột nhắt đối chứng được cho sử dụng PBS ở thử nghiệm này và mỗi nhóm thử nghiệm là nhóm chuột nhắt được cho sử dụng các thể tiếp hợp siARN khác nhau, một cách tương ứng. Kết quả được thể hiện trên Fig. 44A.

Như có thể thấy từ kết quả trên Fig. 44A, thể tiếp hợp 144 thể hiện hoạt tính ức chế ưu việt sự biểu hiện của gen APOC3 người ở chuột nhắt chuyển gen *in vivo*.

Thể tiếp hợp thử nghiệm 9-2 - Thử nghiệm này minh họa tác dụng của thể tiếp hợp siARN của thể tiếp hợp 144 đến hàm lượng lipit trong máu *in vivo*.

Trong ví dụ thử nghiệm này, tác dụng của thể tiếp hợp siARN của thể tiếp hợp 144 đến hàm lượng của tổng cholesterol (CHO) và triglyxerit (TG) trong huyết thanh ở chuột nhắt chuyển gen APOC3 của người (B6; CBA-Tg(APOC3)3707Bres/J, mua từ Jackson Lab) *in vivo* được khảo sát.

Chuột nhắt chuyển gen APOC3 của người (6-8 tuần tuổi, hàm lượng TG > 2mmol/L) được chia ngẫu nhiên thành các nhóm (7 con chuột nhắt mỗi nhóm): (1) nhóm đối chứng NS; (2) nhóm 3 mg/kg đối với thể tiếp hợp của thể tiếp hợp 144; (3) nhóm 1 mg/kg đối với thể tiếp hợp của thể tiếp hợp 144. Các liều lượng thuốc cho tất cả các động vật được tính theo trọng lượng cơ thể. Một liều đơn được sử dụng dưới da, một cách tương ứng như 0,6 mg/ml và 0,2 mg/ml của dung dịch NaCl nước 0,9% khối lượng với thể tích là 5 ml/kg đối với thể tiếp hợp siARN.

Máu (khoảng 100 μL) được lấy từ hốc mắt trước khi sử dụng (ghi lại là ngày 0) và tại ngày 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 63, 77, 91, 112, 133, 147, 154, 161, 175 và 189 sau khi sử dụng một cách tương ứng và ly tâm để thu được huyết thanh. Hàm lượng của tổng cholesterol (CHO) và triglyxerit (TG) trong huyết thanh còn đo được bằng cách sử dụng

máy phân tích sinh hóa huyết thanh hoàn toàn tự động PM1P000/3 (SABA, Italia). Kết quả của lipit trong máu được chuẩn hóa và nồng độ lipit trong máu được chuẩn hóa cũng như tỷ lệ ức chế đối với hàm lượng lipit trong máu là theo ví dụ thử nghiệm 8-3. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 44B và Fig. 44C.

Như có thể thấy từ Fig. 44B và Fig. 44C, thể tiếp hợp 144 thể hiện tác dụng điều hòa giảm đáng kể đối với hàm lượng của mức TG và CHO trong huyết thanh chuột lên đến 189 ngày, biểu thị sự ức chế trong thời gian dài, ổn định và hiệu quả kháng lại sự biểu hiện của gen APOC3 người.

Trong các thử nghiệm khác, phương pháp giống như trên được sử dụng, ngoại trừ thể tiếp hợp 170 được sử dụng, mỗi loại ở liều lượng 0,1, 0,3, 1, 3 và 9 mg/kg (với cùng thể tích liều lượng và nồng độ của thể tiếp hợp trong dung dịch được điều chỉnh một cách tương ứng); và dữ liệu được thu thập cho đến ngày 112 sau khi sử dụng. Kết quả được thể hiện trên Fig. 45A và Fig. 45B.

Như có thể thấy từ kết quả trên Fig. 45A và Fig. 45B, có thể thấy rằng thể tiếp hợp 170 có thể làm giảm liên tục lipit trong máu và mức ANGPTL3 mARN ở chuột nhắt chuyển gen *in vivo* lên đến 112 ngày, và sự giảm này thể hiện tính phụ thuộc liều đáng kể.

Trong các thử nghiệm khác, phương pháp giống như trên được sử dụng để đo hàm lượng của tổng cholesterol (CHO) và triglyxerit (TG) trong huyết thanh của chuột nhắt, ngoại trừ thể tiếp hợp 144, 170 và 171 giống như thể tiếp hợp so sánh 17 được sử dụng, mỗi loại ở liều lượng 1mg/kg và 3 mg/kg (cùng thể tích liều lượng và nồng độ của thể tiếp hợp trong dung dịch được điều chỉnh một cách tương ứng); và dữ liệu được thu thập cho đến ngày 112 sau khi sử dụng. Kết quả được thể hiện trên Fig. 46A- Fig. 46D.

Như có thể thấy từ kết quả trên Fig. 46A- Fig. 46D, có thể thấy rằng thể tiếp hợp 144, 170 và 171 thể hiện sự giảm liên tục về lipit trong máu ở chuột nhắt chuyển gen trong thời gian lên đến 112 ngày, và tác dụng làm giảm kéo dài này nhìn chung là tốt hơn so với thể tiếp hợp so sánh 17.

Các phương án của sáng chế được mô tả chi tiết ở trên, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở chi tiết cụ thể của các phương án được mô tả ở trên. Các biến đổi đơn giản

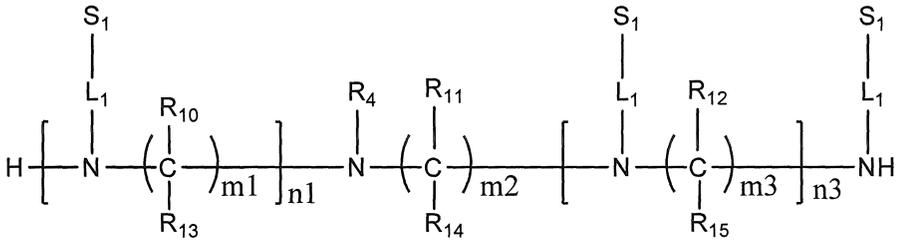
khác nhau của giải pháp kỹ thuật theo sáng chế có thể được thực hiện trong phạm vi của ngữ cảnh kỹ thuật của sáng chế, và các biến đổi đơn giản này nằm trong phạm vi của sáng chế.

Cần lưu ý rằng mỗi dấu hiệu kỹ thuật cụ thể được mô tả theo các phương án trên có thể được kết hợp theo cách thích hợp bất kỳ miễn là không gây ra mâu thuẫn. Để tránh sự lặp lại không cần thiết, các cách kết hợp có thể có khác nhau không được mô tả trong sáng chế nữa.

Ngoài ra, các phương án khác nhau khác của sáng chế cũng có thể được tiến hành trong tổ hợp bất kỳ miễn là nó không chống lại ý tưởng của sáng chế, cũng nên được coi là phần mô tả của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có cấu trúc được thể hiện bằng công thức (321):



Công thức (321)

trong đó,

n1 là số nguyên nằm trong khoảng 1-2, n3 là số nguyên nằm trong khoảng 0-1, và n1+n3=2-3;

mỗi trong số m1, m2, và m3 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng 2-10;

mỗi trong số R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} độc lập được chọn từ H, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} haloalkyl, và C_1-C_{10} alkoxy;

R_4 là gốc có khả năng liên kết với thuốc có hoạt tính hoặc hoạt chất qua liên kết cộng hóa trị;

mỗi L_1 là alkylen mạch thẳng có độ dài từ 1 đến 70 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ trong số các nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, $S(O)_2$, C_2-C_{10} alkenylen, C_2-C_{10} alkynylen, C_6-C_{10} arylen, C_3-C_{18} heteroxyclylen, và C_5-C_{10} heteroarylen, và trong đó L_1 tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ trong số các nhóm bao gồm: C_1-C_{10} alkyl, C_6-C_{10} aryl, C_5-C_{10} heteroaryl, C_1-C_{10} haloalkyl, -OC_1-C_{10} alkyl, -OC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-OH, -OC_1-C_{10} haloalkyl, -SC_1-C_{10} alkyl, -SC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-SH, -SC_1-C_{10} haloalkyl, halo, -OH, -SH, $-NH_2$, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2, -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -NH(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkylphenyl), -NH(C_1-C_{10} alkylphenyl), xyano, nitro, $-CO_2H$, -C(O)OC_1-C_{10} alkyl, -CON(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -CONH(C_1-C_{10} alkyl), $-CONH_2$, -NHC(O)(C_1-C_{10} alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C_1-C_{10} alkyl, -C(O)C_1-C_{10} alkylphenyl, -C(O)C_1-

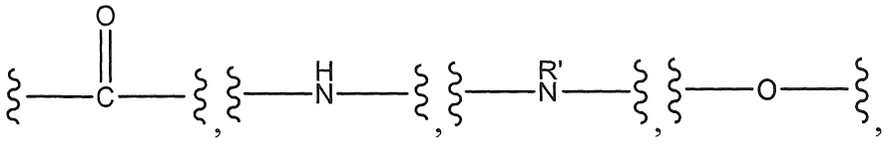
C_{10} haloalkyl, -OC(O)C_1-C_{10} alkyl, -SO_2(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2(phenyl), -SO_2(C_1-C_{10} haloalkyl), -SO_2NH_2, -SO_2NH(C_1-C_{10} alkyl), -SO_2NH(phenyl), -$NHSO_2$(C_1-C_{10} alkyl), -$NHSO_2$(phenyl), và -$NHSO_2$(C_1-C_{10} haloalkyl);

mỗi S_1 độc lập là M_1, trong đó hydroxyl có hoạt tính bất kỳ, nếu có, được bảo vệ bằng nhóm bảo vệ hydroxyl;

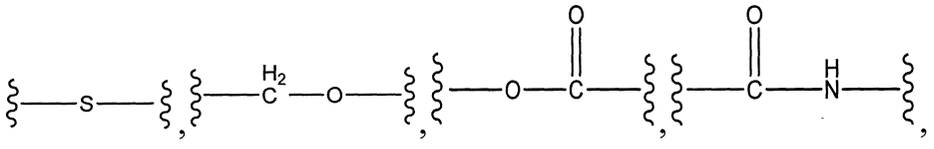
mỗi M_1 độc lập được chọn từ phối tử có khả năng liên kết với thụ thể bề mặt tế bào; và

trong đó thụ thể này là thụ thể asialoglycoprotein ở tế bào gan của người.

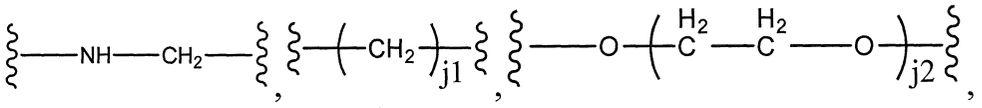
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó mỗi L_1 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm các nhóm A1-A26 và tổ hợp bất kỳ của chúng:



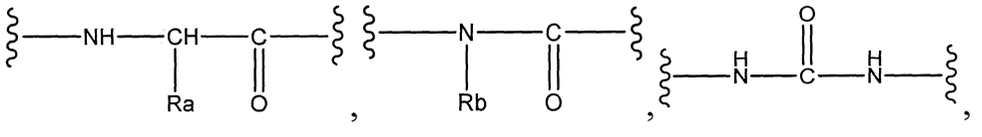
(A1) (A2) (A3) (A4)



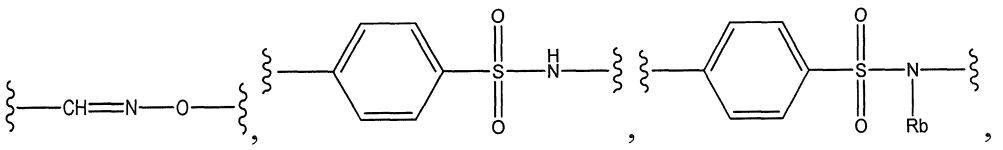
(A5) (A6) (A7) (A8)



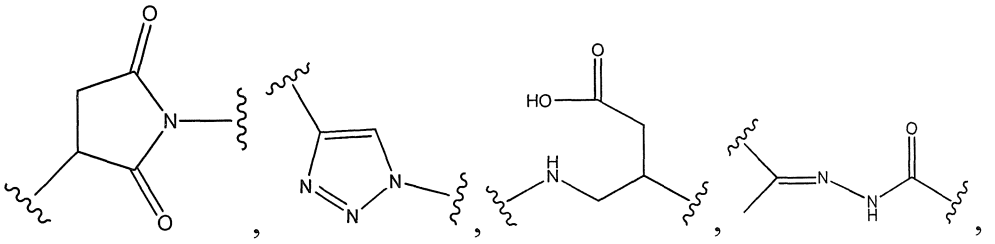
(A9) (A10) (A11)



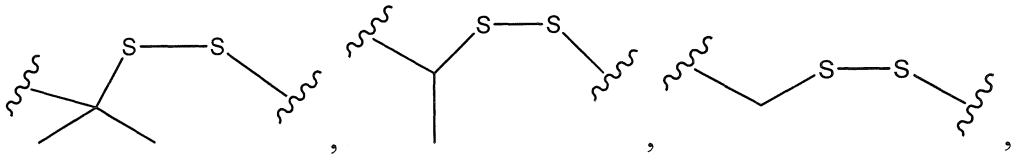
(A12) (A13) (A14)



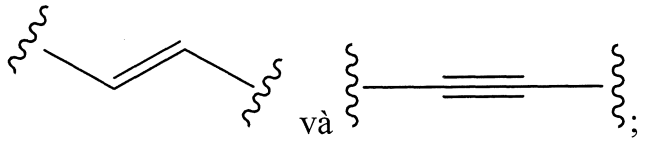
(A15) (A16) (A17)



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



(A22) (A23) (A24)



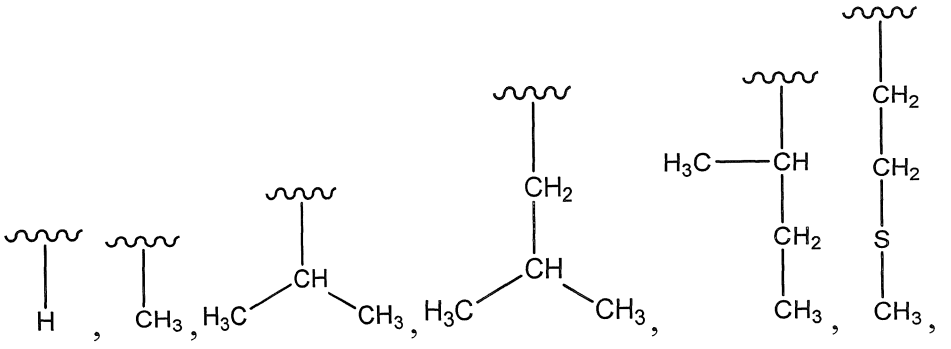
(A25) (A26)

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

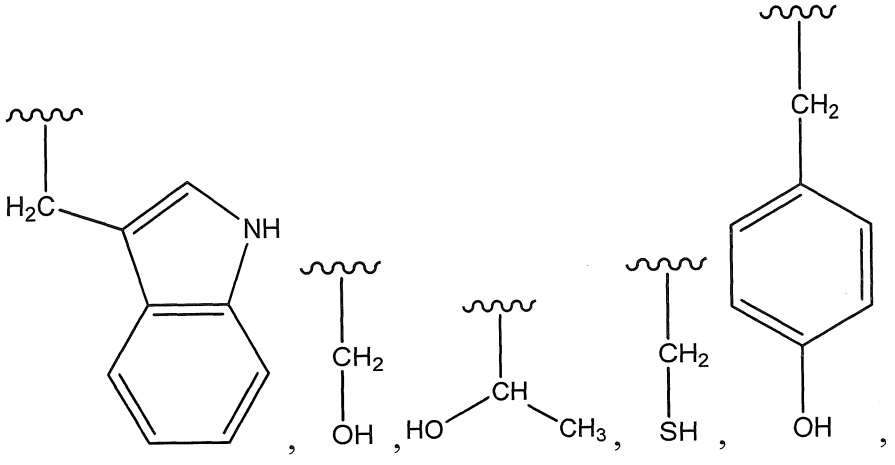
mỗi j2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng 1-20;

mỗi R' độc lập là C_1-C_{10} alkyl;

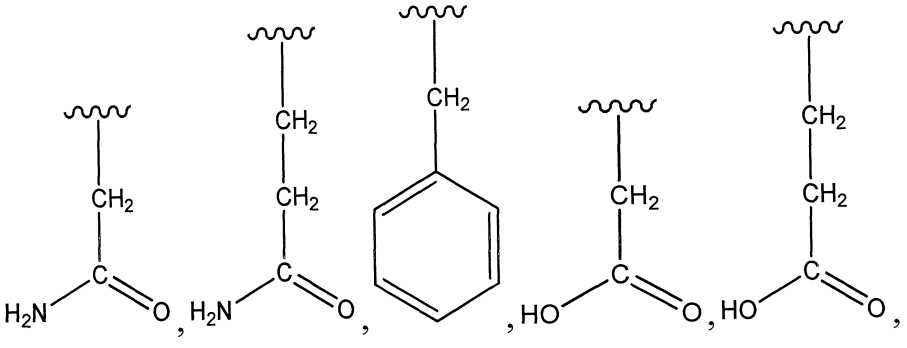
mỗi Ra độc lập được chọn từ nhóm bao gồm A27-A45 và tổ hợp bất kỳ của chúng:



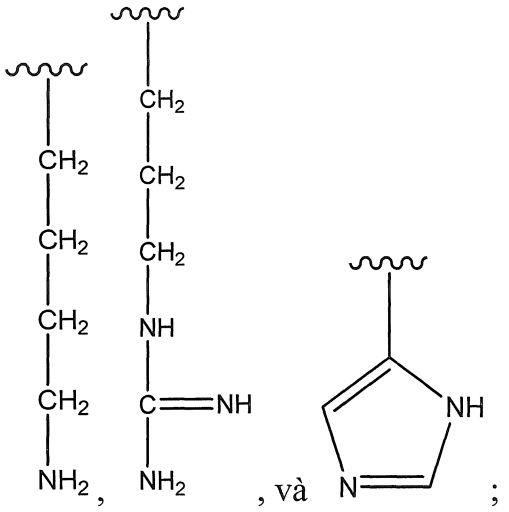
(A27) (A28) (A29) (A30) (A31) (A32)



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



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



(A43) (A44) (A45)

mỗi Rb độc lập là C_1-C_{10} alkyl; và

~~~ là vị trí mà ở đó một nhóm được gắn vào phần còn lại của phân tử.

3. Hợp chất theo điểm 2, trong đó L_1 được chọn từ nhóm bao gồm các nhóm A1, A4, A5, A6, A8, A10, A11, A13, và các tổ hợp liên kết của chúng.

4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó độ dài của L_1 nằm trong khoảng từ 3 đến 25 nguyên tử, trong đó độ dài của L_1 dùng để chỉ số nguyên tử tạo mạch ở L_1 trong mạch nguyên tử dài nhất tạo ra từ nguyên tử liên kết với nguyên tử N trên khung chính nitơ đến nguyên tử liên kết với S_1.

5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó mỗi trong số m1, m2 và m3 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng 2-5, hoặc m1= m2 = m3.

6. Hợp chất theo điểm 1, trong đó mỗi M_1 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm D-mannopyranoza, L-mannopyranoza, D-arabinoza, D-xylofuranoza, L-xylofuranoza, D-glucoza, L-glucoza, D-galactoza, L-galactoza, α-D-mannofuranoza, β-D-mannofuranoza, α-D-mannopyranoza, β-D-mannopyranoza, α-D-glucopyranoza, β-D-glucopyranoza, α-D-glucofuranoza, β-D-glucofuranoza, α-D-fructofuranoza, α-D-fructopyranoza, α-D-galactopyranoza, β-D-galactopyranoza, α-D-galactofuranoza, β-D-galactofuranoza, glucosamin, axit sialic, galactosamin, N-axetylgalactosamin, N-trifloaxetylgalactosamin, N-propionylgalactosamin, N-n-butyrylgalactosamin, N-isobutyrylgalactosamin, 2-amino-3-O-[(R)-1-carboxyetyl]-2-deoxy-β-D-
~~~

glucopyranoza, 2-deoxy-2-metylamino-L-glucopyranoza, 4,6-dideoxy-4-formamido-2,3-di-O-metyl-D-mannopyranoza, 2-deoxy-2-sulfoamino-D-glucopyranoza, axit N-glycolyl-α-neuraminic, 5-thio-β-D-glucopyranoza, metyl 2,3,4-tris-O-axetyl-1-thio-6-O-trityl-α-D-glucopyranosit, 4-thio-β-D-galactopyranoza, etyl 3,4,6,7-tetra-O-axetyl-2-deoxy-1,5-dithio-α-D-glucoheptopyranosit, 2,5-anhydro-D-allononitril, riboza, D-riboza, D-4-thioriboza, L-riboza, và L-4-thioriboza.

7. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R_4 là nhóm có khả năng liên kết với oligonucleotit qua liên kết phosphodieste.

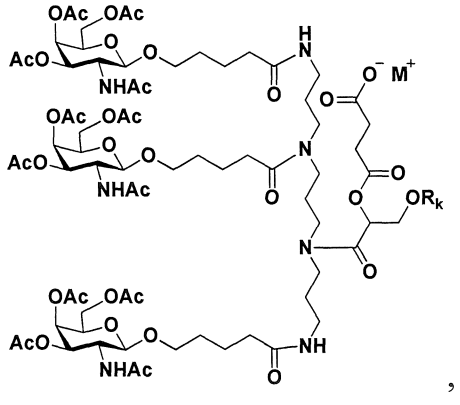
8. Hợp chất theo điểm 1, trong đó R_4 chứa nhóm chức thứ nhất mà có thể phản ứng với nhóm trên oligonucleotit hoặc nucleotit để tạo thành liên kết phosphat este.

9. Hợp chất theo điểm 8, trong đó R_4 còn chứa nhóm chức thứ hai mà có khả năng tạo thành liên kết cộng hóa trị với nhóm hydroxy hoặc nhóm amino, hoặc là giá đỡ pha rắn được gắn vào phần còn lại của phân tử qua liên kết cộng hóa trị tạo thành với nhóm hydroxy hoặc nhóm amino

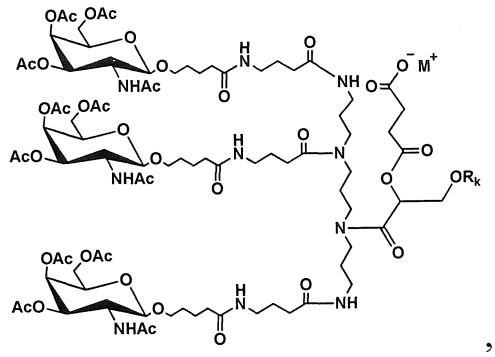
10. Hợp chất theo điểm 8, trong đó nhóm chức thứ nhất là phosphoramidit, hydroxy hoặc hydroxyl được bảo vệ.

11. Hợp chất theo điểm 9, trong đó nhóm chức thứ hai là nhóm phosphoramidit, carboxyl hoặc carboxylat.

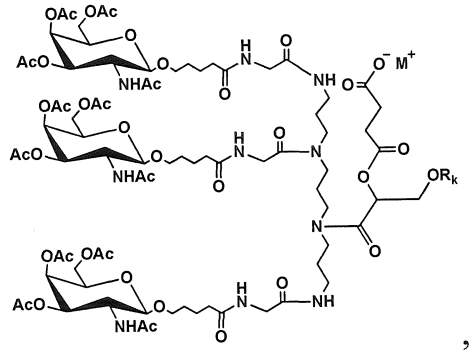
12. Hợp chất theo điểm 8, trong đó hợp chất này có cấu trúc được thể hiện bằng công thức (403)-(442):



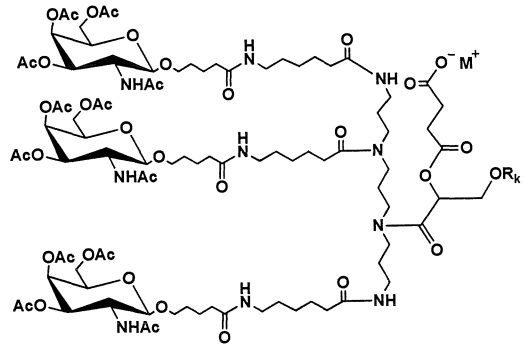
(403)



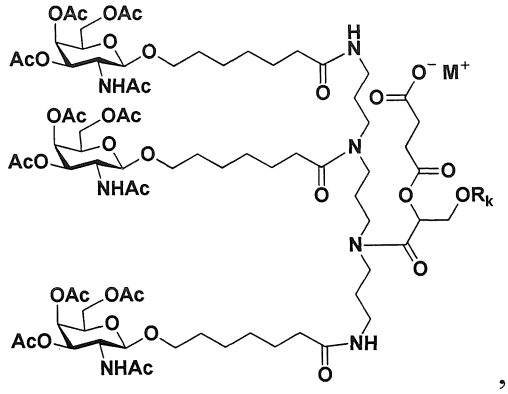
(404)



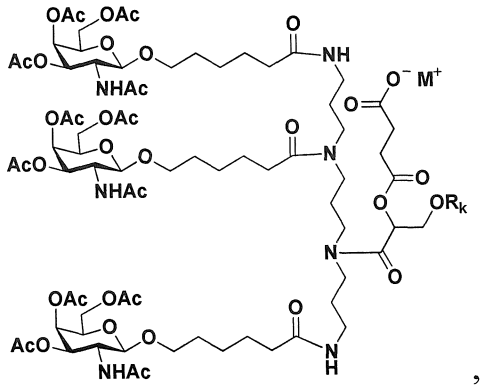
(405)



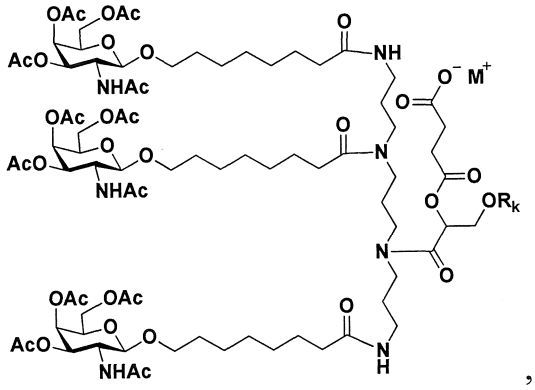
(406)



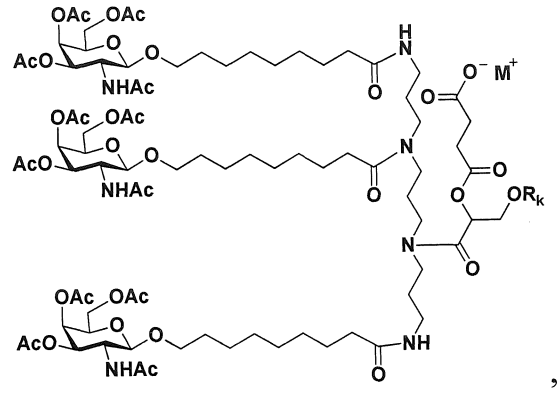
(407)



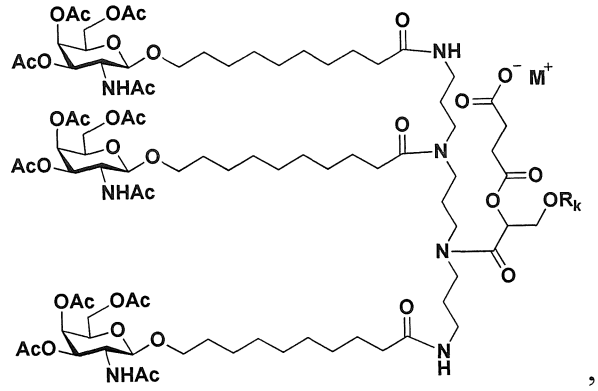
(408)



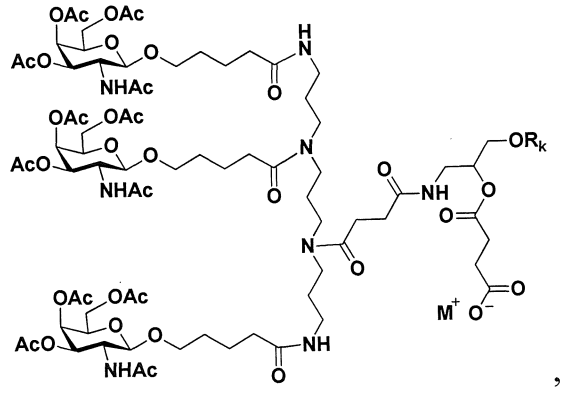
(409)



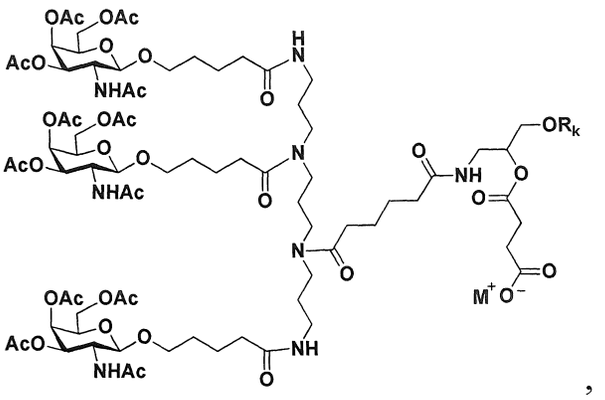
(410)



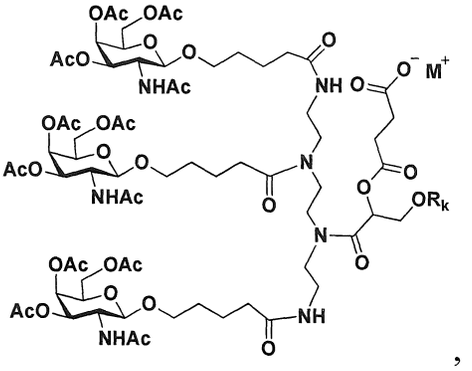
(411)



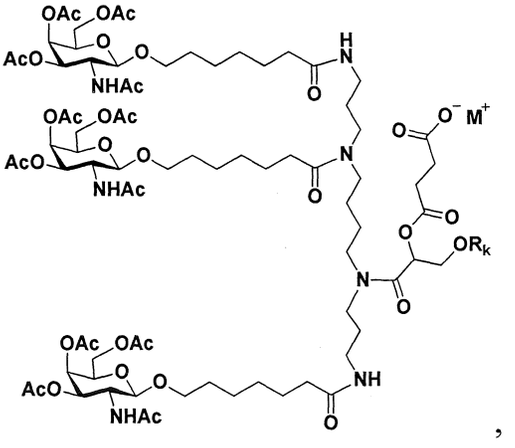
(412)



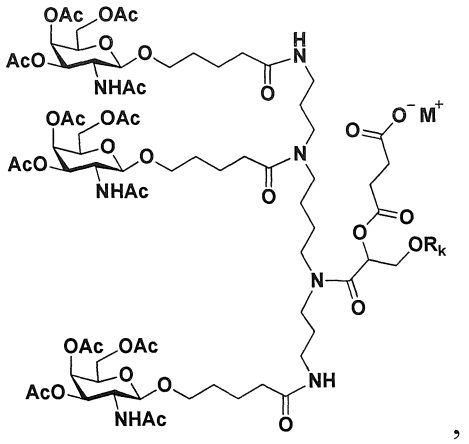
(413)



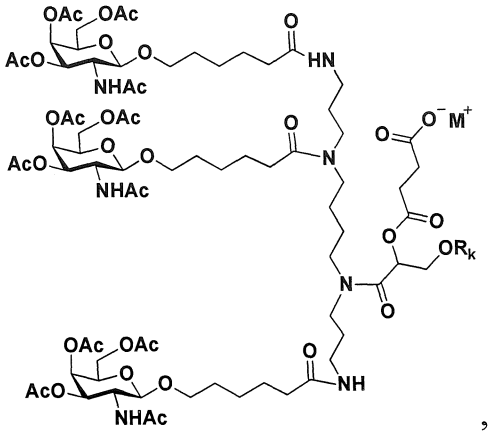
(414)



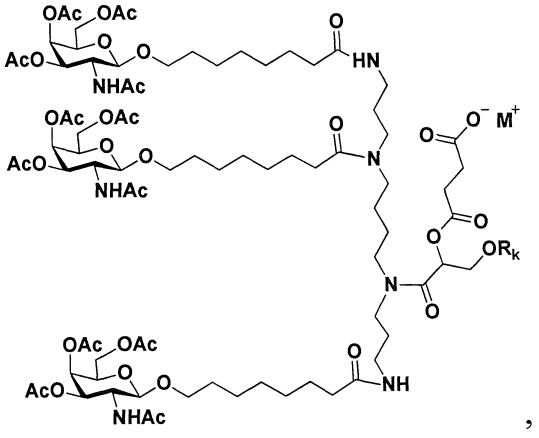
(415)



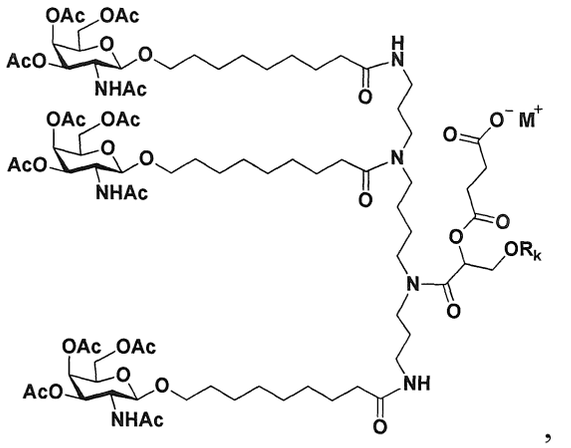
(416)



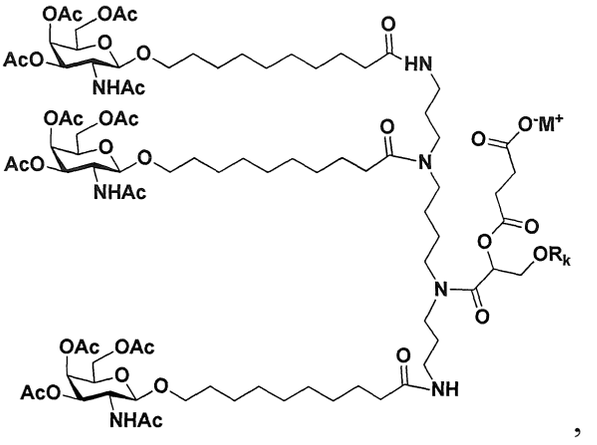
(417)



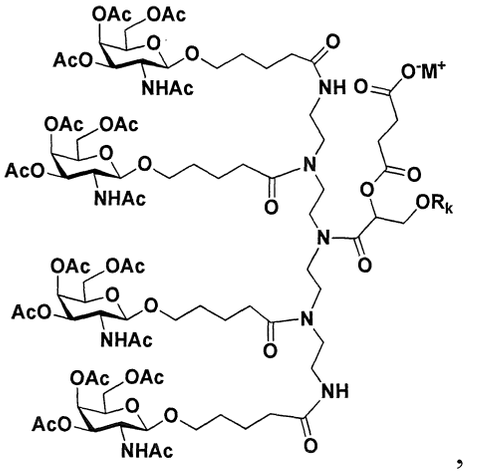
(418)



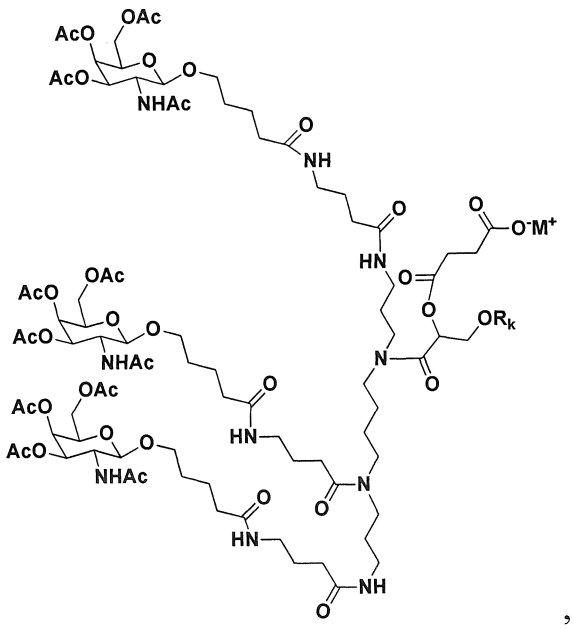
(419)



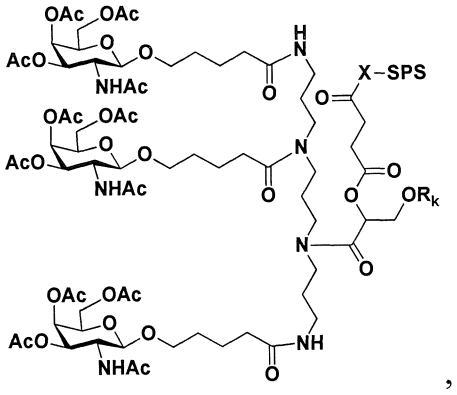
(420)



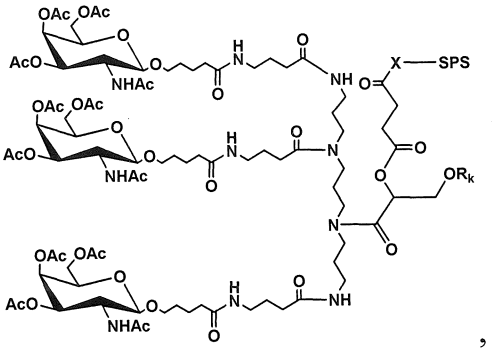
(421)



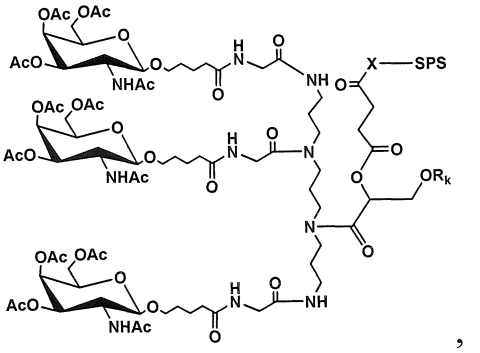
(422)



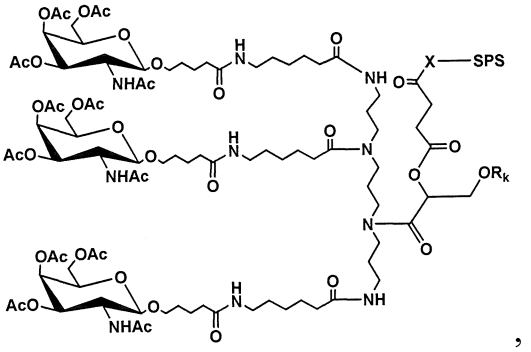
(423)



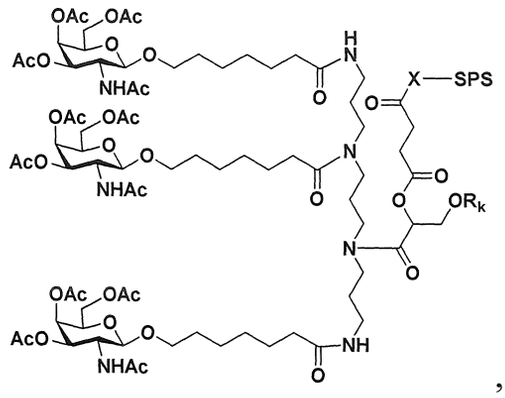
(424)



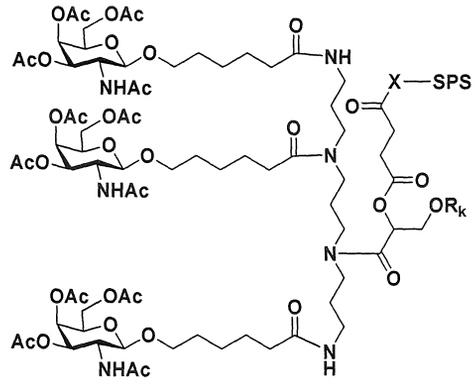
(425)



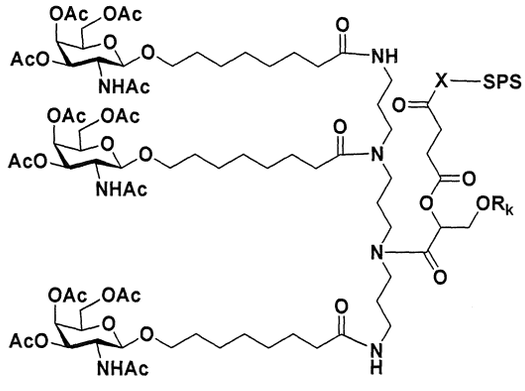
(426)



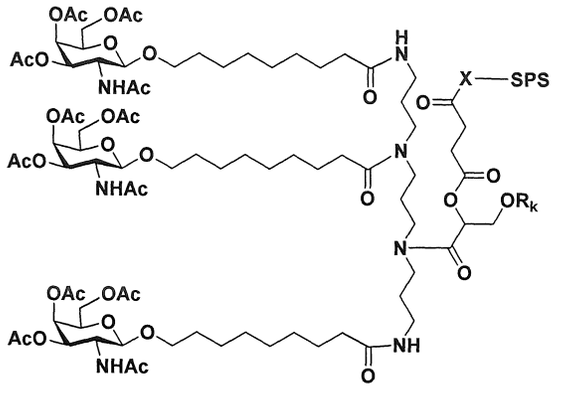
(427)



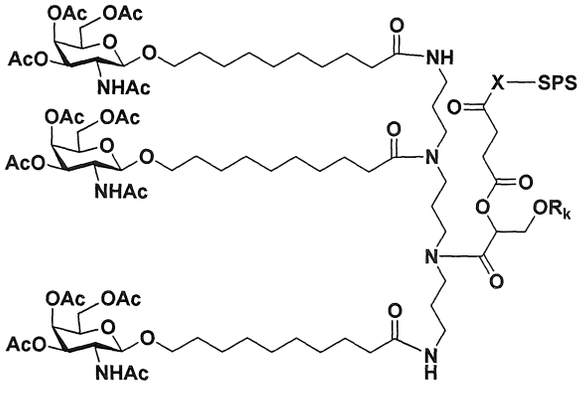
(428)



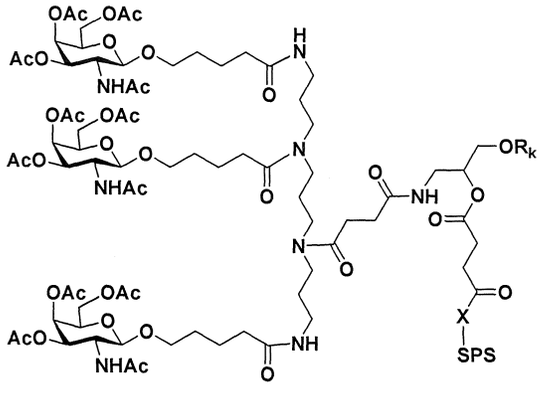
(429)



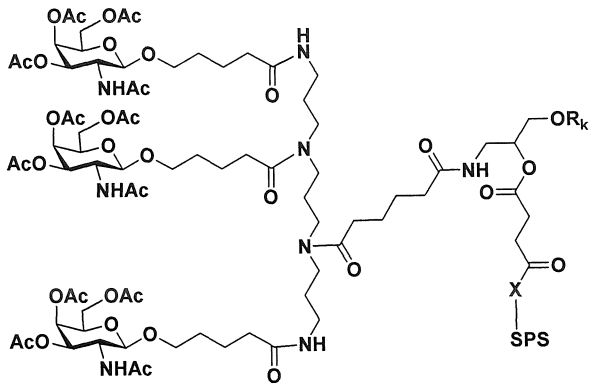
(430)



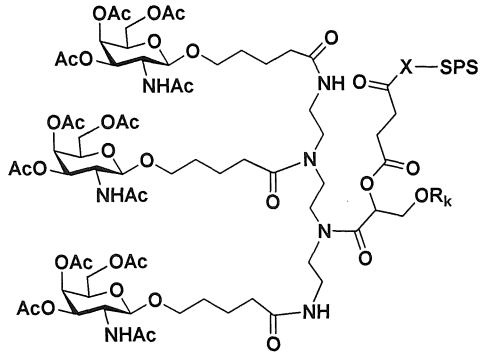
(431)



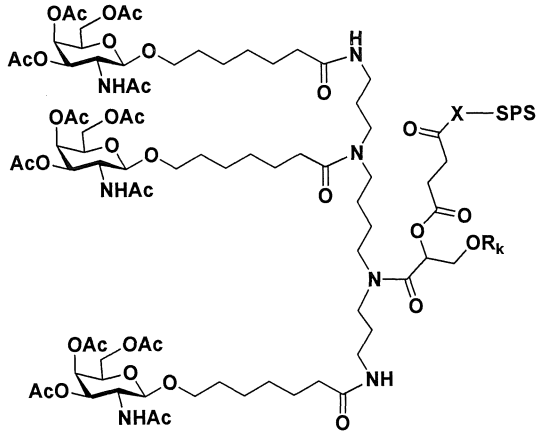
(432)



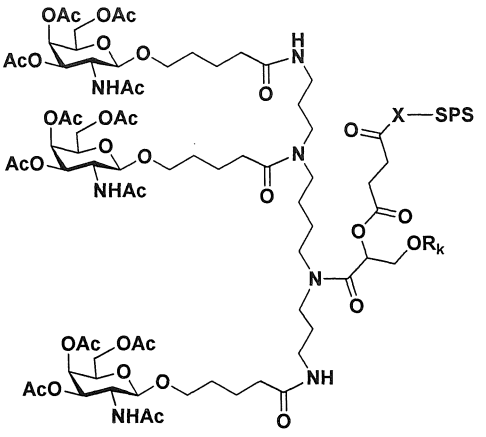
(433)



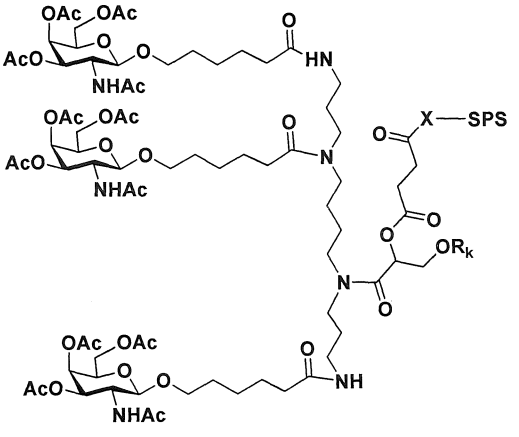
(434)



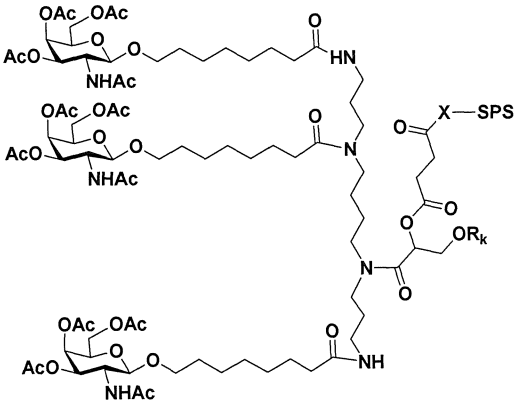
(435)



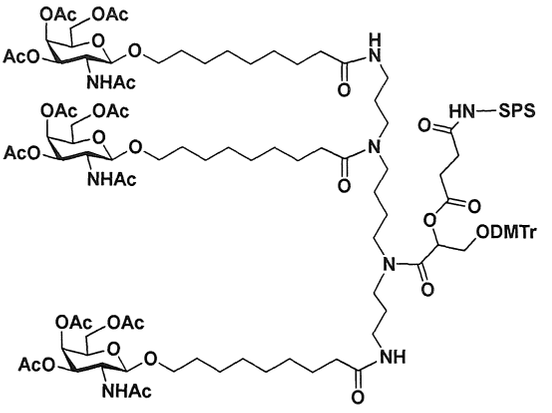
(436)



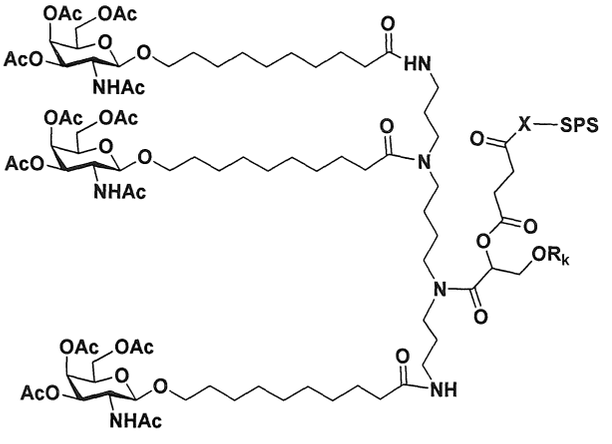
(437)



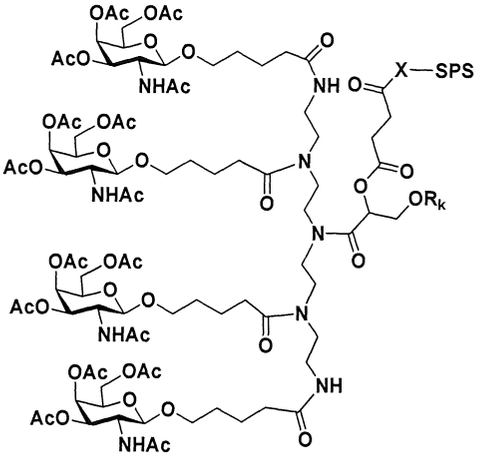
(438)


OAc OAc
AcO
NHAc
HN—SPS
ODMTr
NH

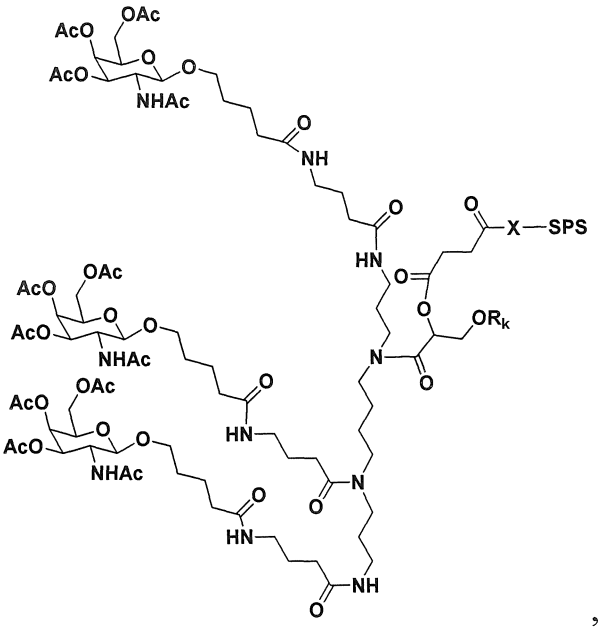
(439)


OAc OAc
AcO
NHAc
HN
X—SPS
ORk
NH

(440)


OAc OAc
AcO
NHAc
NH
X—SPS
ORk

(441)

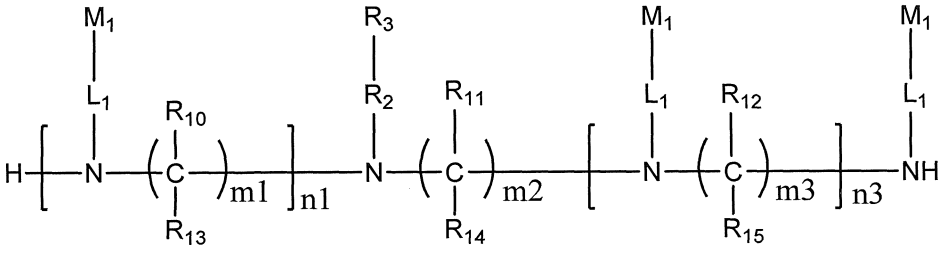


(442)

trong đó X là O hoặc NH, M^+ là cation, R_k là nhóm bảo vệ hydroxy, SPS là giá đỡ pha rắn.

13. Hợp chất theo điểm 12, trong đó M^+ là cation kim loại kiềm, cation amoni, cation tạo ra từ amin bậc ba, hoặc cation amoni bậc bốn, R_k là trityl, 4-metoxytrityl, 4,4'-dimetoxytrityl, hoặc 4,4',4''-trimetoxytrityl, và SPS là nhựa.

14. Thể tiếp hợp có cấu trúc được thể hiện bằng công thức (1):



Công thức (1),

trong đó,

n1 là số nguyên nằm trong khoảng 1-2, n3 là số nguyên nằm trong khoảng 0-1, và n1+n3=2-3;

mỗi trong số m1, m2, và m3 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng 2-10;

mỗi trong số R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14} và R_{15} độc lập được chọn từ H, C_1-C_{10} alkyl, C_1-C_{10} haloalkyl, và C_1-C_{10} alkoxy;

R_3 là thuốc có hoạt tính;

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

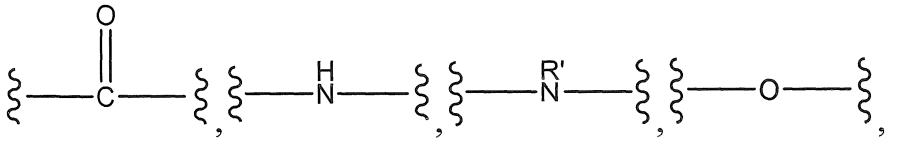
mỗi L_1 độc lập là alkylen mạch thẳng có độ dài từ 1 đến 70 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ trong số các nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, $S(O)_2$, C_2-C_{10} alkenylen, C_2-C_{10} alkynylen, C_6-C_{10} arylen, C_3-C_{18} heteroxyclylen, và C_5-C_{10} heteroarylen, và trong đó L_1 tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ trong số các nhóm bao gồm: C_1-C_{10} alkyl, C_6-C_{10} aryl, C_5-C_{10} heteroaryl, C_1-C_{10} haloalkyl, -OC_1-C_{10} alkyl, -OC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-OH, -OC_1-C_{10} haloalkyl, -SC_1-C_{10} alkyl, -SC_1-C_{10} alkylphenyl, -C_1-C_{10} alkyl-SH, -SC_1-C_{10} haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH_2, -C_1-C_{10} alkyl-NH_2, -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -NH(C_1-C_{10} alkyl), -N(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkylphenyl), -NH(C_1-C_{10} alkylphenyl), xyano, nitro, -CO_2H, -C(O)OC_1-C_{10} alkyl, -CON(C_1-C_{10} alkyl)(C_1-C_{10} alkyl), -CONH(C_1-C_{10} alkyl), -$CONH_2$, -NHC(O)(C_1-

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

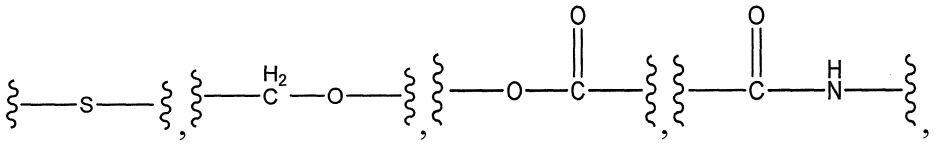
mỗi M_1 được chọn từ một trong các phối tử có khả năng liên kết với thụ thể bề mặt tế bào; và

trong đó thụ thể này là thụ thể asialoglycoprotein ở tế bào gan của người.

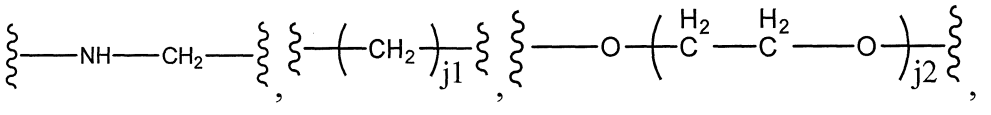
15. Thể tiếp hợp theo điểm 14, trong đó mỗi L_1 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm các nhóm A1-A26 và tổ hợp bất kỳ của chúng:



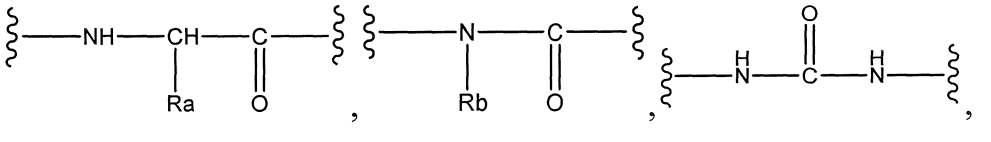
(A1) (A2) (A3) (A4)



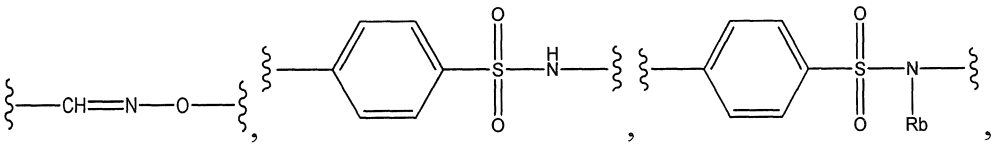
(A5) (A6) (A7) (A8)



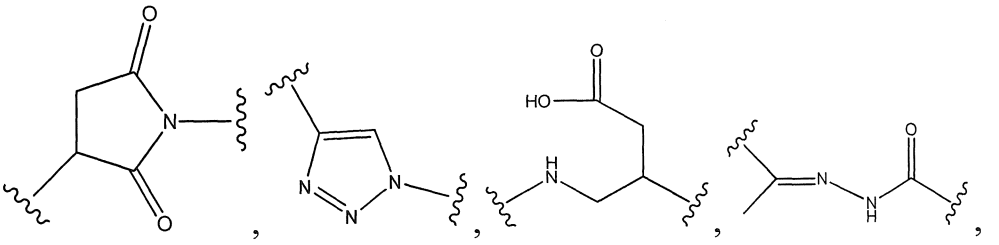
(A9) (A10) (A11)



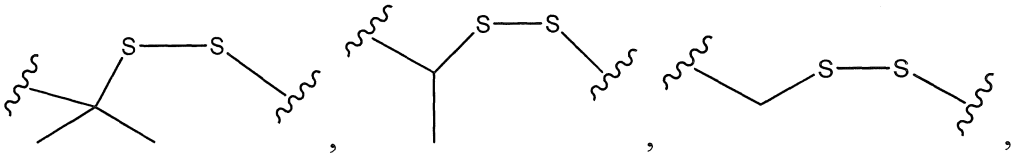
(A12) (A13) (A14)



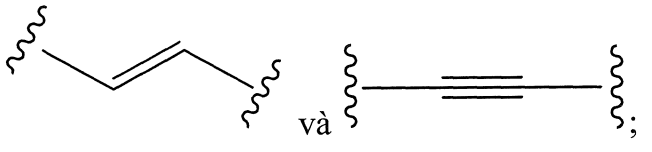
(A15) (A16) (A17)



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



(A22) (A23) (A24)



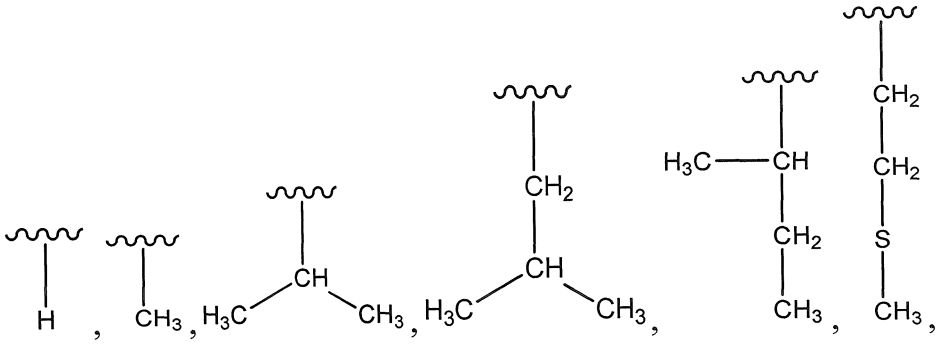
(A25) (A26)

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

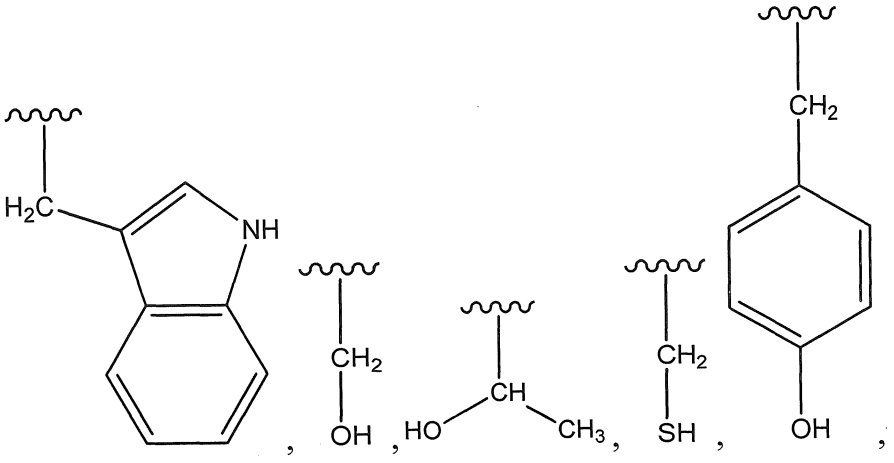
mỗi j2 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng 1-20;

mỗi R' độc lập là C_1-C_{10} alkyl;

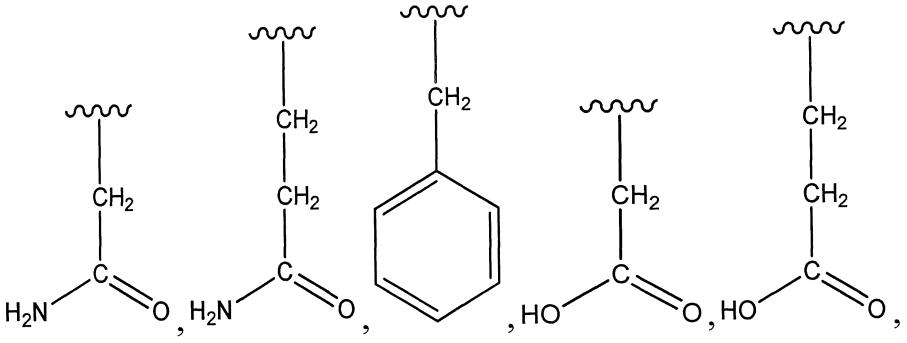
mỗi Ra độc lập được chọn từ nhóm bao gồm A27-A45 và tổ hợp bất kỳ của chúng:



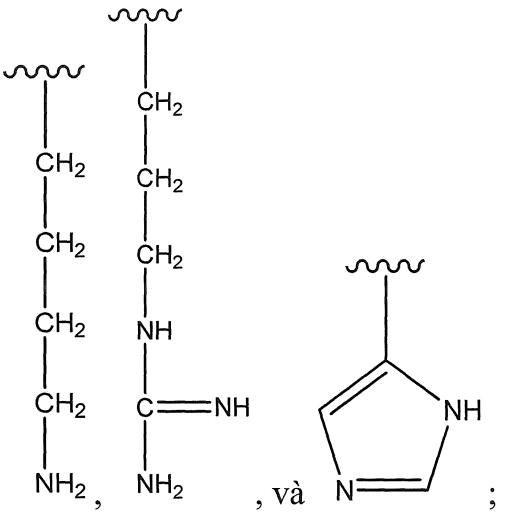
(A27) (A28) (A29) (A30) (A31) (A32)



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



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



(A43) (A44) (A45)

mỗi Rb độc lập là C_1-C_{10} alkyl; và

 là vị trí mà ở đó một nhóm được gắn vào phần còn lại của phân tử.

16. Thể tiếp hợp theo điểm 15, trong đó L_1 được chọn từ nhóm bao gồm các nhóm A1, A4, A5, A6, A8, A10, A11, A13, và các tổ hợp liên kết của chúng.

17. Thể tiếp hợp theo điểm 14, trong đó độ dài của L_1 là nằm trong khoảng từ 3 đến 25 nguyên tử.

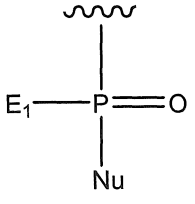
18. Thể tiếp hợp theo điểm 14, trong đó mỗi trong số m1, m2 và m3 độc lập là số nguyên nằm trong khoảng 2-5; hoặc m1= m2 = m3.

19. Thể tiếp hợp theo điểm 14, trong đó mỗi M_1 độc lập là monosacarit, disacarit, trisacarit, hoặc polysacarit.

20. Thể tiếp hợp theo điểm 14, trong đó mỗi M_1 độc lập được chọn từ nhóm bao gồm D-mannopyranoza, L-mannopyranoza, D-arabinoza, D-xylofuranoza, L-xylofuranoza, D-glucoza, L-glucoza, D-galactoza, L-galactoza, α-D-mannofuranoza, β-D-mannofuranoza, α-D-mannopyranoza, β-D-mannopyranoza, α-D-glucopyranoza, β-D-glucopyranoza, α-D-glucofuranoza, β-D-glucofuranoza, α-D-fructofuranoza, α-D-fructopyranoza, α-D-galactopyranoza, β-D-galactopyranoza, α-D-galactofuranoza, β-D-galactofuranoza, glucosamin, axit sialic, galactosamin, N-axetylgalactosamin, N-trifloaxetylgalactosamin, N-propionylgalactosamin, N-n-butyrylgalactosamin, N-isobutyrylgalactosamin, 2-amino-3-O-[(R)-1-carboxyetyl]-2-deoxy-β-D-

glucopyranoza, 2-deoxy-2-metylamino-L-glucopyranoza, 4,6-dideoxy-4-formamido-2,3-di-O-metyl-D-mannopyranoza, 2-deoxy-2-sulfoamino-D-glucopyranoza, axit N-glycolyl-α-neuraminic, 5-thio-β-D-glucopyranoza, metyl 2,3,4-tris-O-axetyl-1-thio-6-O-trityl-α-D-glucopyranosit, 4-thio-β-D-galactopyranoza, etyl 3,4,6,7-tetra-O-axetyl-2-deoxy-1,5-dithio-α-D-glucoheptopyranosit, 2,5-anhydro-D-allononitril, riboza, D-riboza, D-4-thioriboza, L-riboza, và L-4-thioriboza.

21. Thể tiếp hợp theo điểm 14, trong đó R_3 là nhóm có cấu trúc được thể hiện bằng công thức A59:

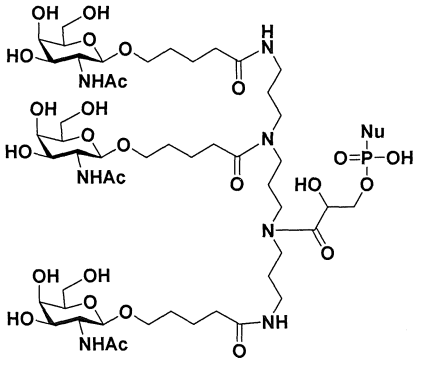


(A59)

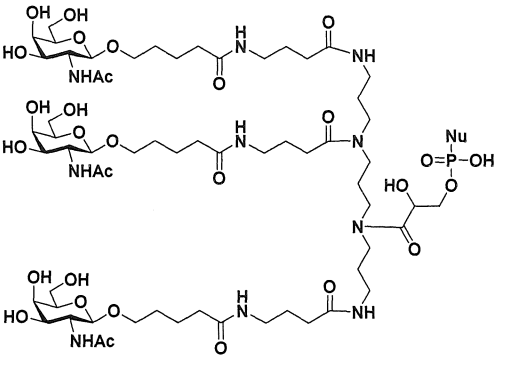
trong đó E_1 là OH, SH hoặc BH_2, và Nu là oligonucleotit chức.

22. Thể tiếp hợp theo điểm 21, trong đó R_2 tạo thành liên kết phosphoeste với nguyên tử P ở R_3.

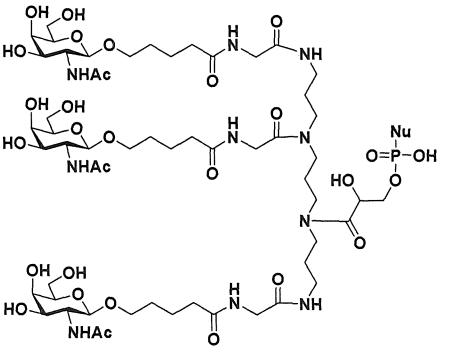
23. Thể tiếp hợp theo điểm 14, trong đó thể tiếp hợp này có cấu trúc được thể hiện bằng các công thức (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19), (20), (21), hoặc (22):



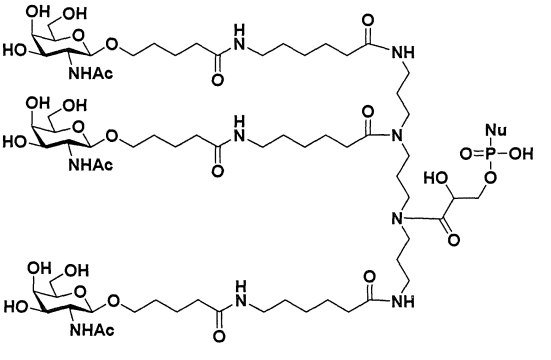
Công thức (3)



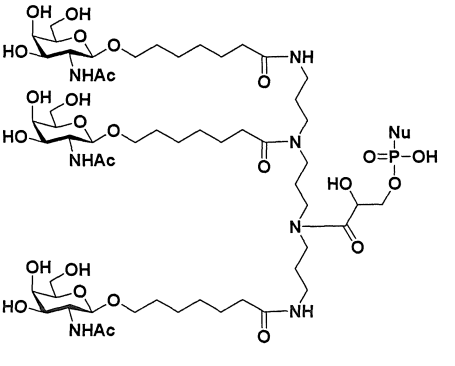
Công thức (4)



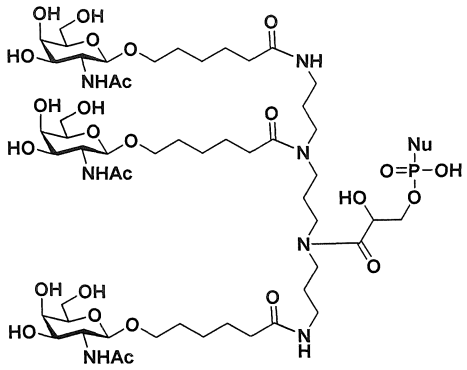
Công thức (5)



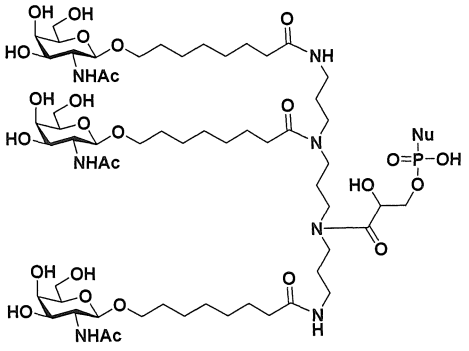
Công thức (6)



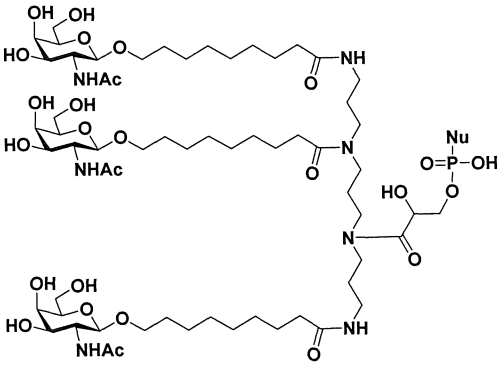
Công thức (7)



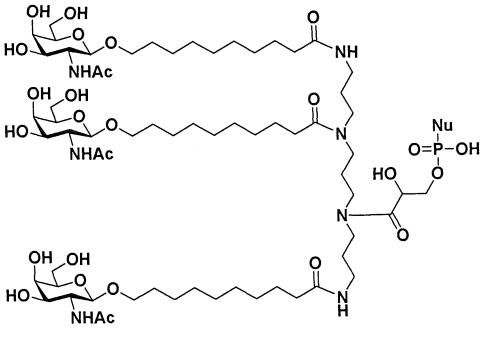
Công thức (8)



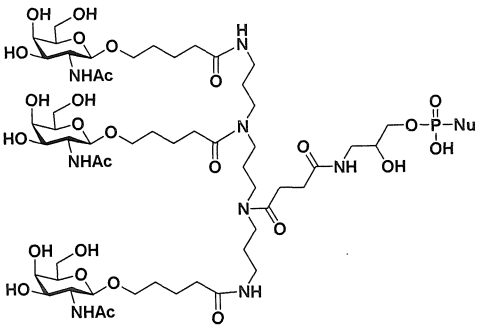
Công thức (9)



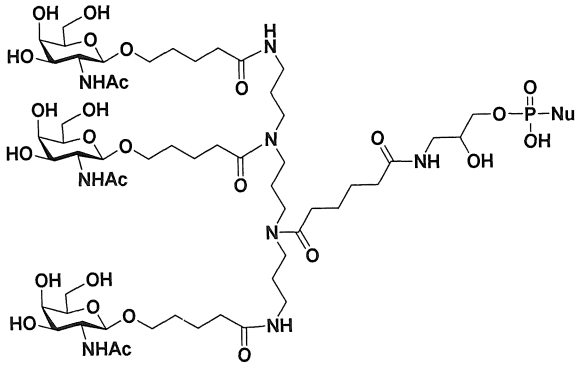
Công thức (10)



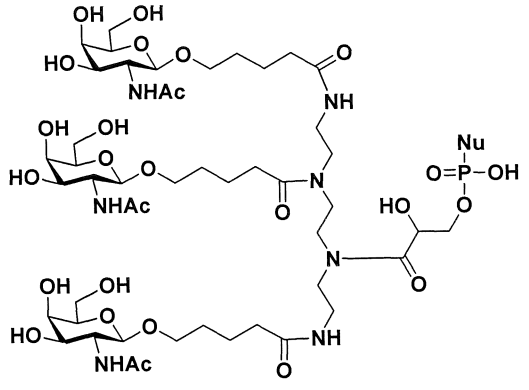
Công thức (11)



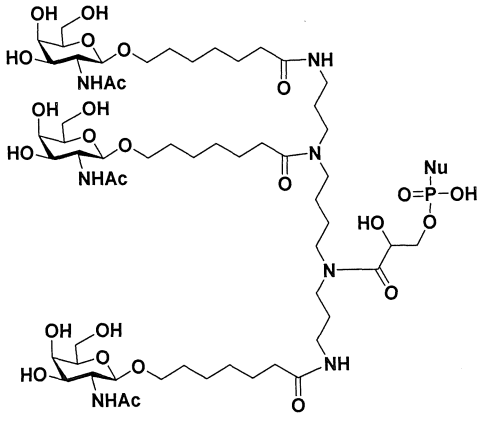
Công thức (12)



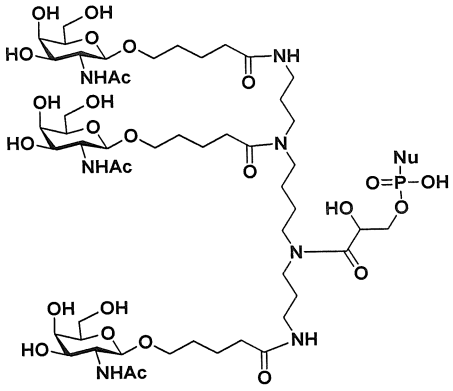
Công thức (13)



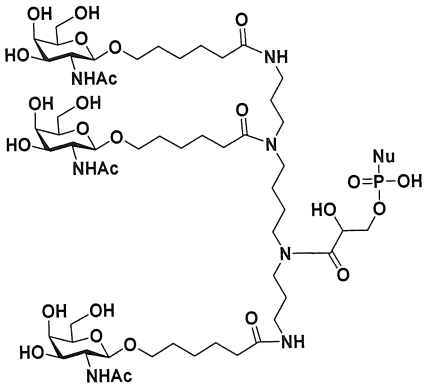
Công thức (14)



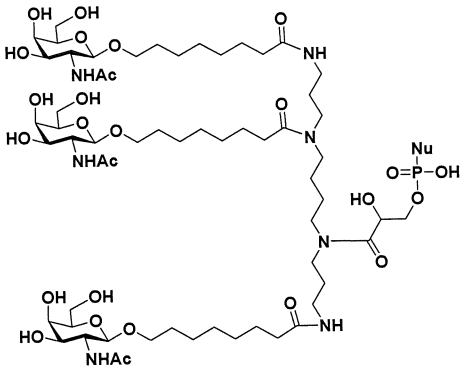
Công thức (15)



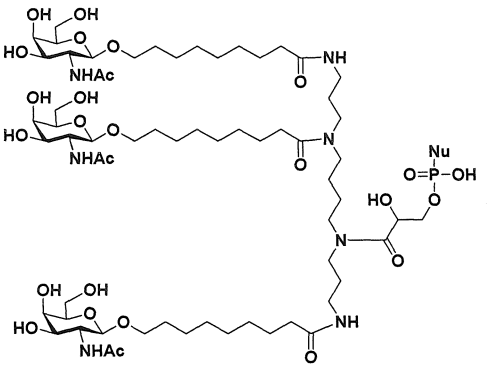
Công thức (16)



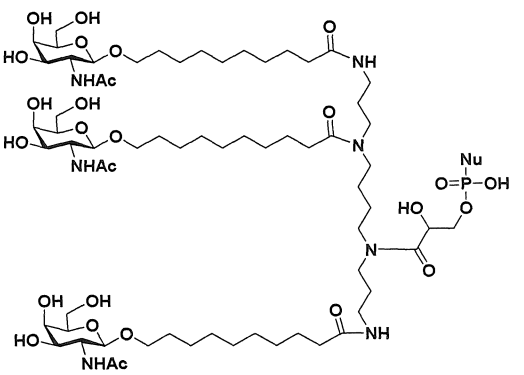
Công thức (17)



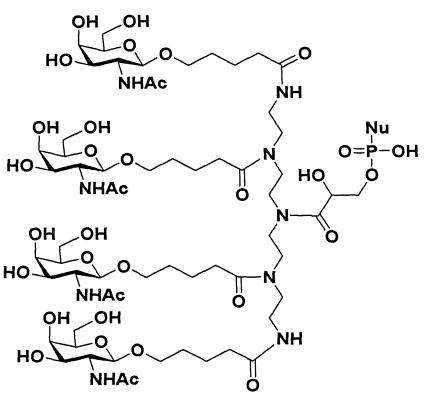
Công thức (18)



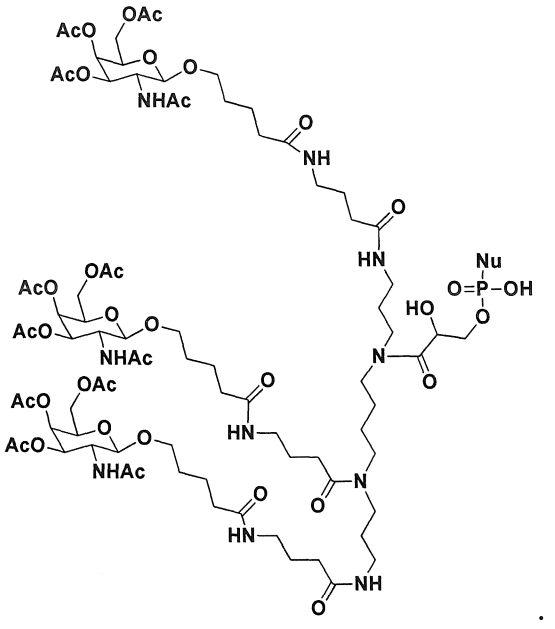
Công thức (19)



Công thức (20)



Công thức (21)



Công thức (22)

24. Thể tiếp hợp theo điểm 21, trong đó oligonucleotit chức được chọn từ nhóm bao gồm ARN can thiệp nhỏ, ARN siêu nhỏ, kháng ARN siêu nhỏ, chất đối kháng ARN siêu nhỏ, phân tử bắt chước ARN siêu nhỏ, oligonucleotit mồi, phân tử kích thích miễn dịch, bộ bốn G, biến đổi tách intron, ARN sợi đơn, axit nucleic đối nghĩa, aptame axit nucleic, ARN vòng-gốc, mảnh mARN, ARN hoạt hóa, hoặc ADN.

25. Thể tiếp hợp theo điểm 24, trong đó oligonucleotit chức là oligonucleotit sợi đơn, và nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với đầu tận 3' của oligonucleotit sợi đơn; hoặc

oligonucleotit chức là oligonucleotit sợi kép bao gồm sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa, và nguyên tử P trong công thức A59 được liên kết với vùng đầu tận 3' của sợi có nghĩa.

26. Thể tiếp hợp theo điểm 25, trong đó oligonucleotit sợi kép là siARN, và mỗi nucleotit trong siARN độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến; siARN này chứa sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa, trong đó sợi có nghĩa chứa trình tự nucleotit 1, và sợi đối nghĩa chứa trình tự nucleotit 2, cả hai trình tự này đều có độ dài là 19 nucleotit và bổ sung ngược ít nhất một phần để tạo thành vùng bổ sung sợi kép; trình tự nucleotit 2 bổ sung ít nhất một phần vào mảnh trình tự nucleotit thứ nhất mà

dùng để chỉ mảnh nucleotit trong mARN đích; và mARN đích dùng để chỉ mARN của gen được biểu hiện một cách bất thường trong tế bào gan.

27. Thể tiếp hợp theo điểm 26, trong đó mARN đích là mARN tương ứng với ApoB, ApoC, ANGPTL3, PCSK9, SCD1, TIMP-1, Col1A1, FVII, STAT3, p53, HBV hoặc HCV.

28. Thể tiếp hợp theo điểm 26, trong đó trình tự nucleotit 1 có cùng độ dài với mảnh trình tự nucleotit thứ nhất và khác không nhiều hơn 3 nucleotit với mảnh trình tự nucleotit thứ nhất; trình tự nucleotit 2 có cùng độ dài với trình tự nucleotit B và khác không nhiều hơn 3 nucleotit với trình tự nucleotit B, dùng để chỉ trình tự nucleotit bổ sung ngược hoàn toàn vào mảnh trình tự nucleotit thứ nhất.

29. Thể tiếp hợp theo điểm 28, trong đó sự khác biệt nucleotit giữa trình tự nucleotit 2 và trình tự nucleotit B bao gồm sự khác biệt tại vị trí của nucleotit thứ nhất Z' trên trình tự nucleotit 2 từ đầu 5' đến đầu 3'.

30. Thể tiếp hợp theo điểm 26, trong đó sợi có nghĩa còn chứa trình tự nucleotit 3, và sợi đối nghĩa còn chứa trình tự nucleotit 4; trình tự nucleotit 3 và trình tự nucleotit 4 này có độ dài giống nhau nằm trong khoảng 1-4 nucleotit; trình tự nucleotit 3 được liên kết với đầu 5' của trình tự nucleotit 1, và trình tự nucleotit 4 được liên kết với đầu 3' của trình tự nucleotit 2; trình tự nucleotit 4 bổ sung vào mảnh trình tự nucleotit thứ hai; mảnh trình tự nucleotit thứ hai này dùng để chỉ trình tự nucleotit liền kề với mảnh trình tự nucleotit thứ nhất ở mARN đích, và có độ dài giống như trình tự nucleotit 4; và trình tự nucleotit 3 hầu như là bổ sung ngược, hoặc bổ sung ngược hoàn toàn vào trình tự nucleotit 4.

31. Thể tiếp hợp theo điểm 26, trong đó siARN còn chứa trình tự nucleotit 5, có độ dài nằm trong khoảng 1-3 nucleotit và được liên kết với đầu 3' của sợi đối nghĩa, nhờ đó cấu thành phần nhô 3' của sợi đối nghĩa.

32. Thể tiếp hợp theo điểm 26, trong đó mỗi nucleotit trong sợi có nghĩa và đối nghĩa độc lập là nucleotit cải biến bằng flo hoặc nucleotit không cải biến bằng flo, nucleotit cải biến bằng flo dùng để chỉ nucleotit được tạo ra bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nó bằng nhóm flo; nucleotit không cải biến bằng flo dùng để chỉ nucleotit được tạo ra bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nó bằng nhóm khác với flo,

hoặc chất tương tự nucleotit, chất tương tự nucleotit này dùng để chỉ nhóm có khả năng thay thế nucleotit trong axit nucleic, trong khi có cấu trúc khác với loại bất kỳ trong số adenin ribonucleotit, guanin ribonucleotit, xytosin ribonucleotit, uraxil ribonucleotit hoặc thymin deoxyribonucleotit.

33. Thể tiếp hợp theo điểm 32, trong đó cả sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa đều chứa nucleotit cải biến bằng flo và không bằng flo, nucleotit cải biến bằng flo tồn tại trong trình tự nucleotit 1 và trình tự nucleotit 2, không nhiều hơn 5 nucleotit cải biến bằng flo tồn tại trong trình tự nucleotit 1, và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit ở các vị trí 7, 8 và 9 trong trình tự nucleotit 1 là nucleotit cải biến bằng flo; không nhiều hơn 7 nucleotit cải biến bằng flo tồn tại trong trình tự nucleotit 2, và theo hướng từ đầu tận 5' đến đầu tận 3', nucleotit ở các vị trí 2, 6, 14 và 16 trong trình tự nucleotit 2 là nucleotit cải biến bằng flo.

34. Thể tiếp hợp theo điểm 32, trong đó mỗi nucleotit không cải biến bằng flo là nucleotit cải biến bằng metoxy, trong đó nucleotit cải biến bằng metoxy này dùng để chỉ nucleotit được tạo ra bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nó bằng nhóm metoxy.

35. Thể tiếp hợp theo điểm 26, trong đó ở siARN, ít nhất một nhóm phosphat là nhóm phosphorothioat, và liên kết phosphorothioat tồn tại ở ít nhất một trong các vị trí sau đây:

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

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

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

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

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

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

giữa nucleotit thứ nhất và nucleotit thứ hai từ đầu 3’ của sợi đối nghĩa; và

giữa nucleotit thứ hai và nucleotit thứ ba từ đầu 3’ của sợi đối nghĩa.

36. Thể tiếp hợp theo điểm 26, trong đó nucleotit ở đầu 5' của sợi đối nghĩa là nucleotit 5'-phosphat hoặc nucleotit cải biến bằng chất tương tự 5'-phosphat.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Suzhou Ribo Life Science Co.,Ltd.

<120> HỢP CHẤT NHẮM ĐÍCH TẾ BÀO GAN VÀ THỂ TIẾP HỢP TƯƠNG ỨNG CỦA CHÚNG

<130> DP1P182407ZX

<150> CN201711479058.9
<151> 2017-12-29

<150> CN201811165363.5
<151> 2018-09-30

<160> 251

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBa1

<400> 1
ccuugaggca uacuucaaa
19

<210> 2
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa1

<400> 2
uuugaaguau gccucaaggu u
21

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

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBa2

<400> 3
gaccuugagg cauacuucaa a
21

<210> 4
<211> 23
<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa2

<400> 4
uuugaaguau gccucaaggu cgg
23

<210> 5
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBa1M1

<400> 5
ccuugaggca uacuucaaa
19

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa1M1

<400> 6
uuugaaguau gccucaaggu u
21

<210> 7
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBa1M2

<400> 7
ccuugaggca uacuucaaa
19

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa1M2

<400> 8
uuugaaguau gccucaaggu u
21

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

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBa2M1

<400> 9
gaccuugagg cauacuucaa a
21

<210> 10
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa2M1

<400> 10
uuugaaguau gccucaaggu cgg
23

<210> 11
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBa2M2

<400> 11
gaccuugagg cauacuucaa a
21

<210> 12
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa2M2

<400> 12
uuugaaguau gccucaaggu cgg
23

<210> 13
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự có nghĩa cho siHBa1M1S

<400> 13
ccuugaggca uacuucaaa
19

<210> 14
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa1M1S

<400> 14
uuugaaguau gccucaaggu u
21

<210> 15
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBa1M2S

<400> 15
ccuugaggca uacuucaaa
19

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa1M2S

<400> 16
uuugaaguau gccucaaggu u
21

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

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBa2M1S

<400> 17
gaccuugagg cauacuucaa a
21

<210> 18

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa2M1S

<400> 18
uuugaaguau gccucaaggu cgg
23

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

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBa2M2S

<400> 19
gaccuugagg cauacuucaa a
21

<210> 20
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa2M2S

<400> 20
uuugaaguau gccucaaggu cgg
23

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa1M1P1

<400> 21
uuugaaguau gccucaaggu u
21

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa1M2P1

<400> 22

uuugaaguau gccucaaggu u
21

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa2M1P1

<400> 23
uuugaaguau gccucaaggu cgg
23

<210> 24
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa2M2P1

<400> 24
uuugaaguau gccucaaggu cgg
23

<210> 25
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa1M1SP1

<400> 25
uuugaaguau gccucaaggu u
21

<210> 26
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa1M2SP1

<400> 26
uuugaaguau gccucaaggu u
21

<210> 27
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa2M1SP1

<400> 27
uuugaaguau gccucaaggu cgg
23

<210> 28
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBa2M2SP1

<400> 28
uuugaaguau gccucaaggu cgg
23

<210> 29
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBb1

<400> 29
ugcuaugccu caucuucua
19

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb1

<400> 30
uagaagauga ggcauagcag c
21

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb2

<400> 31
uagaagauga ggcauagcau u
21

<210> 32
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBb1M1

<400> 32
ugcuaugccu caucuucua
19

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb1M1

<400> 33
uagaagauga ggcauagcag c
21

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb2M1

<400> 34
uagaagauga ggcauagcau u
21

<210> 35
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBb1M2

<400> 35
ugcuaugccu caucuucua
19

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb1M2

<400> 36
uagaagauga ggcauagcag c
21

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb2M2

<400> 37
uagaagauga ggcauagcau u
21

<210> 38
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBb1M1S

<400> 38
ugcuaugccu caucuucua
19

<210> 39
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb1M1S

<400> 39
uagaagauga ggcauagcag c
21

<210> 40
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb2M1S

<400> 40
uagaagauga ggcauagcau u
21

<210> 41
<211> 19

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBb1M2S

<400> 41
ugcuaugccu caucuucua
19

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb1M2S

<400> 42
uagaagauga ggcauagcag c
21

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb2M2S

<400> 43
uagaagauga ggcauagcau u
21

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb1M1P1

<400> 44
uagaagauga ggcauagcag c
21

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb2M1P1

<400> 45

uagaagauga ggcauagcau u
21

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb1M2P1

<400> 46
uagaagauga ggcauagcag c
21

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb2M2P1

<400> 47
uagaagauga ggcauagcau u
21

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb1M1SP1

<400> 48
uagaagauga ggcauagcag c
21

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb2M1SP1

<400> 49
uagaagauga ggcauagcau u
21

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb1M2SP1

<400> 50
uagaagauga ggcauagcag c
21

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBb2M2SP1

<400> 51
uagaagauga ggcauagcau u
21

<210> 52
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBc1

<400> 52
ucugugccuu cucaucuga
19

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBc1

<400> 53
ucagaugaga aggcacagac g
21

<210> 54
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBc1M1

<400> 54
ucugugccuu cucaucuga
19

<210> 55
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBc1M1

<400> 55
ucagaugaga aggcacagac g
21

<210> 56
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBc1M2

<400> 56
ucugugccuu cucaucuga
19

<210> 57
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBc1M2

<400> 57
ucagaugaga aggcacagac g
21

<210> 58
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBc1M1S

<400> 58
ucugugccuu cucaucuga
19

<210> 59
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBc1M1S

<400> 59
ucagaugaga aggcacagac g
21

<210> 60
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBc1M2S

<400> 60
ucugugccuu cucaucuga
19

<210> 61
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBc1M2S

<400> 61
ucagaugaga aggcacagac g
21

<210> 62
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBc1M1P1

<400> 62
ucagaugaga aggcacagac g
21

<210> 63
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBc1M2P1

<400> 63
ucagaugaga aggcacagac g
21

<210> 64
<211> 21

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBc1M1SP1

<400> 64
ucagaugaga aggcacagac g
21

<210> 65
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBc1M2SP1

<400> 65
ucagaugaga aggcacagac g
21

<210> 66
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBd1

<400> 66
cgugugcacu ucgcuucaa
19

<210> 67
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBd1

<400> 67
uugaagcgaa gugcacacgg u
21

<210> 68
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBd1M1

<400> 68

cgugugcacu ucgcuucaa
19

<210> 69
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBd1M1

<400> 69
uugaagcgaa gugcacacgg u
21

<210> 70
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBd1M2

<400> 70
cgugugcacu ucgcuucaa
19

<210> 71
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBd1M2

<400> 71
uugaagcgaa gugcacacgg u
21

<210> 72
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBd1M1S

<400> 72
cgugugcacu ucgcuucaa
19

<210> 73
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBd1M1S

<400> 73
uugaagcgaa gugcacacgg u
21

<210> 74
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siHBd1M2S

<400> 74
cgugugcacu ucgcuucaa
19

<210> 75
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBd1M2S

<400> 75
uugaagcgaa gugcacacgg u
21

<210> 76
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBd1M1P1

<400> 76
uugaagcgaa gugcacacgg u
21

<210> 77
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBd1M2P1

<400> 77
uugaagcgaa gugcacacgg u
21

<210> 78
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBd1M1SP1

<400> 78
uugaagcgaa gugcacacgg u
21

<210> 79
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siHBd1M2SP1

<400> 79
uugaagcgaa gugcacacgg u
21

<210> 80
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAN1

<400> 80
ccaagagcac caagaacua
19

<210> 81
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN1

<400> 81
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 82
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAN2

<400> 82
agccaagagc accaagaacu a
21

<210> 83
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN2

<400> 83
uaguucuugg ugcucuuggc uug
23

<210> 84
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAN1M1

<400> 84
ccaagagcac caagaacua
19

<210> 85
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN1M1

<400> 85
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 86
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAN2M1

<400> 86
agccaagagc accaagaacu a
21

<210> 87
<211> 23

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN2M1

<400> 87
uaguucuugg ugcucuuggc uug
23

<210> 88
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN1M2

<400> 88
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 89
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN2M2

<400> 89
uaguucuugg ugcucuuggc uug
23

<210> 90
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAN1M3

<400> 90
ccaagagcac caagaacua
19

<210> 91
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAN2M3

<400> 91

agccaagagc accaagaacu a
21

<210> 92
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAN1M1S

<400> 92
ccaagagcac caagaacua
19

<210> 93
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN1M1S

<400> 93
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 94
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAN2M1S

<400> 94
agccaagagc accaagaacu a
21

<210> 95
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN2M1S

<400> 95
uaguucuugg ugcucuuggc uug
23

<210> 96
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN1M2S

<400> 96
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 97
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN2M2S

<400> 97
uaguucuugg ugcucuuggc uug
23

<210> 98
<211> 19
<212> ARN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAN1M3S

<400> 98
ccaagagcac caagaacua
19

<210> 99
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAN2M3S

<400> 99
agccaagagc accaagaacu a
21

<210> 100
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN1M1P1

<400> 100
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 101
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN2M1P1

<400> 101
uaguucuugg ugcucuuggc uug
23

<210> 102
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN1M2P1

<400> 102
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 103
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN2M2P1

<400> 103
uaguucuugg ugcucuuggc uug
23

<210> 104
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN1M1SP1

<400> 104
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 105
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN2M1SP1

<400> 105
uaguucuugg ugcucuuggc uug
23

<210> 106
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN1M3SP1

<400> 106
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 107
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAN2M3SP1

<400> 107
uaguucuugg ugcucuuggc uug
23

<210> 108
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAP1

<400> 108
caauaaagcu ggacaagaa
19

<210> 109
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP1

<400> 109
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 110
<211> 21

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAP2

<400> 110
cccaauaaag cuggacaaga a
21

<210> 111
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP2

<400> 111
uucuugucca gcuuuauugg gag
23

<210> 112
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAP1M1

<400> 112
caauaaagcu ggacaagaa
19

<210> 113
<211> 21
<212> ARN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP1M1

<400> 113
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 114
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAP2M1

<400> 114

cccaauaaag cuggacaaga a
21

<210> 115
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP2M1

<400> 115
uucuugucca gcuuuauugg gag
23

<210> 116
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAP1M2

<400> 116
caauaaagcu ggacaagaa
19

<210> 117
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP1M2

<400> 117
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 118
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAP2M2

<400> 118
cccaauaaag cuggacaaga a
21

<210> 119
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP2M2

<400> 119
uucuugucca gcuuuauugg gag
23

<210> 120
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAP1M1S

<400> 120
caauaaagcu ggacaagaa
19

<210> 121
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP1M1S

<400> 121
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 122
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAP2M1S

<400> 122
cccaauaaag cuggacaaga a
21

<210> 123
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP2M1S

<400> 123
uucuugucca gcuuuauugg gag
23

<210> 124
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAP1M2S

<400> 124
caauaaagcu ggacaagaa
19

<210> 125
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP1M2S

<400> 125
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 126
<211> 21
<212> ARN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho siAP2M2S

<400> 126
cccaauaaag cuggacaaga a
21

<210> 127
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP2M2S

<400> 127
uucuugucca gcuuuauugg gag
23

<210> 128
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP1M1P1

<400> 128
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 129
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP2M1P1

<400> 129
uucuugucca gcuuuauugg gag
23

<210> 130
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP1M2P1

<400> 130
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 131
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP2M2P1

<400> 131
uucuugucca gcuuuauugg gag
23

<210> 132
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP1M1SP1

<400> 132
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 133
<211> 23

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP2M1SP1

<400> 133
uucuugucca gcuuuauugg gag
23

<210> 134
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP1M2SP1

<400> 134
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 135
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho siAP2M2SP1

<400> 135
uucuugucca gcuuuauugg gag
23

<210> 136
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBa1M1P

<400> 136
uuugaaguau gccucaaggu u
21

<210> 137
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBa1M2P

<400> 137

uuugaaguau gccucaaggu u
21

<210> 138
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBa2M1P

<400> 138
uuugaaguau gccucaaggu cgg
23

<210> 139
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBa2M2P

<400> 139
uuugaaguau gccucaaggu cgg
23

<210> 140
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBa1M1SP

<400> 140
uuugaaguau gccucaaggu u
21

<210> 141
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBa1M2SP

<400> 141
uuugaaguau gccucaaggu u
21

<210> 142
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBa2M1SP

<400> 142
uuugaaguau gccucaaggu cgg
23

<210> 143
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBa2M2SP

<400> 143
uuugaaguau gccucaaggu cgg
23

<210> 144
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siHBa1M3SP

<400> 144
ccuugaggca uacuucaaa
19

<210> 145
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBa1M4SP

<400> 145
uuugaaguau gccucaaggu u
21

<210> 146
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBb1M1SP

<400> 146
uagaagauga ggcauagcag c
21

<210> 147
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBb2M1SP

<400> 147
uagaagauga ggcauagcau u
21

<210> 148
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBb1M2SP

<400> 148
uagaagauga ggcauagcag c
21

<210> 149
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBb2M2SP

<400> 149
uagaagauga ggcauagcau u
21

<210> 150
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siHBb1M3SP

<400> 150
uagaagauga ggcauagcag c
21

<210> 151
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBb1M4SP

<400> 151
uagaagauga ggcauagcag c
21

<210> 152
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siHBb4M1SP

<400> 152
gcugcuaugc cucaucuucu a
21

<210> 153
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBb4M1SP

<400> 153
uagaagauga ggcauagcag cgc
23

<210> 154
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBc1M1SP

<400> 154
ucagaugaga aggcacagac g
21

<210> 155
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBc1M2SP

<400> 155
ucagaugaga aggcacagac g
21

<210> 156
<211> 19

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siHBc1M3SP

<400> 156
ucugugccuu cucaucuga
19

<210> 157
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBc1M4SP

<400> 157
ucagaugaga aggcacagac g
21

<210> 158
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siHBc2M1SP

<400> 158
cgucugugcc uucucaucug a
21

<210> 159
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBc2M1SP

<400> 159
ucagaugaga aggcacagac ggg
23

<210> 160
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBd1M1SP

<400> 160

uugaagcgaa gugcacacgg u
21

<210> 161
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBd1M2SP

<400> 161
uugaagcgaa gugcacacgg u
21

<210> 162
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siHBd1M3SP

<400> 162
cgugugcacu ucgcuucaa
19

<210> 163
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBd1M4SP

<400> 163
ucagaugaga aggcacagac g
21

<210> 164
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siHBd2M1SP

<400> 164
accgugugca cuucgcuuca a
21

<210> 165
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBd2M1SP

<400> 165
uugaagcgaa gugcacacgg ucc
23

<210> 166
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAN1M1P

<400> 166
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 167
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAN2M1P

<400> 167
uaguucuugg ugcucuuggc uug
23

<210> 168
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAN1M2P

<400> 168
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 169
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAN2M2P

<400> 169
uaguucuugg ugcucuuggc uug
23

<210> 170
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAN1M1SP

<400> 170
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 171
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAN2M1SP

<400> 171
uaguucuugg ugcucuuggc uug
23

<210> 172
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAN1M2SP

<400> 172
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 173
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAN2M2SP

<400> 173
uaguucuugg ugcucuuggc uug
23

<210> 174
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAN1M4S

<400> 174
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 175
<211> 21
<212> ARN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAN1M4SP

<400> 175
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 176
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siAN1M5S

<400> 176
ccaagagcac caagaacua
19

<210> 177
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAN1M5S

<400> 177
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 178
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAN1M5SP

<400> 178
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 179
<211> 21

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAP1M1P

<400> 179
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 180
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAP2M1P

<400> 180
uucuugucca gcuuuauugg gag
23

<210> 181
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAP1M2P

<400> 181
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 182
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAP2M2P

<400> 182
uucuugucca gcuuuauugg gag
23

<210> 183
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAP1M1SP

<400> 183

uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 184
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAP2M1SP

<400> 184
uucuugucca gcuuuauugg gag
23

<210> 185
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAP1M2SP

<400> 185
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 186
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAP2M2SP

<400> 186
uucuugucca gcuuuauugg gag
23

<210> 187
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi nghịch cho mTTR

<400> 187
ccgtctgtgc cttctcatct
20

<210> 188
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi thuận cho mTTR

<400> 188
taatctcctc ccccaactcc
20

<210> 189
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi nghịch cho GAPDH

<400> 189
agaaggctgg ggctcatttg
20

<210> 190
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi thuận cho GAPDH

<400> 190
aggggccatc cacagtcttc
20

<210> 191
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi nghịch cho |Â-actin

<400> 191
agcttctttg cagctccttc gttg
24

<210> 192
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi thuận cho |Â-actin

<400> 192
ttctgaccca ttcccaccat caca
24

<210> 193
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi nghịch cho HBV

<400> 193
cgtttctcct ggctcagttt a
21

<210> 194
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi thuận cho HBV

<400> 194
cagcggtaaa aagggactca a
21

<210> 195
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho AD-65695

<400> 195
acauauuuga ucagucuuuu u
21

<210> 196
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho AD-65695

<400> 196
aaaaagacug aucaaauaug uug
23

<210> 197
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho AD-69535

<400> 197

gcuuaaaagg gacaguauuc a
21

<210> 198
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho AD-69535

<400> 198
ugaauacugu cccuuuuaag caa
23

<210> 199
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi nghịch cho ANGPTL3 của chuột nhắt

<400> 199
gaggagcagc taaccaactt aat
23

<210> 200
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi thuận cho ANGPTL3 của chuột nhắt

<400> 200
tctgcatgtg ctgttgactt aat
23

<210> 201
<211> 24
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi nghịch cho GAPDH của chuột nhắt

<400> 201
aactttggca ttgtggaagg gctc
24

<210> 202
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi nghịch cho GAPDH của chuột nhắt

<400> 202
tggaagagtg ggagttgctg ttga
24

<210> 203
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho W8-siAN1M3SPs

<400> 203
uaguucuugg ugcucuuggc u
21

<210> 204
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-simTTR

<400> 204
aacaguguuc uugcucuaua a
21

<210> 205
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-simTTR

<400> 205
uuauagagca agaacacugu uuu
23

<210> 206
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siHBa1M2Sps

<400> 206
ccuugaggca uacuucaaa
19

<210> 207
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBa1M2Sps

<400> 207
uuugaaguau gccucaaggu u
21

<210> 208
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10- siHBa1M2Sp

<400> 208
ccuugaggca uacuucaaa
19

<210> 209
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10- siHBa1M2Sp

<400> 209
uuugaaguau gccucaaggu u
21

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

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siHBa1M1Sp

<400> 210
ccuugaggca uacuucaaa
19

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBa1M1Sp

<400> 211
uuugaaguau gccucaaggu u
21

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

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10- siHBa1M1SpsT

<400> 212
ccuugaggca uacuucaaa
19

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

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10- siHBa1M1SpsT

<400> 213
uugaaguaug ccucaagguu
20

<210> 214
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siHBa1M1Sps

<400> 214
ccuugaggca uacuucaaa
19

<210> 215
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siHBa1M1Sps

<400> 215
uuugaaguau gccucaaggu u
21

<210> 216
<211> 19
<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho P10-siHBa1M2SP

<400> 216
ccuugaggca uacuucaaa
19

<210> 217
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho P10-siHBa1M2SP

<400> 217
uuugaaguau gccucaaggu u
21

<210> 218
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho W8-siHBa1M2SP

<400> 218
ccuugaggca uacuucaaa
19

<210> 219
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho W8-siHBa1M2SP

<400> 219
uuugaaguau gccucaaggu u
21

<210> 220
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho Z5-siHBa1M2SP

<400> 220
ccuugaggca uacuucaaa
19

<210> 221
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho Z5-siHBa1M2SP

<400> 221
uuugaaguau gccucaaggu u
21

<210> 222
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siP1M1Sp

<400> 222
gaaaguaugu caacgaaua
19

<210> 223
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siP1M1Sp

<400> 223
uauucguuga cauacuuucu u
21

<210> 224
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siP1M1SP

<400> 224
gaaaguaugu caacgaaua
19

<210> 225
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siP1M1SP

<400> 225
uauucguuga cauacuuucu u
21

<210> 226
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siAN2M1Sp

<400> 226
agccaagagc accaagaacu a
21

<210> 227
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAN2M1Sp

<400> 227
uaguucuugg ugcucuuggc uug
23

<210> 228
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siAP1M1Sp

<400> 228
caauaaagcu ggacaagaa
19

<210> 229
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAP1M1Sp

<400> 229
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 230

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

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho L10-siAP1M1Sps

<400> 230
caauaaagcu ggacaagaa
19

<210> 231
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho L10-siAP1M1Sps

<400> 231
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 232
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho K4-simTTR

<400> 232
caauaaagcu ggacaagaa
19

<210> 233
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho K4-simTTR

<400> 233
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 234
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho AD-66810

<400> 234

caauaaagcu ggacaagaa
19

<210> 235
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho AD-66810

<400> 235
uucuugucca gcuuuauugg g
21

<210> 236
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho X2M2

<400> 236
ccuugaggca uacuucaaat t
21

<210> 237
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho X2M2

<400> 237
uuugaaguau gccucaaggt t
21

<210> 238
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi dòng lên cho HBV

<400> 238
gtcttttggg ttttgctgcc
20

<210> 239
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi thuận cho HBV

<400> 239
gcaacggggt aaaggttcag
20

<210> 240
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi nghịch cho |Â-actin

<400> 240
ggtcggagtc aacggattt
19

<210> 241
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi thuận cho |Â-actin

<400> 241
ccagcatcgc cccacttga
19

<210> 242
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi nghịch cho ANGPTL3 của khỉ

<400> 242
ctggtggtgg catgatgagt
20

<210> 243
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi thuận cho ANGPTL3 của khỉ

<400> 243
ctcttctccg ctctggctta g
21

<210> 244
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi nghịch cho GAPDH của khỉ

<400> 244
gggagccaaa agggtcatca
20

<210> 245
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi thuận cho GAPDH của khỉ

<400> 245
cgtggactgt ggtcatgagt
20

<210> 246
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi nghịch cho |Â-actin của chuột nhắt

<400> 246
agcttctttg cagctccttc gttg
24

<210> 247
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi thuận cho |Â-actin của chuột nhắt

<400> 247
ttctgaccca ttcccaccat caca
24

<210> 248
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi nghịch cho APOC3 của người

<400> 248
gtgaccgatg gcttcagttc
20

<210> 249
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi thuận cho APOC3 của người

<400> 249
atggataggc aggtggactt
20

<210> 250
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự có nghĩa cho trình tự so sánh 1

<400> 250
ccuugaggca uacuucaaa
19

<210> 251
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đối nghĩa cho trình tự so sánh 1

<400> 251
uuugaaguau gccucaaggu u
21

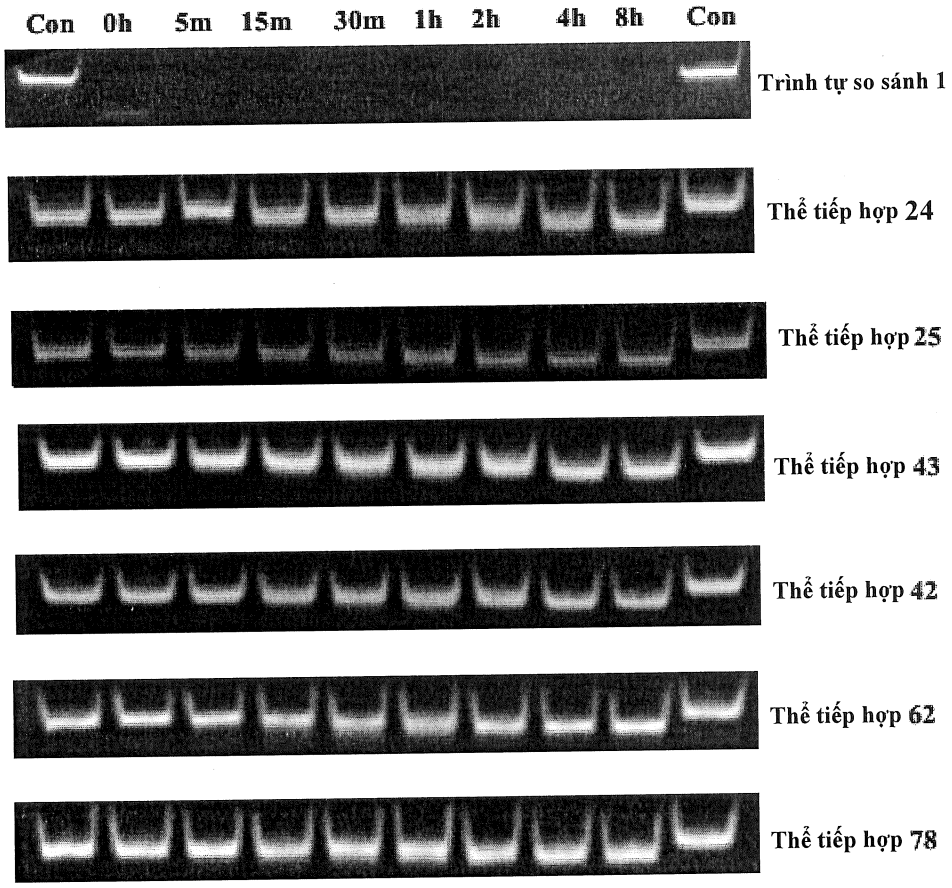

Con 0h 5m 15m 30m 1h 2h 4h 8h Con
Trình tự so sánh 1
Thể tiếp hợp 24
Thể tiếp hợp 25
Thể tiếp hợp 43
Thể tiếp hợp 42
Thể tiếp hợp 62
Thể tiếp hợp 78

Fig. 1A

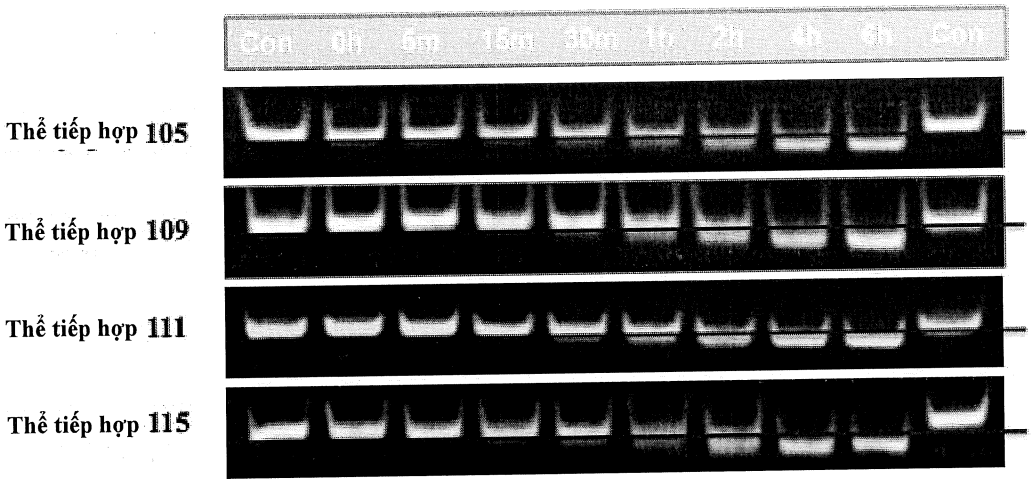

Thể tiếp hợp 105
Thể tiếp hợp 109
Thể tiếp hợp 111
Thể tiếp hợp 115

Fig. 1B

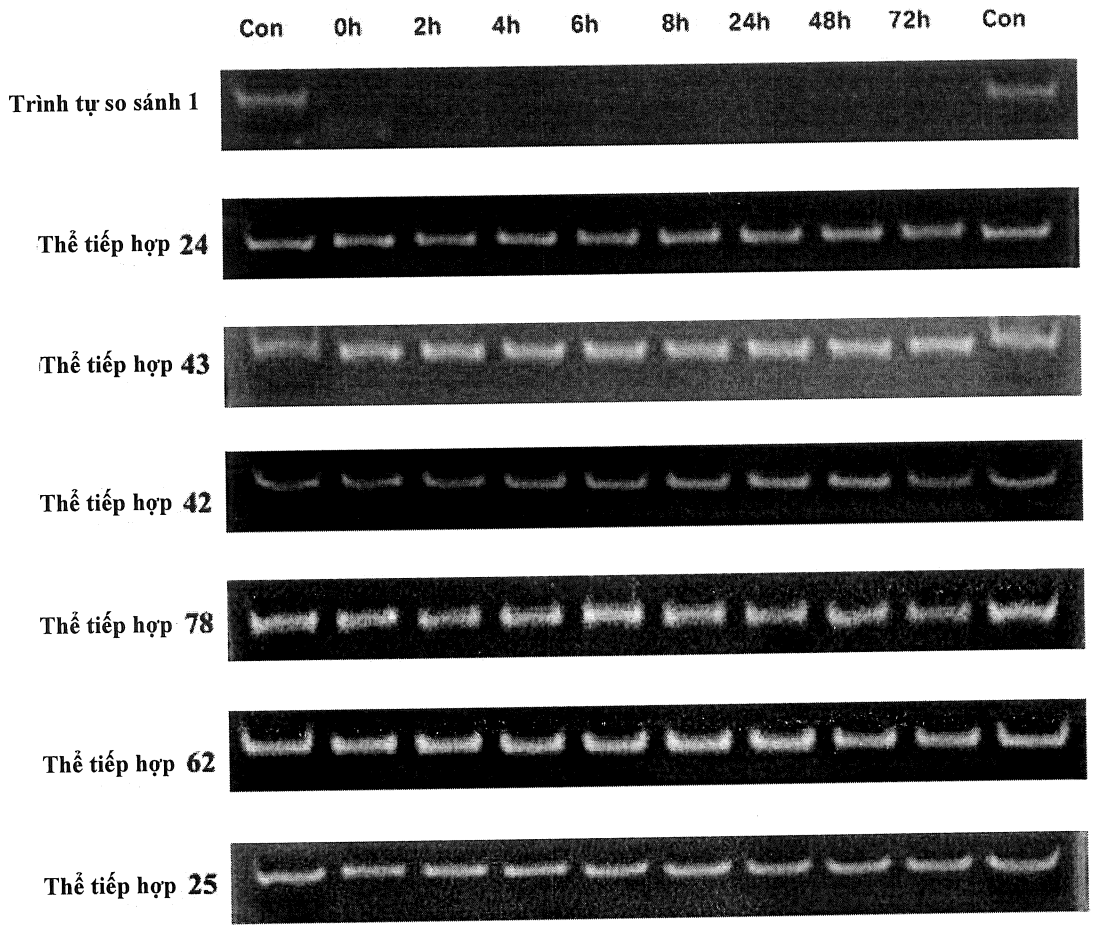

Con
0h
2h
4h
6h
8h
24h
48h
72h
Con
Trình tự so sánh 1
Thể tiếp hợp 24
Thể tiếp hợp 43
Thể tiếp hợp 42
Thể tiếp hợp 78
Thể tiếp hợp 62
Thể tiếp hợp 25

Fig. 2A

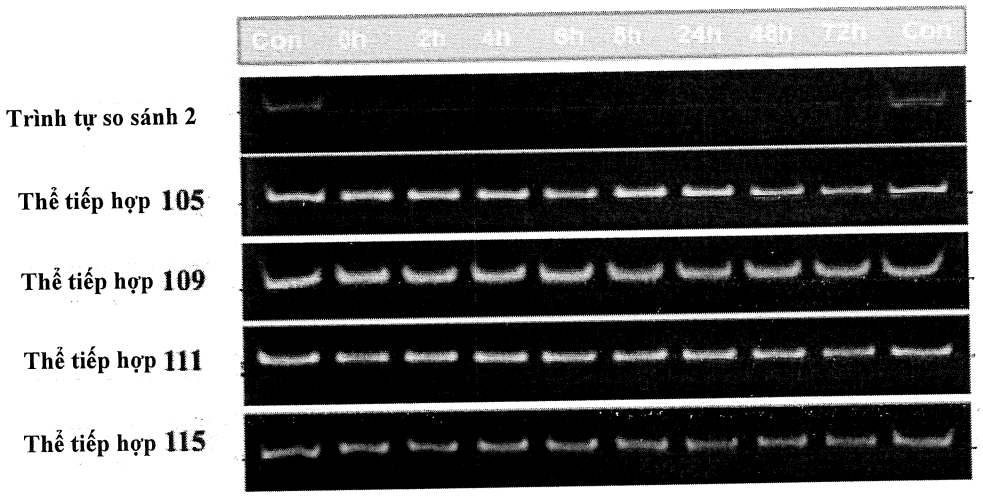

Trình tự so sánh 2
Thể tiếp hợp 105
Thể tiếp hợp 109
Thể tiếp hợp 111
Thể tiếp hợp 115

Fig. 2B

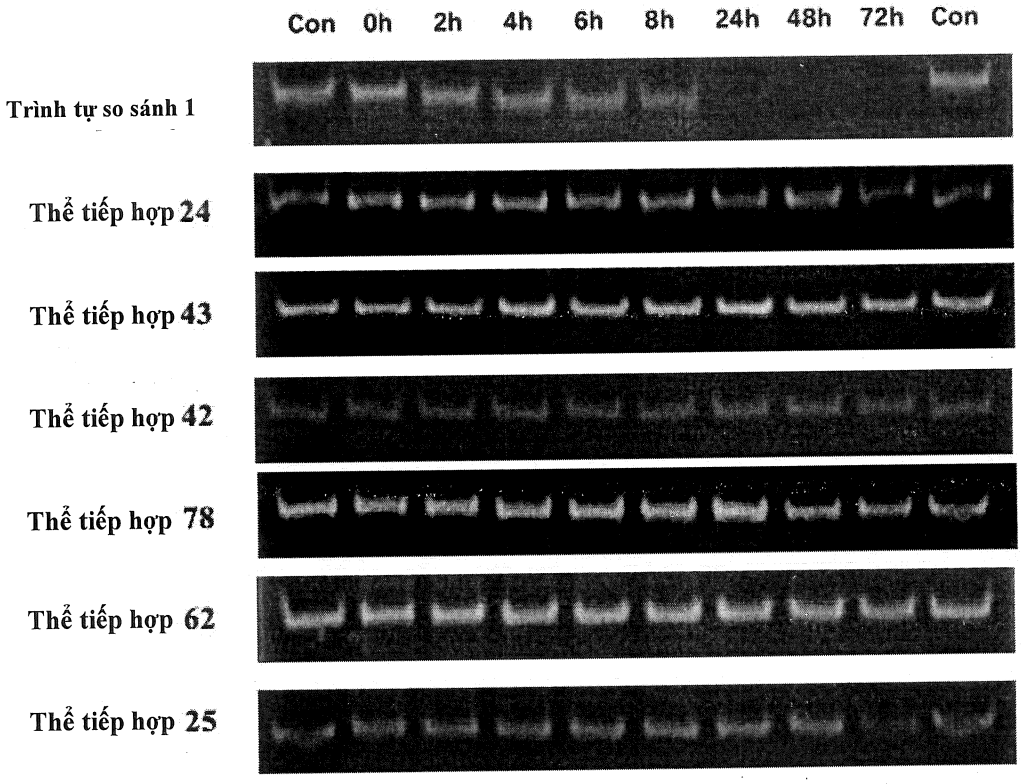

Con 0h 2h 4h 6h 8h 24h 48h 72h Con
Trình tự so sánh 1
Thể tiếp hợp 24
Thể tiếp hợp 43
Thể tiếp hợp 42
Thể tiếp hợp 78
Thể tiếp hợp 62
Thể tiếp hợp 25

Fig. 3A

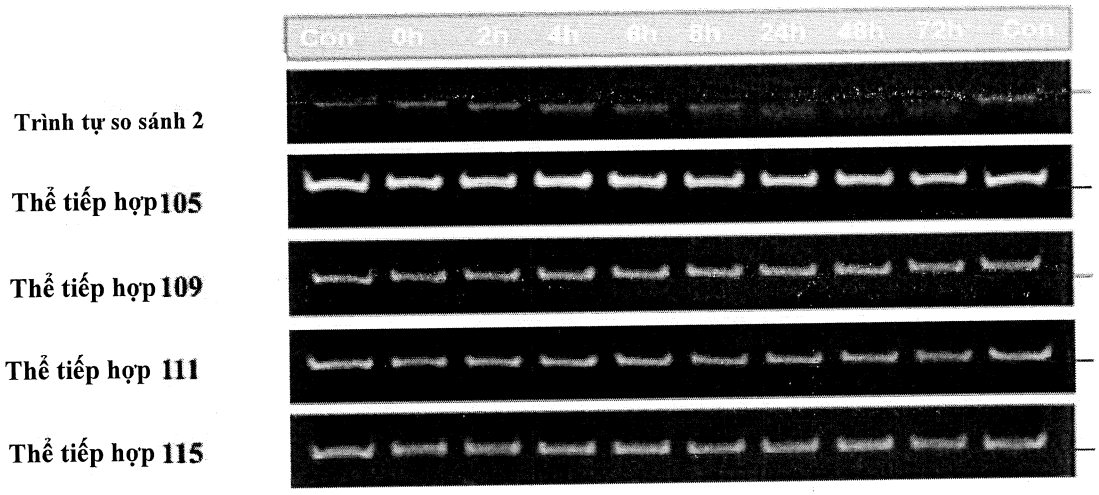

Con 0h 2h 4h 6h 8h 24h 48h 72h Con
Trình tự so sánh 2
Thể tiếp hợp105
Thể tiếp hợp 109
Thể tiếp hợp 111
Thể tiếp hợp 115

Fig. 3B

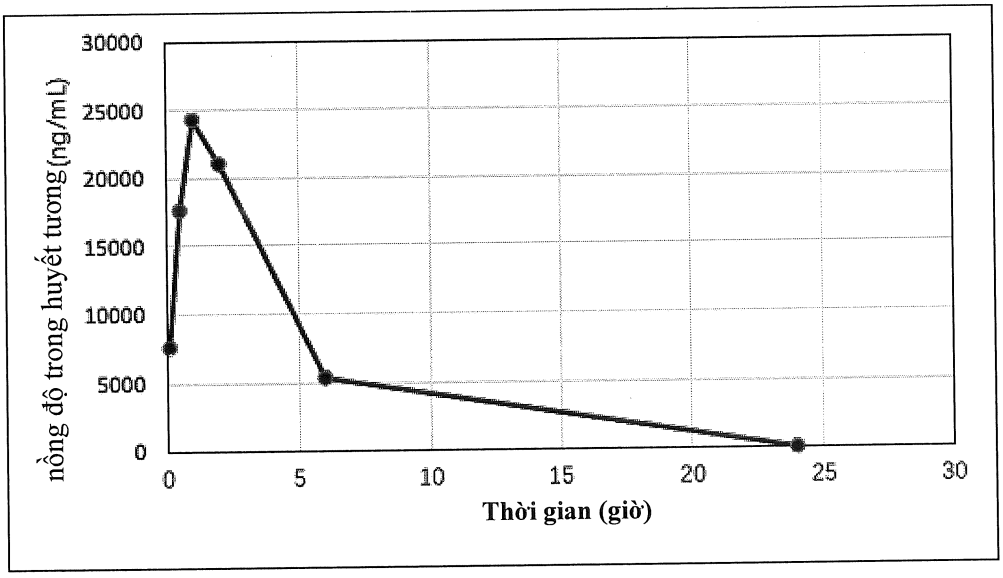

30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
nồng độ trong huyết tương (ng/mL)
0
5
10
15
20
25
30
Thời gian (giờ)

Fig. 4

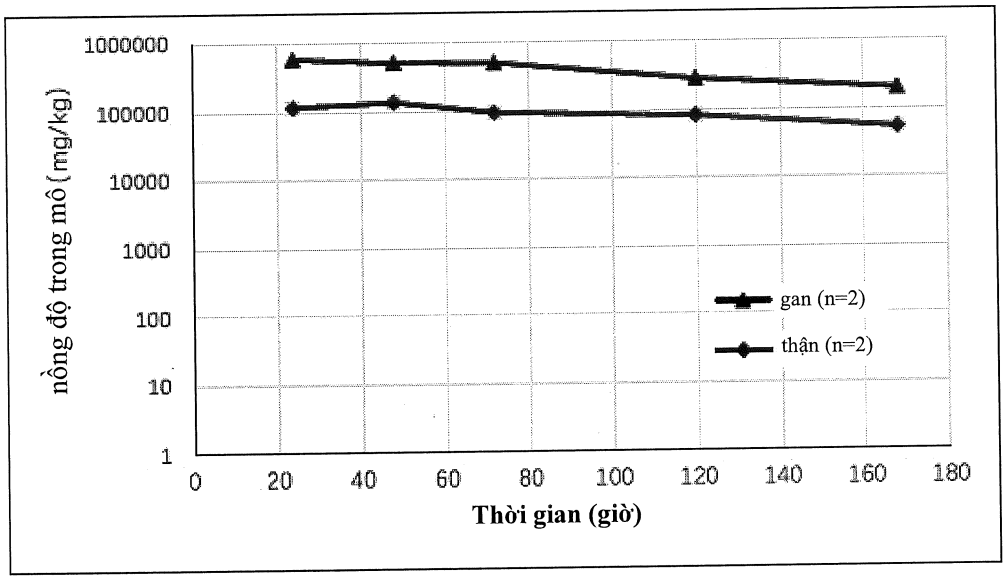

1000000
100000
10000
1000
100
10
1
nồng độ trong mô (mg/kg)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Thời gian (giờ)
gan (n=2)
thận (n=2)

Fig. 5

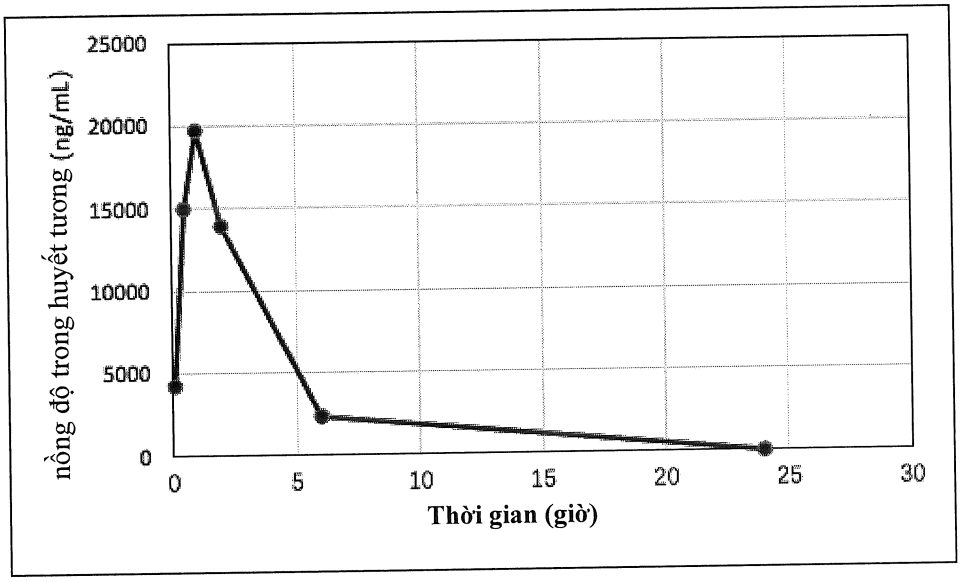

nồng độ trong huyết tương (ng/mL)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
5
10
15
20
25
30
Thời gian (giờ)

Fig. 6

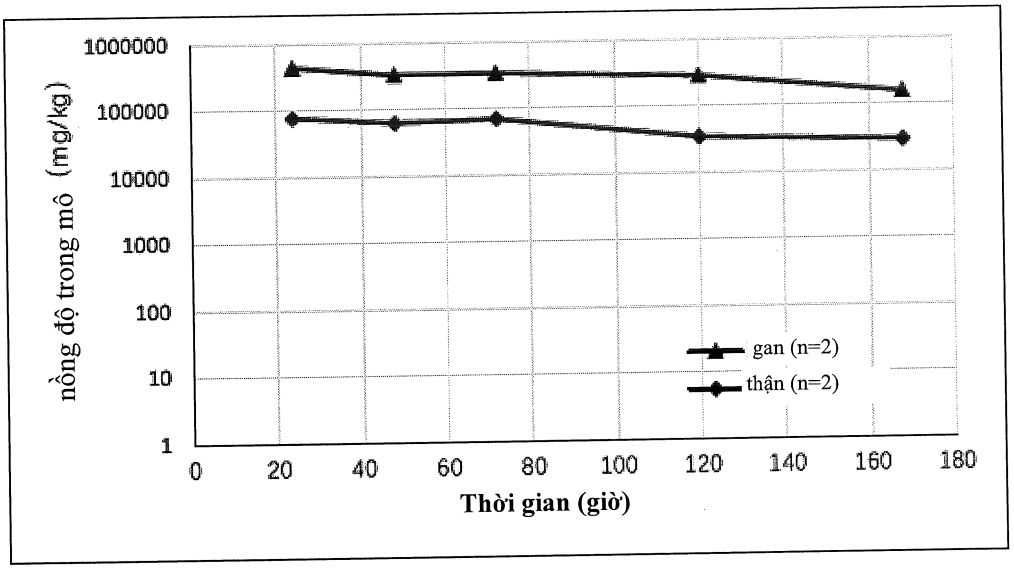

nồng độ trong mô (mg/kg)
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Thời gian (giờ)
gan (n=2)
thận (n=2)

Fig. 7

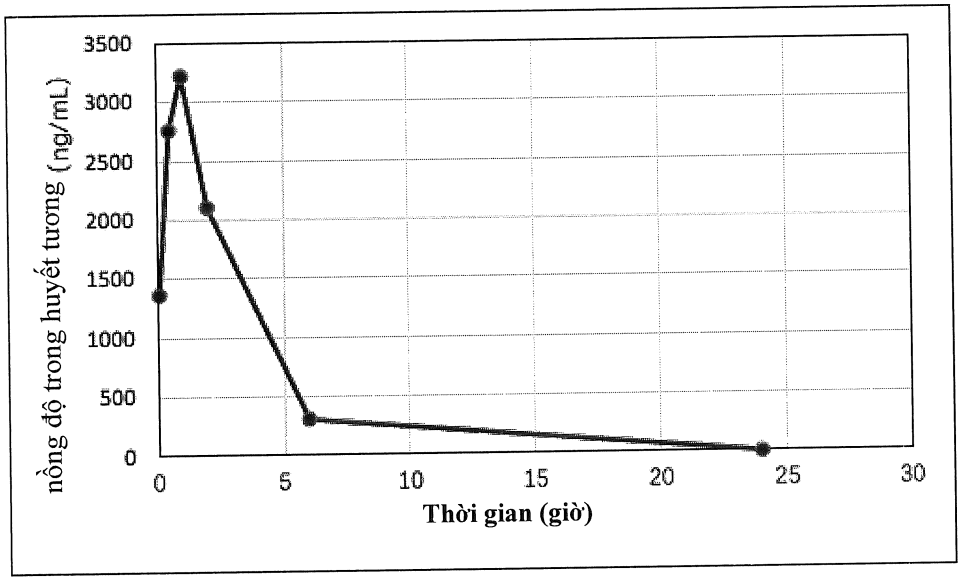

nồng độ trong huyết tương (ng/mL)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
Thời gian (giờ)

Fig. 8

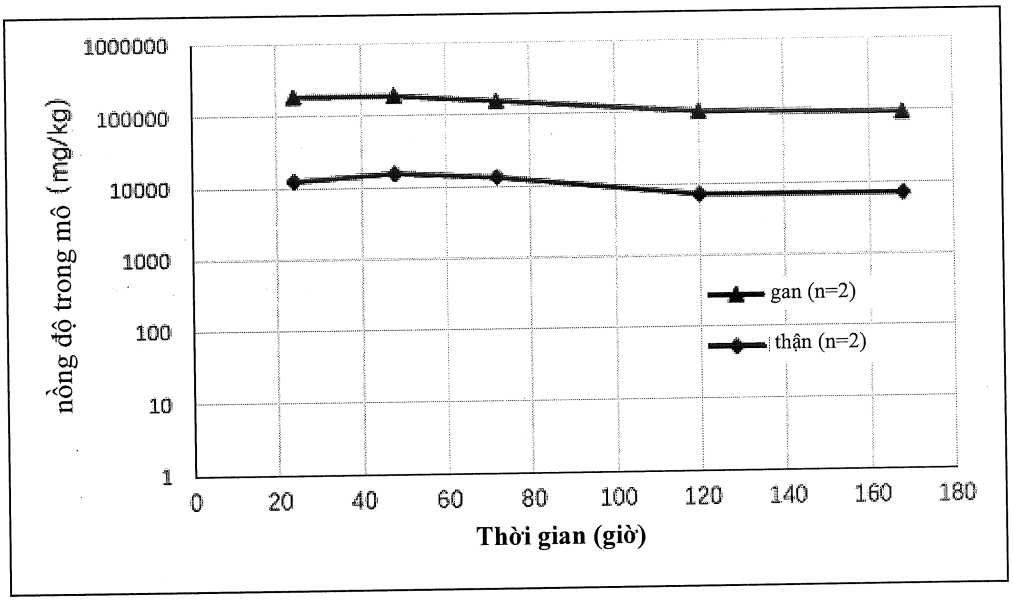

nồng độ trong mô (mg/kg)
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Thời gian (giờ)
gan (n=2)
thận (n=2)

Fig. 9

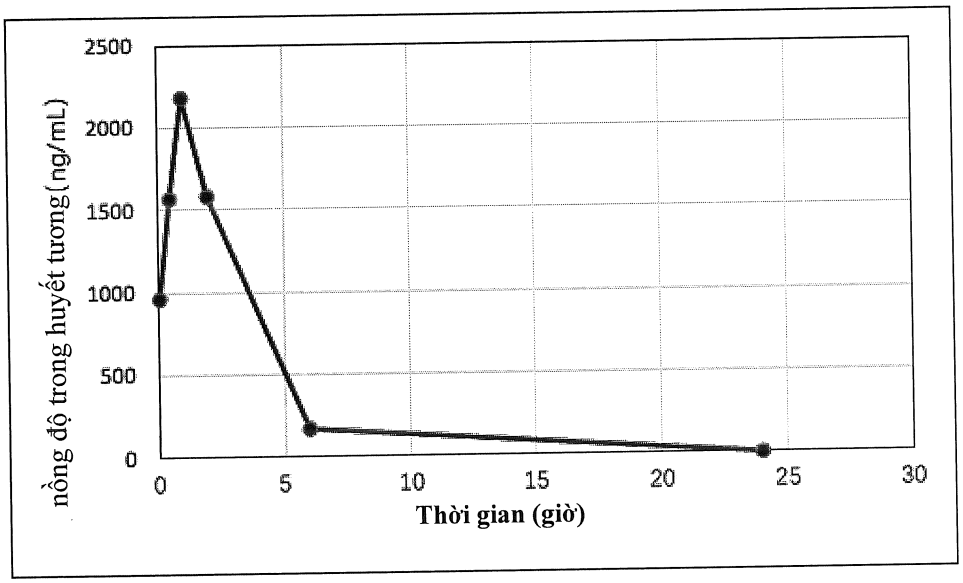

nồng độ trong huyết tương (ng/mL)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
Thời gian (giờ)

Fig. 10

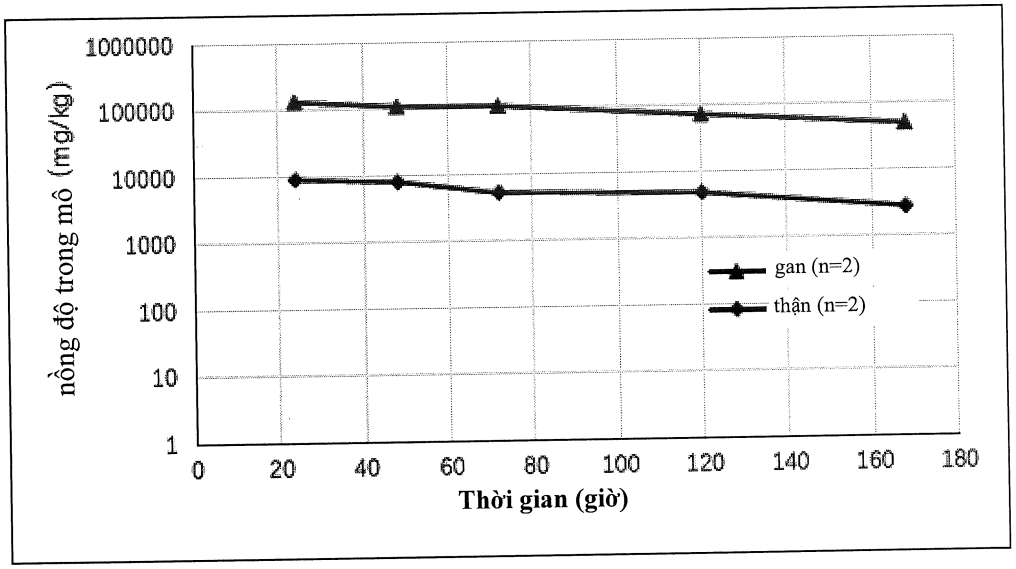

nồng độ trong mô (mg/kg)
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Thời gian (giờ)
gan (n=2)
thận (n=2)

Fig. 11

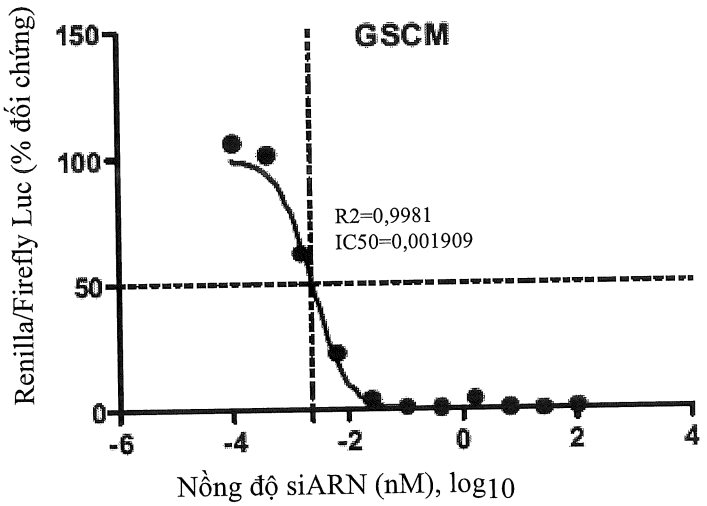


Fig. 12A

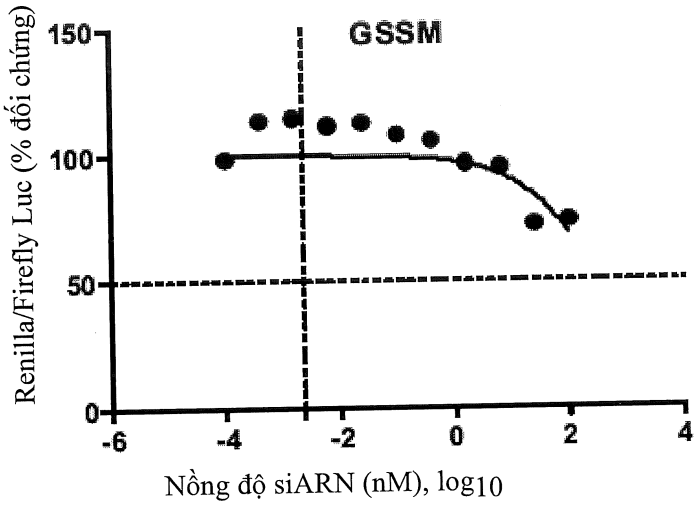


Fig. 12B

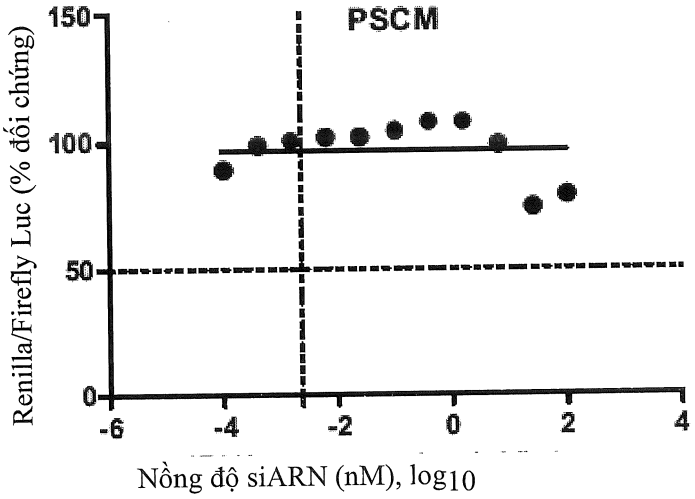


Fig. 12C

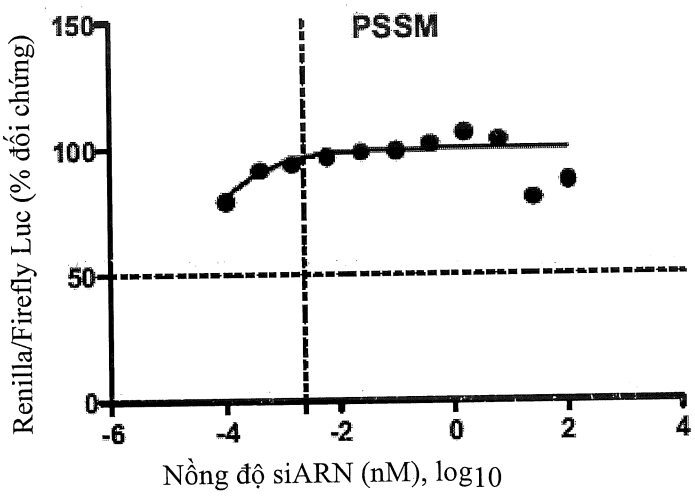


Fig. 12D

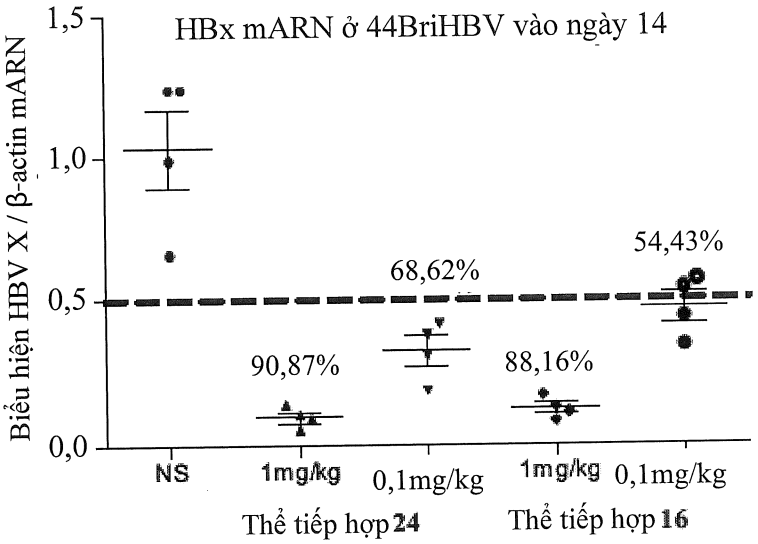

HBx mARN ở 44BriHBV vào ngày 14
Biểu hiện HBV X / β-actin mARN
1,5
1,0
0,5
0,0
90,87%
68,62%
88,16%
54,43%
NS
1mg/kg
0,1mg/kg
1mg/kg
0,1mg/kg
Thể tiếp hợp 24
Thể tiếp hợp 16

Fig. 13

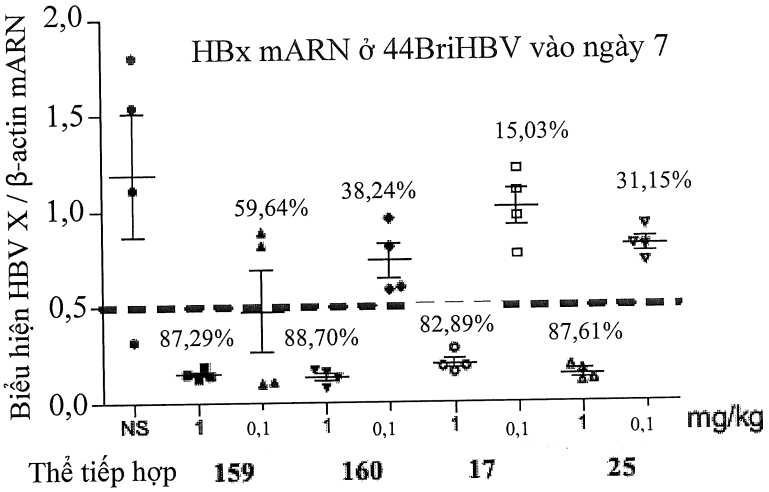

HBx mARN ở 44BriHBV vào ngày 7
Biểu hiện HBV X / β-actin mARN
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
87,29%
59,64%
88,70%
38,24%
82,89%
15,03%
87,61%
31,15%
NS
1
0,1
1
0,1
1
0,1
1
0,1
mg/kg
Thể tiếp hợp 159
160
17
25

Fig. 14

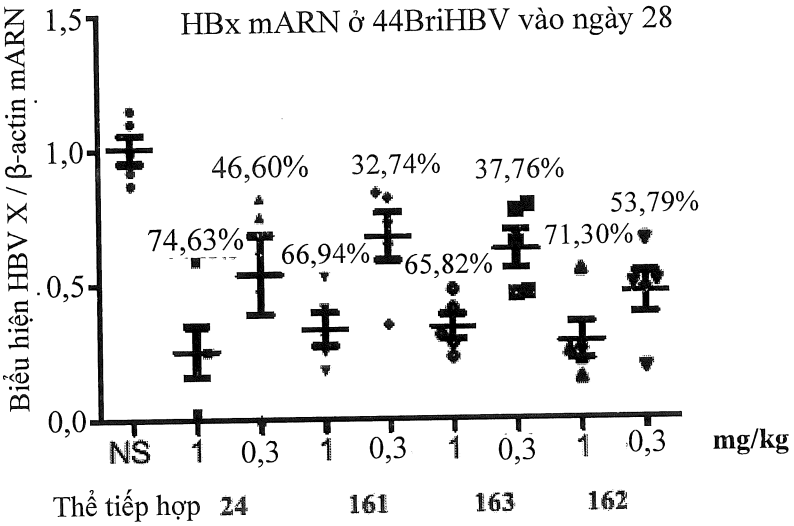

HBx mARN ở 44BriHBV vào ngày 28
Biểu hiện HBV X / β-actin mARN
1,5
1,0
0,5
0,0
74,63%
46,60%
66,94%
32,74%
65,82%
37,76%
71,30%
53,79%
NS
1
0,3
1
0,3
1
0,3
1
0,3
mg/kg
Thể tiếp hợp 24
161
163
162

Fig. 15

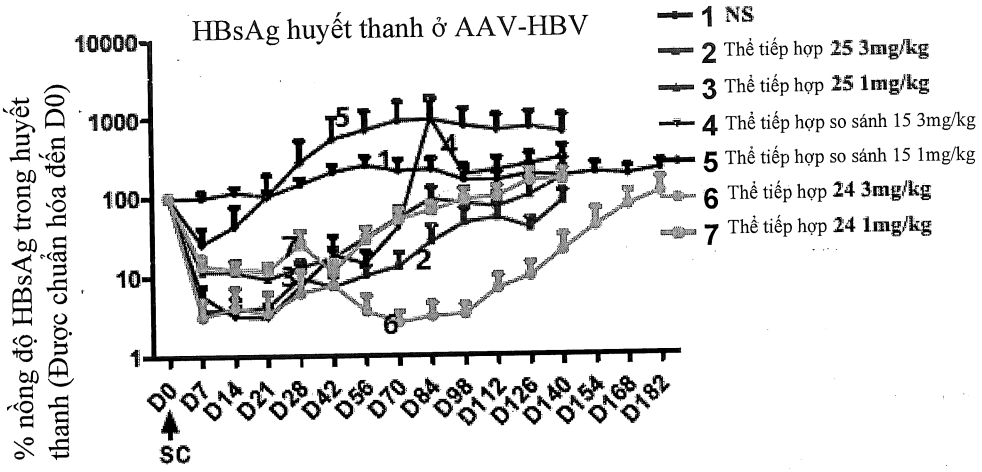

HBsAg huyết thanh ở AAV-HBV
% nồng độ HBsAg trong huyết thanh (Được chuẩn hóa đến D0)
10000
1000
100
10
1
D0
D7
D14
D21
D28
D42
D56
D70
D84
D98
D112
D126
D140
D154
D168
D182
SC
1 NS
2 Thể tiếp hợp 25 3mg/kg
3 Thể tiếp hợp 25 1mg/kg
4 Thể tiếp hợp so sánh 15 3mg/kg
5 Thể tiếp hợp so sánh 15 1mg/kg
6 Thể tiếp hợp 24 3mg/kg
7 Thể tiếp hợp 24 1mg/kg

Fig. 16

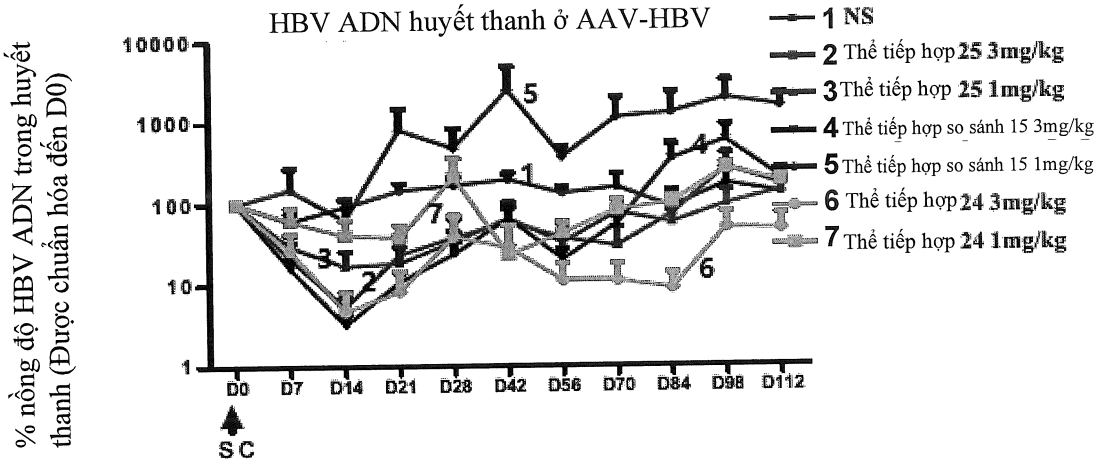

HBV ADN huyết thanh ở AAV-HBV
% nồng độ HBV ADN trong huyết thanh (Được chuẩn hóa đến D0)
10000
1000
100
10
1
D0
D7
D14
D21
D28
D42
D56
D70
D84
D98
D112
SC
1 NS
2 Thể tiếp hợp 25 3mg/kg
3 Thể tiếp hợp 25 1mg/kg
4 Thể tiếp hợp so sánh 15 3mg/kg
5 Thể tiếp hợp so sánh 15 1mg/kg
6 Thể tiếp hợp 24 3mg/kg
7 Thể tiếp hợp 24 1mg/kg

Fig. 17

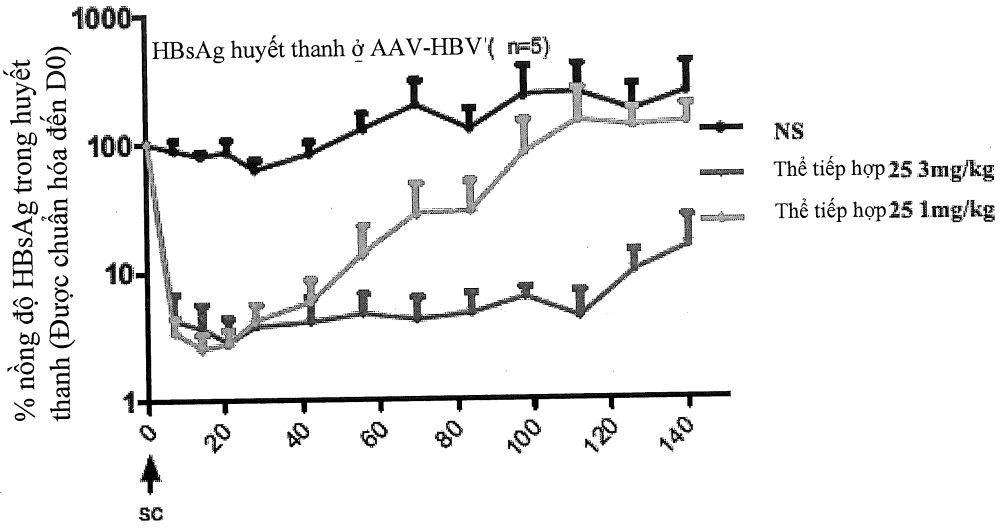

HBsAg huyết thanh ở AAV-HBV'(n=5)
% nồng độ HBsAg trong huyết thanh (Được chuẩn hóa đến D0)
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
120
140
SC
NS
Thể tiếp hợp 25 3mg/kg
Thể tiếp hợp 25 1mg/kg

Fig. 18

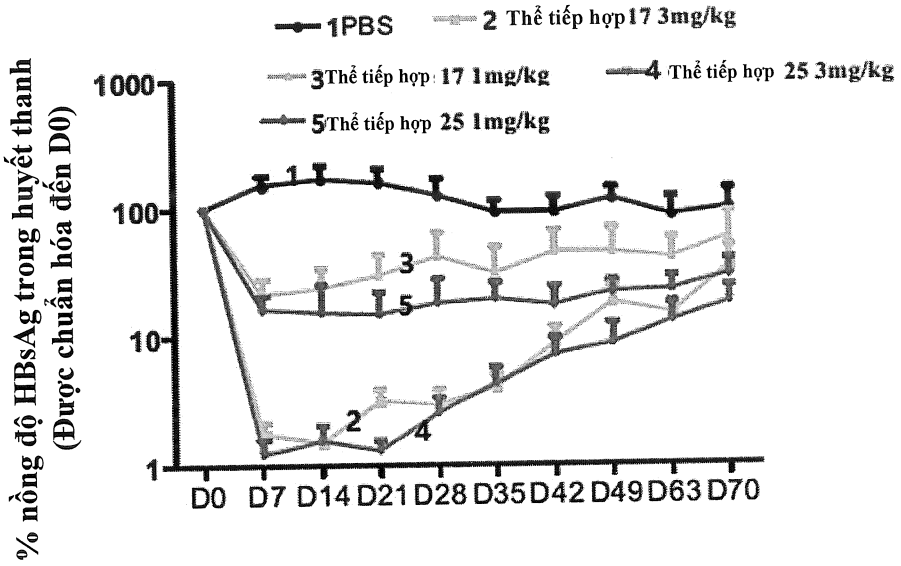

1PBS
2 Thể tiếp hợp17 3mg/kg
3Thể tiếp hợp 17 1mg/kg
4 Thể tiếp hợp 25 3mg/kg
5Thể tiếp hợp 25 1mg/kg
% nồng độ HBsAg trong huyết thanh (Được chuẩn hóa đến D0)
1000
100
10
1
D0 D7 D14 D21 D28 D35 D42 D49 D63 D70

Fig. 19

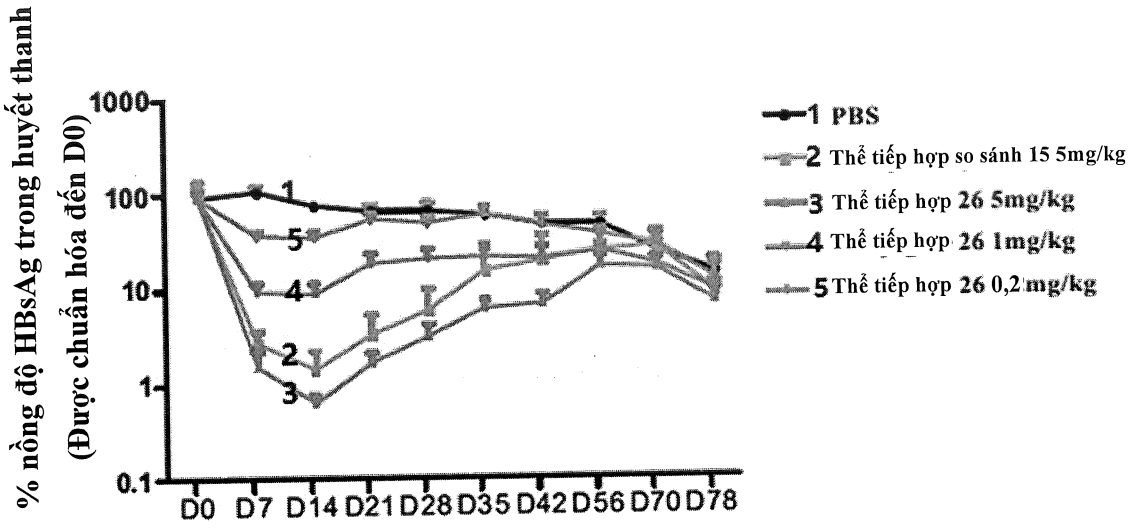

% nồng độ HBsAg trong huyết thanh (Được chuẩn hóa đến D0)
1000
100
10
1
0.1
D0 D7 D14 D21 D28 D35 D42 D56 D70 D78
1 PBS
2 Thể tiếp hợp so sánh 15 5mg/kg
3 Thể tiếp hợp 26 5mg/kg
4 Thể tiếp hợp 26 1mg/kg
5 Thể tiếp hợp 26 0,2 mg/kg

Fig. 20

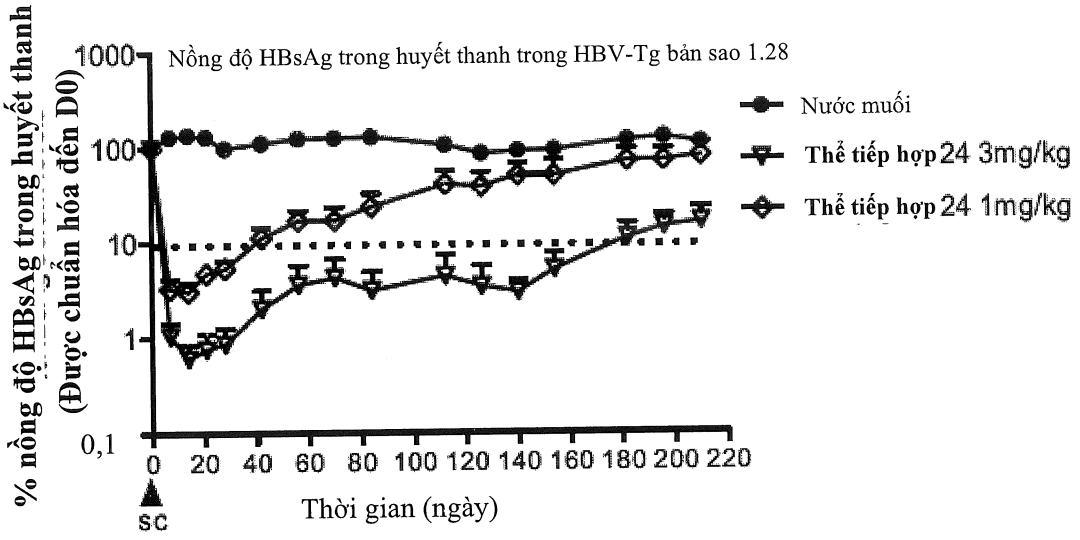

Nồng độ HBsAg trong huyết thanh trong HBV-Tg bản sao 1.28
% nồng độ HBsAg trong huyết thanh (Được chuẩn hóa đến D0)
1000
100
10
1
0,1
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220
SC
Thời gian (ngày)
Nước muối
Thể tiếp hợp 24 3mg/kg
Thể tiếp hợp 24 1mg/kg

Fig. 21

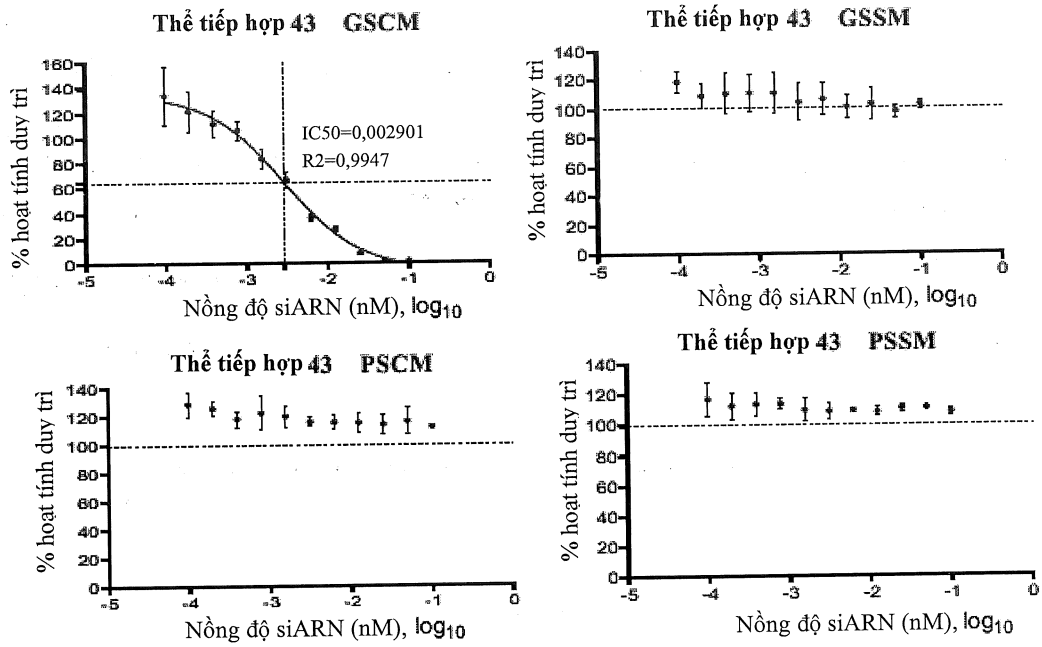

Thể tiếp hợp 43 GSCM
% hoạt tính duy trì
IC50=0,002901
R2=0,9947
Nồng độ siARN (nM), log10
Thể tiếp hợp 43 GSSM
% hoạt tính duy trì
Nồng độ siARN (nM), log10
Thể tiếp hợp 43 PSCM
% hoạt tính duy trì
Nồng độ siARN (nM), log10
Thể tiếp hợp 43 PSSM
% hoạt tính duy trì
Nồng độ siARN (nM), log10

Fig. 22

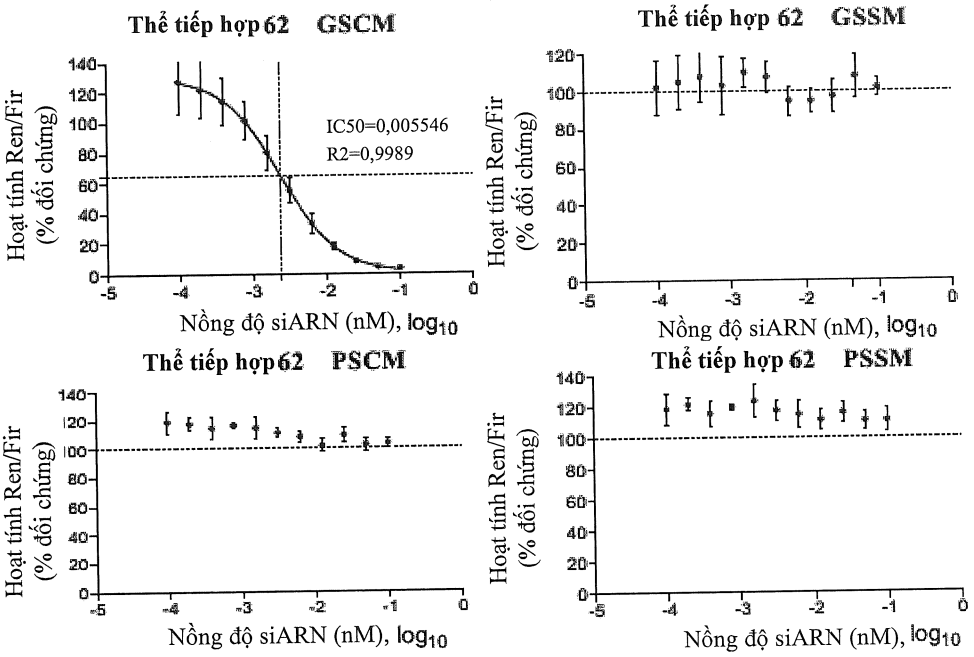

Thể tiếp hợp 62 GSCM
IC50=0,005546
R2=0,9989
Thể tiếp hợp 62 GSSM
Thể tiếp hợp 62 PSCM
Thể tiếp hợp 62 PSSM
Hoạt tính Ren/Fir (% đối chứng)
Nồng độ siARN (nM), log10

Fig. 23

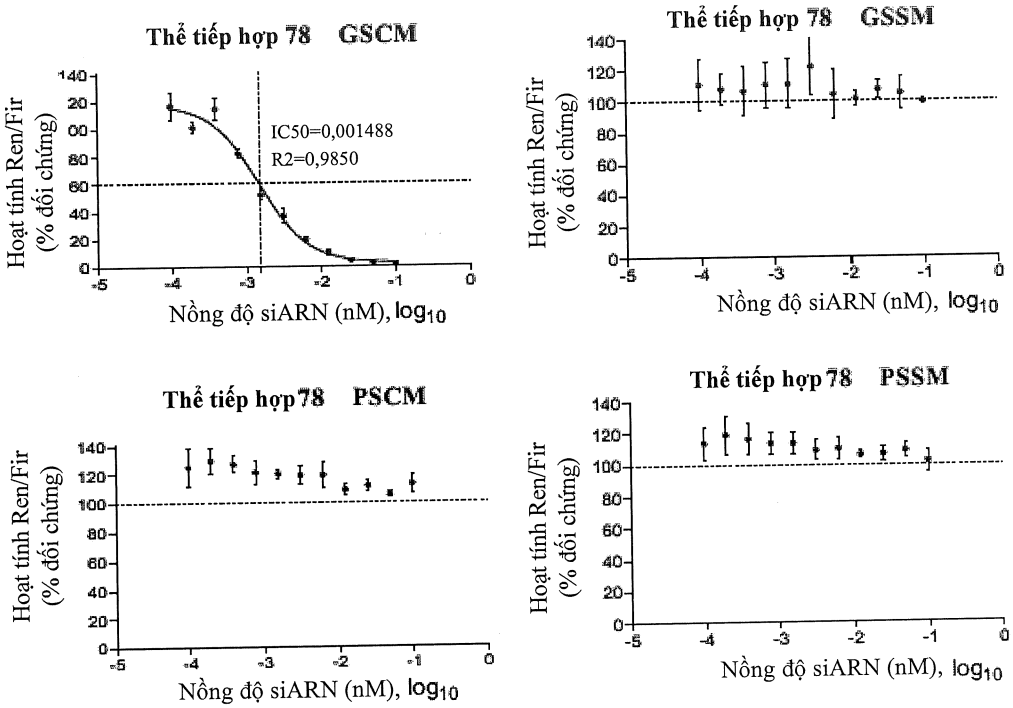

Thể tiếp hợp 78 GSCM
IC50=0,001488
R2=0,9850
Thể tiếp hợp 78 GSSM
Thể tiếp hợp 78 PSCM
Thể tiếp hợp 78 PSSM
Hoạt tính Ren/Fir (% đối chứng)
Nồng độ siARN (nM), log10

Fig. 24

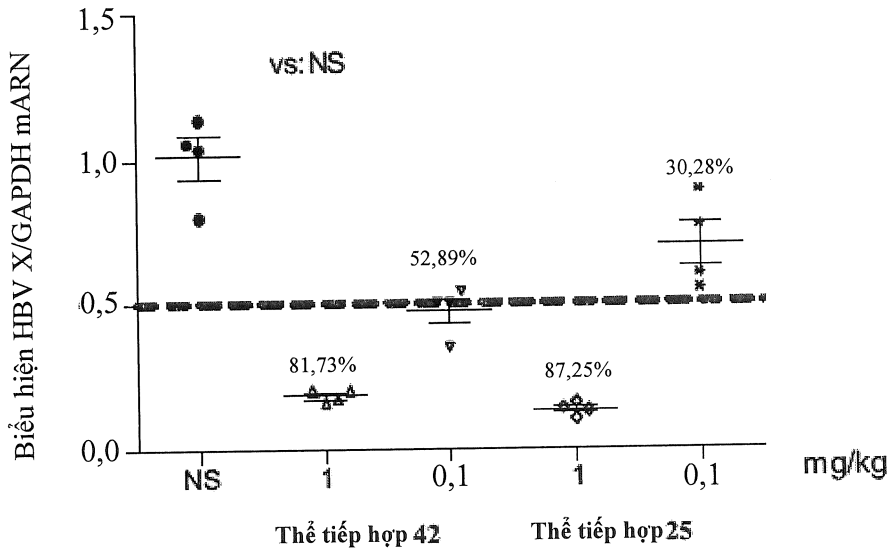

Biểu hiện HBV X/GAPDH mARN
1,5
1,0
0,5
0,0
vs: NS
30,28%
52,89%
81,73%
87,25%
NS
1
0,1
1
0,1
mg/kg
Thể tiếp hợp 42
Thể tiếp hợp 25

Fig. 25

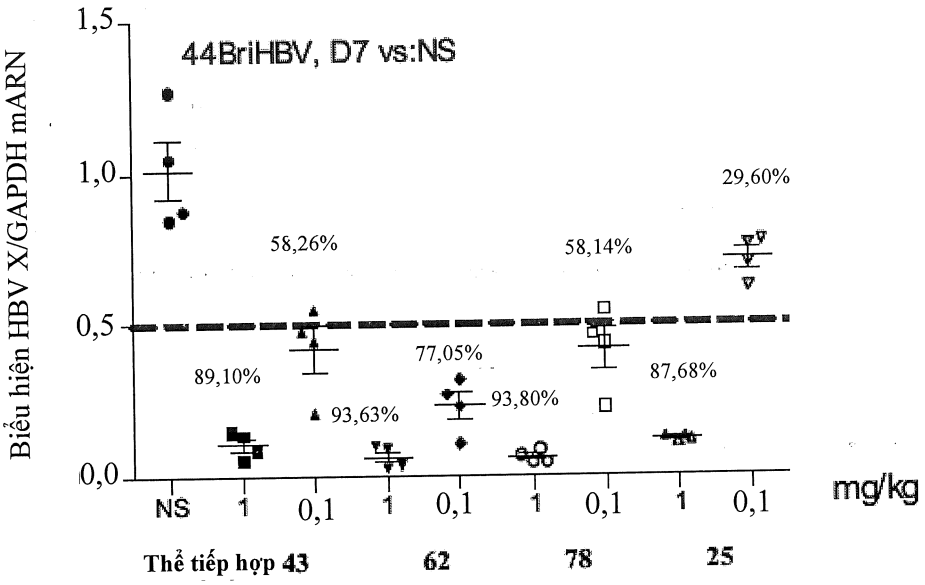

Biểu hiện HBV X/GAPDH mARN
1,5
1,0
0,5
0,0
44BriHBV, D7 vs:NS
29,60%
58,26%
58,14%
89,10%
77,05%
87,68%
93,63%
93,80%
NS
1
0,1
1
0,1
1
0,1
1
0,1
mg/kg
Thể tiếp hợp 43
62
78
25

Fig. 26

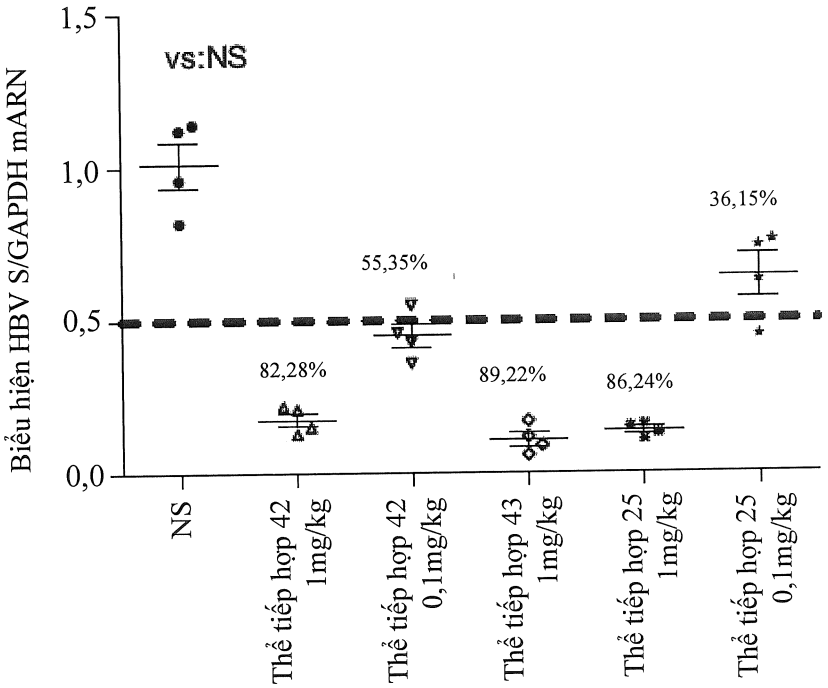

1,5
1,0
0,5
0,0
vs:NS
Biểu hiện HBV S/GAPDH mARN
82,28%
55,35%
89,22%
86,24%
36,15%
NS
Thể tiếp hợp 42 1mg/kg
Thể tiếp hợp 42 0,1mg/kg
Thể tiếp hợp 43 1mg/kg
Thể tiếp hợp 25 1mg/kg
Thể tiếp hợp 25 0,1mg/kg

Fig. 27

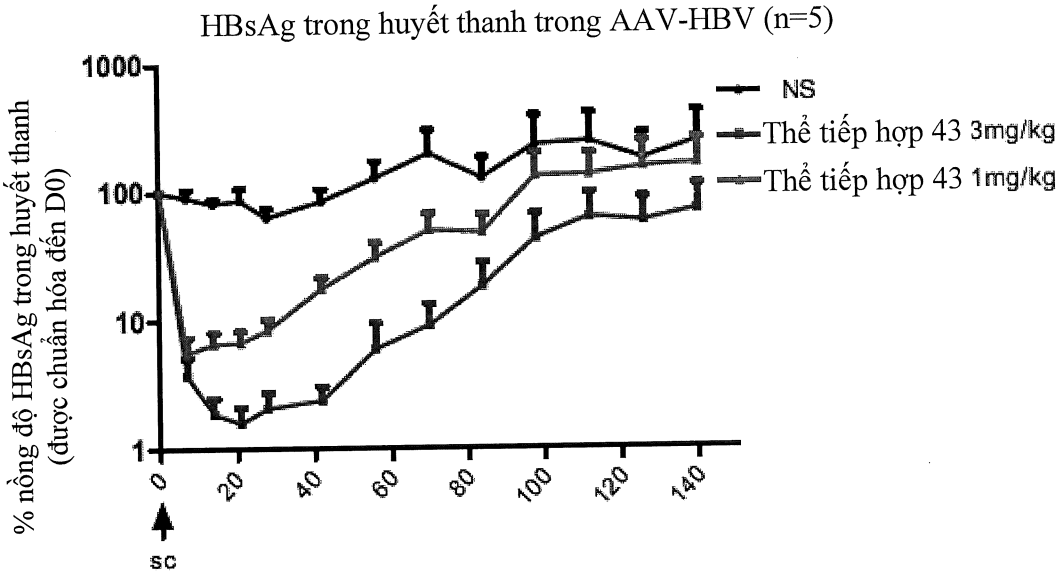

HBsAg trong huyết thanh trong AAV-HBV (n=5)
% nồng độ HBsAg trong huyết thanh (được chuẩn hóa đến D0)
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
120
140
sc
NS
Thể tiếp hợp 43 3mg/kg
Thể tiếp hợp 43 1mg/kg

Fig. 28

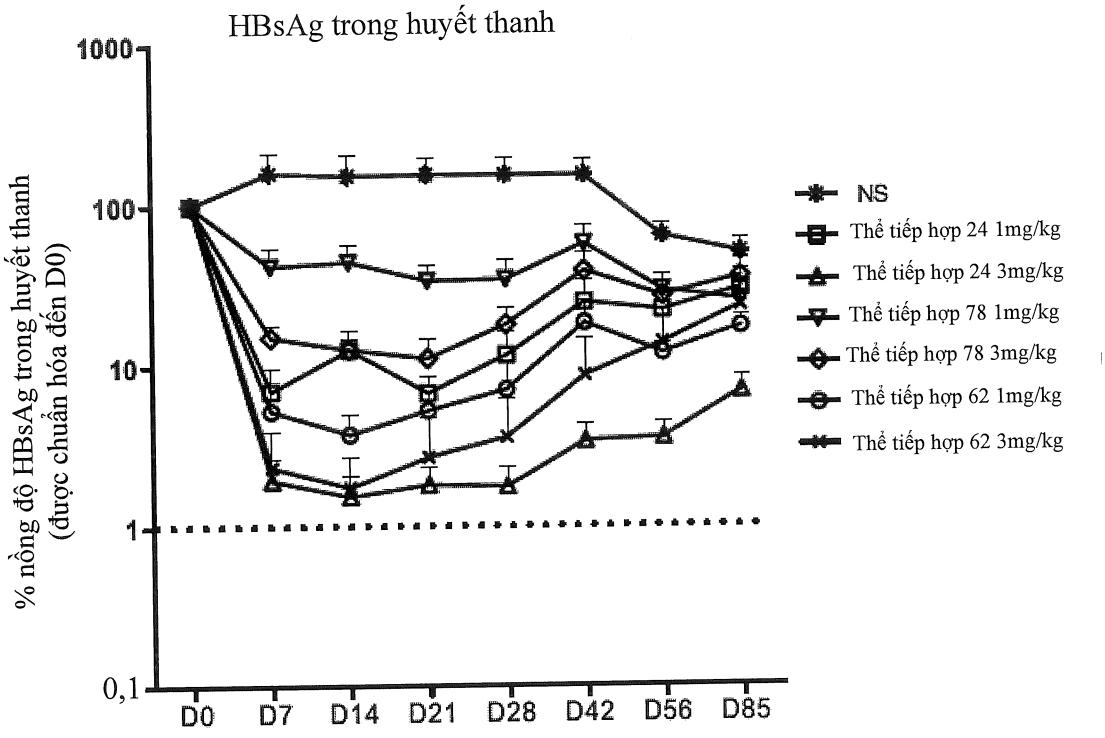

HBsAg trong huyết thanh
% nồng độ HBsAg trong huyết thanh (được chuẩn hóa đến D0)
1000
100
10
1
0,1
D0
D7
D14
D21
D28
D42
D56
D85
NS
Thể tiếp hợp 24 1mg/kg
Thể tiếp hợp 24 3mg/kg
Thể tiếp hợp 78 1mg/kg
Thể tiếp hợp 78 3mg/kg
Thể tiếp hợp 62 1mg/kg
Thể tiếp hợp 62 3mg/kg

Fig. 29

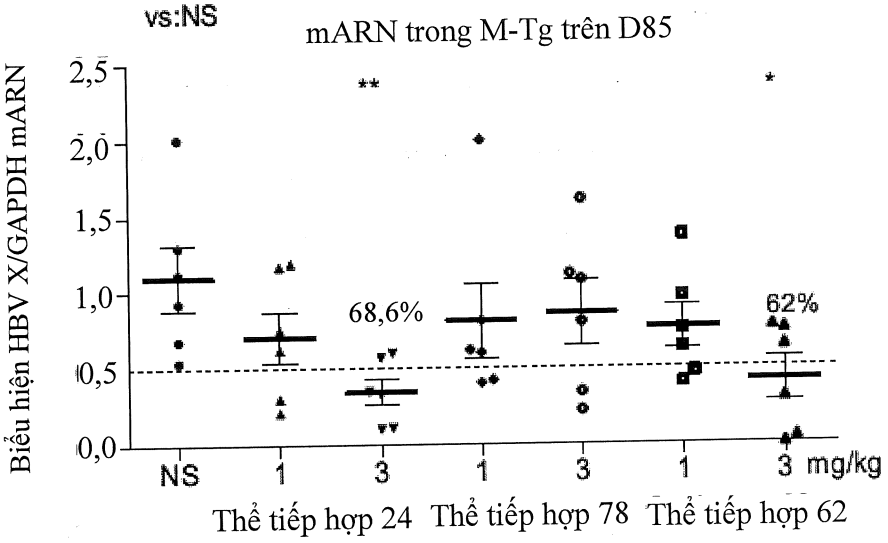

vs:NS
mARN trong M-Tg trên D85
Biểu hiện HBV X/GAPDH mARN
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
**
*
68,6%
62%
NS
1
3
1
3
1
3 mg/kg
Thể tiếp hợp 24
Thể tiếp hợp 78
Thể tiếp hợp 62

Fig. 30

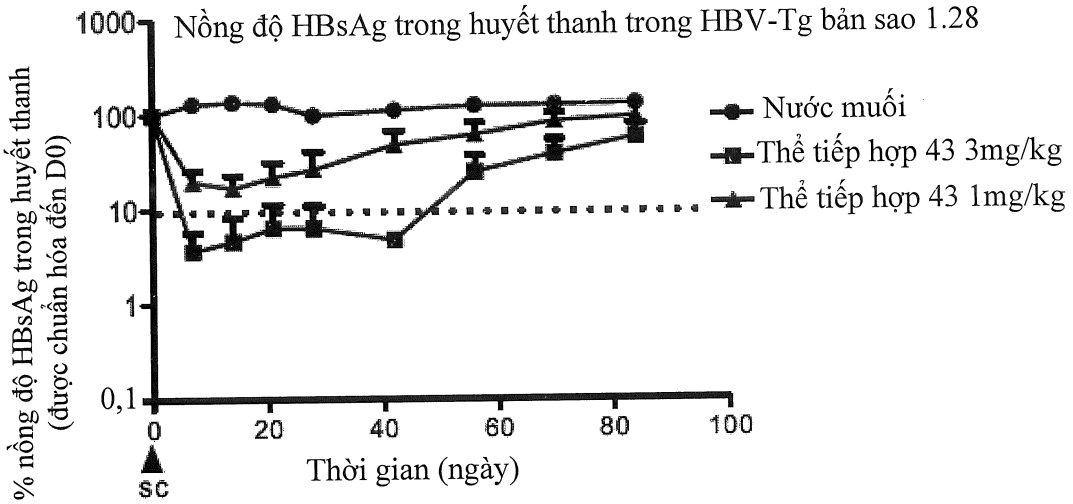

Nồng độ HBsAg trong huyết thanh trong HBV-Tg bản sao 1.28
% nồng độ HBsAg trong huyết thanh (được chuẩn hóa đến D0)
1000
100
10
1
0,1
0
20
40
60
80
100
SC
Thời gian (ngày)
Nước muối
Thể tiếp hợp 43 3mg/kg
Thể tiếp hợp 43 1mg/kg

Fig. 31

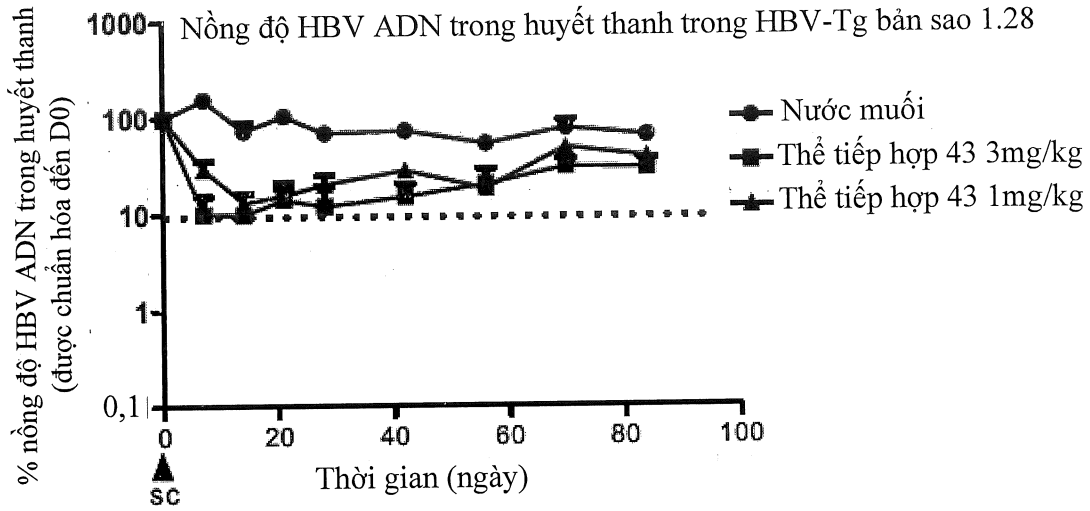

Nồng độ HBV ADN trong huyết thanh trong HBV-Tg bản sao 1.28
% nồng độ HBV ADN trong huyết thanh (được chuẩn hóa đến D0)
1000
100
10
1
0,1
0
20
40
60
80
100
SC
Thời gian (ngày)
Nước muối
Thể tiếp hợp 43 3mg/kg
Thể tiếp hợp 43 1mg/kg

Fig. 32

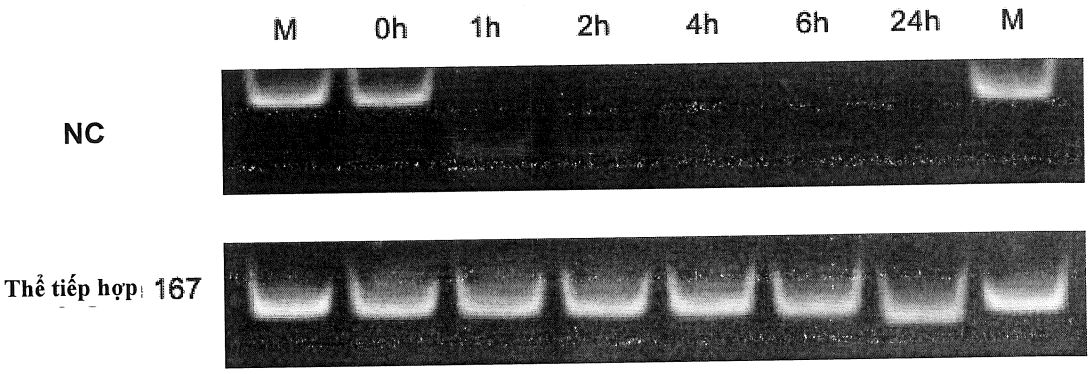

M
0h
1h
2h
4h
6h
24h
M
NC
Thể tiếp hợp 167

Fig. 33

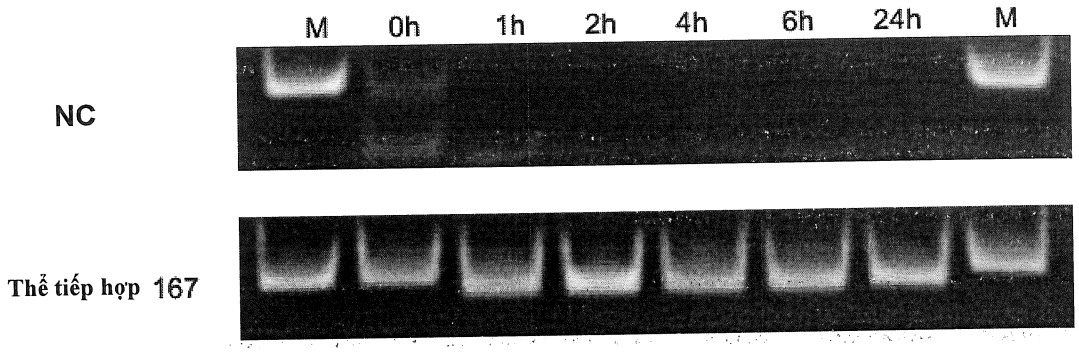

M
0h
1h
2h
4h
6h
24h
M
NC
Thể tiếp hợp 167

Fig. 34

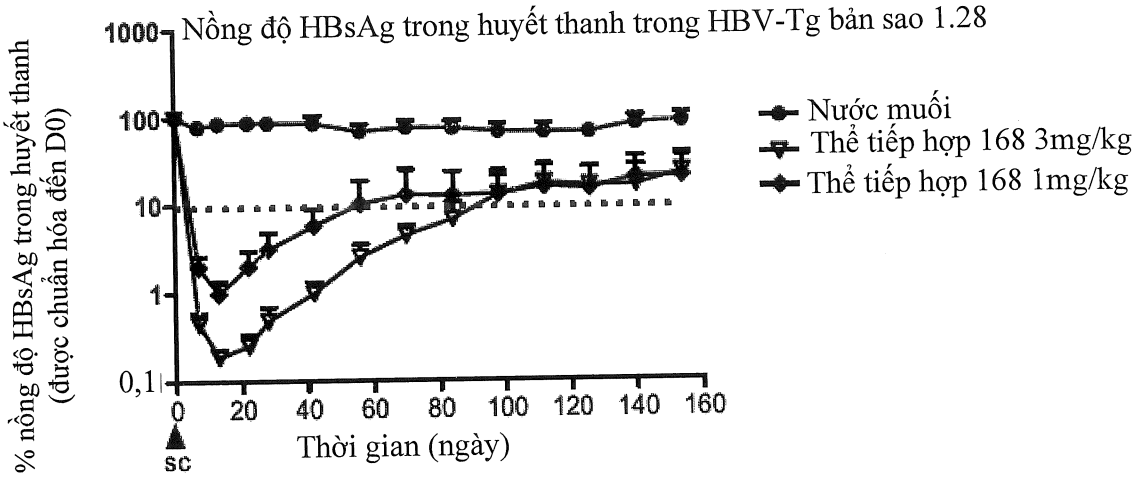

Nồng độ HBsAg trong huyết thanh trong HBV-Tg bản sao 1.28
% nồng độ HBsAg trong huyết thanh (được chuẩn hóa đến D0)
1000
100
10
1
0,1
0
20
40
60
80
100
120
140
160
SC
Thời gian (ngày)
Nước muối
Thể tiếp hợp 168 3mg/kg
Thể tiếp hợp 168 1mg/kg

Fig. 35

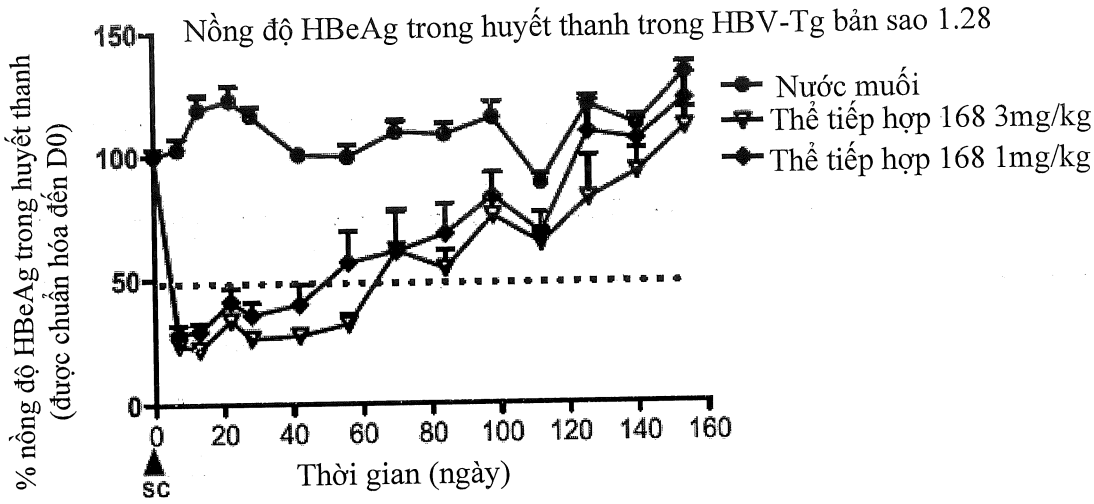

Nồng độ HBeAg trong huyết thanh trong HBV-Tg bản sao 1.28
% nồng độ HBeAg trong huyết thanh (được chuẩn hóa đến D0)
150
100
50
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
SC
Thời gian (ngày)
Nước muối
Thể tiếp hợp 168 3mg/kg
Thể tiếp hợp 168 1mg/kg

Fig. 36

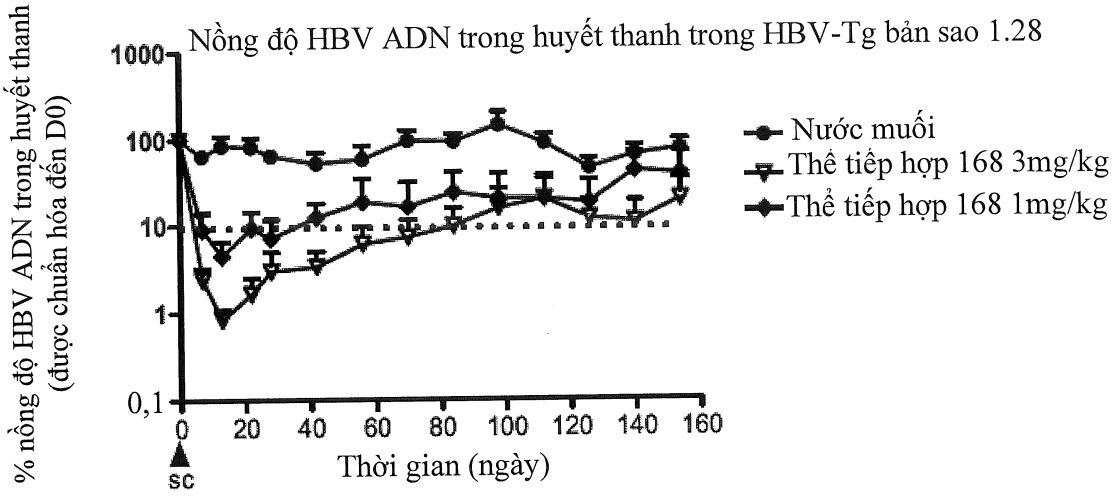


Fig. 37

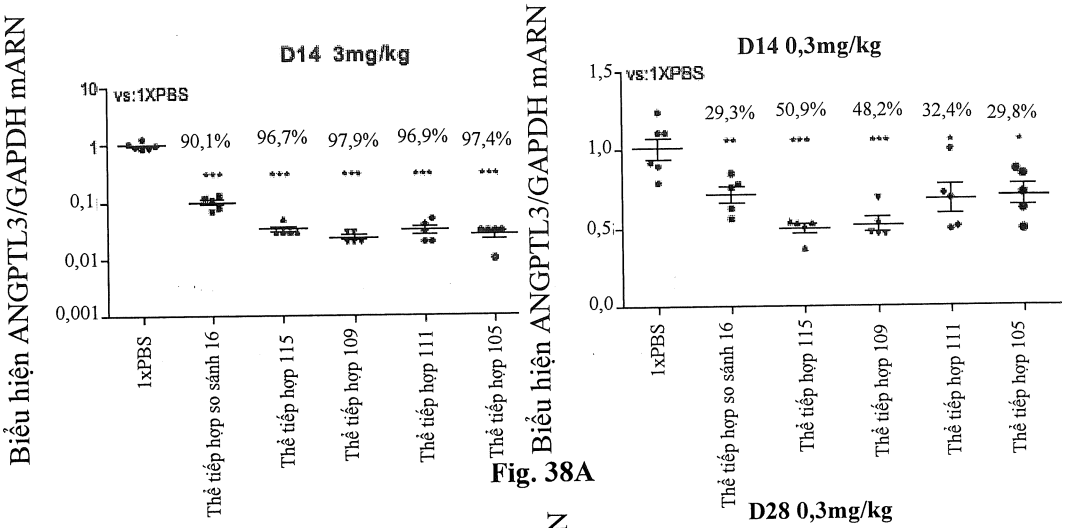


Fig. 38A

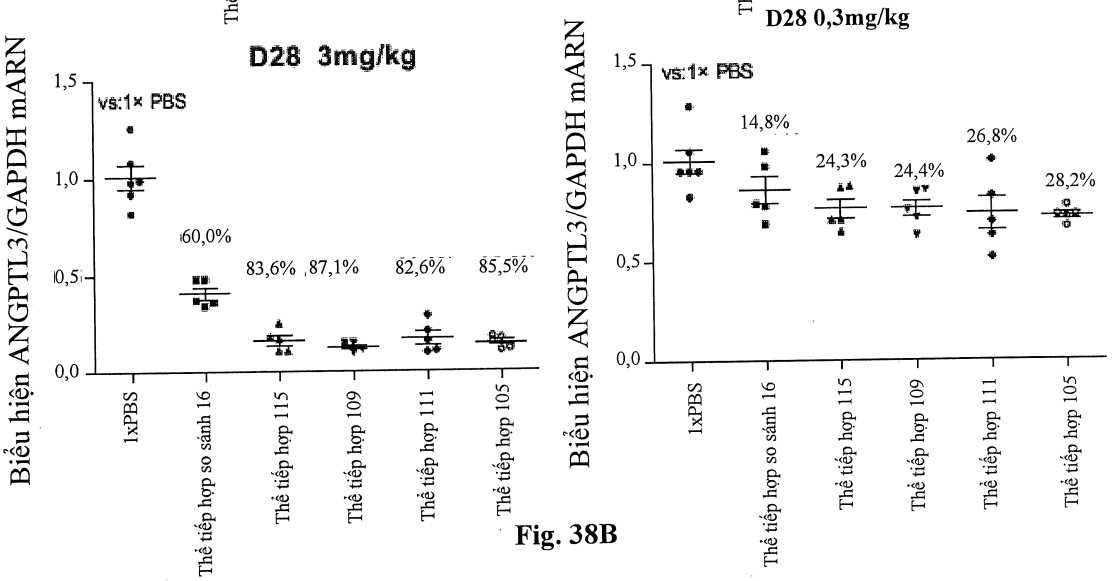


Fig. 38B

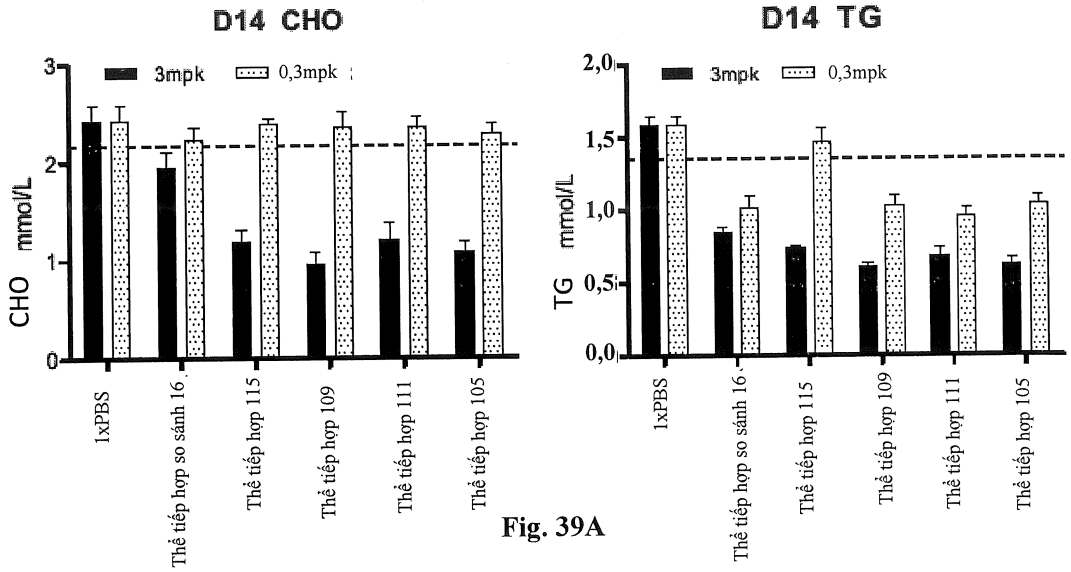


Fig. 39A

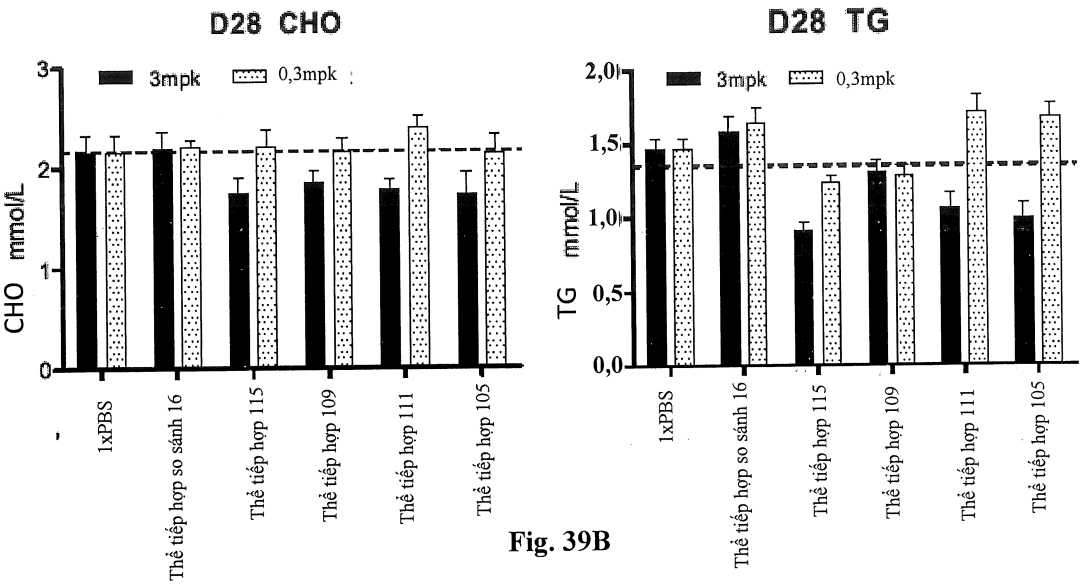


Fig. 39B

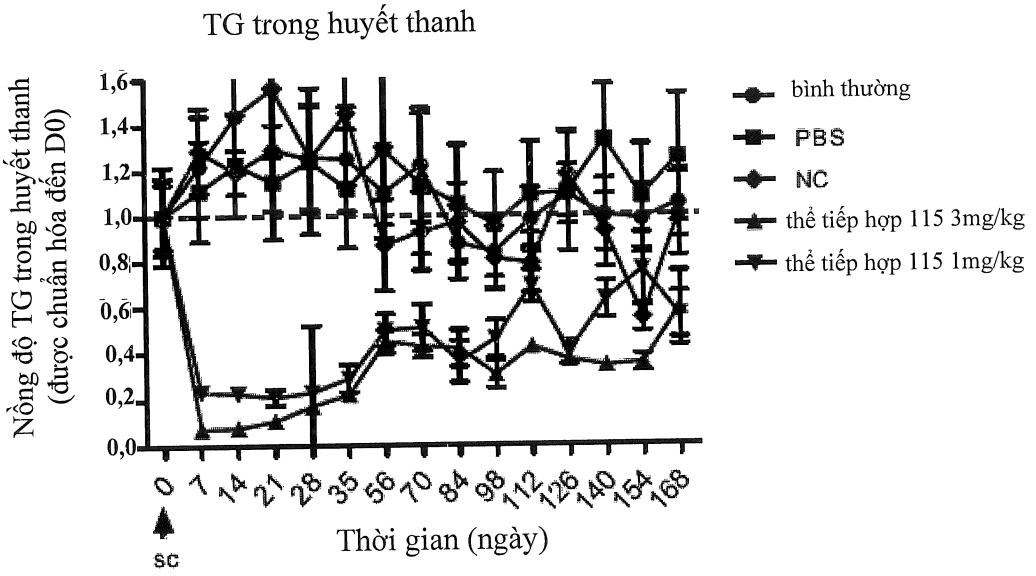


Fig. 40A

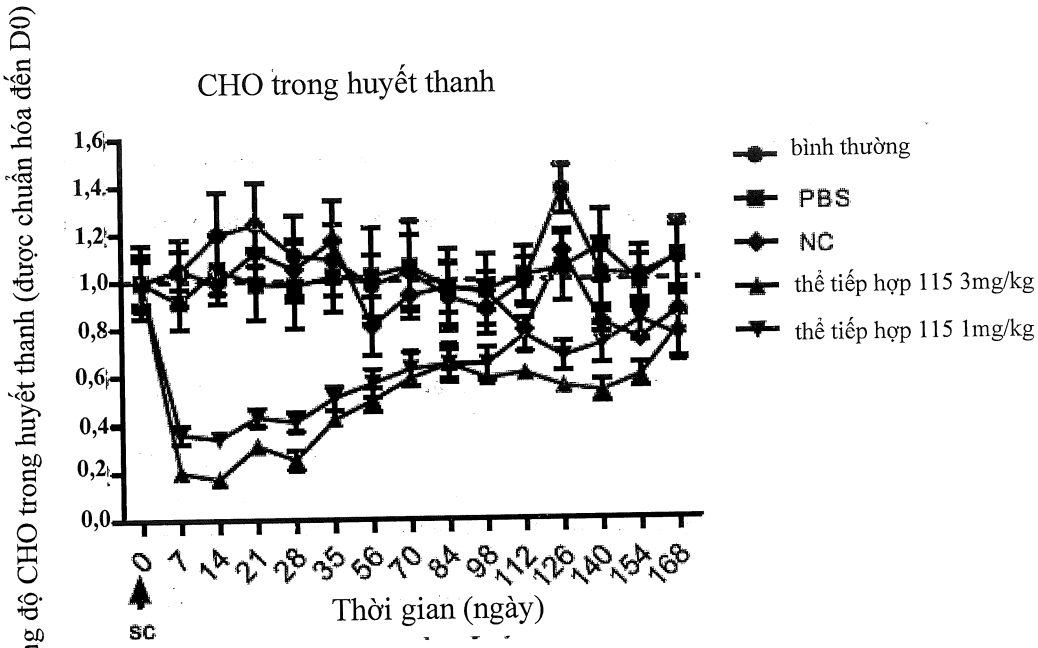


Fig. 40B

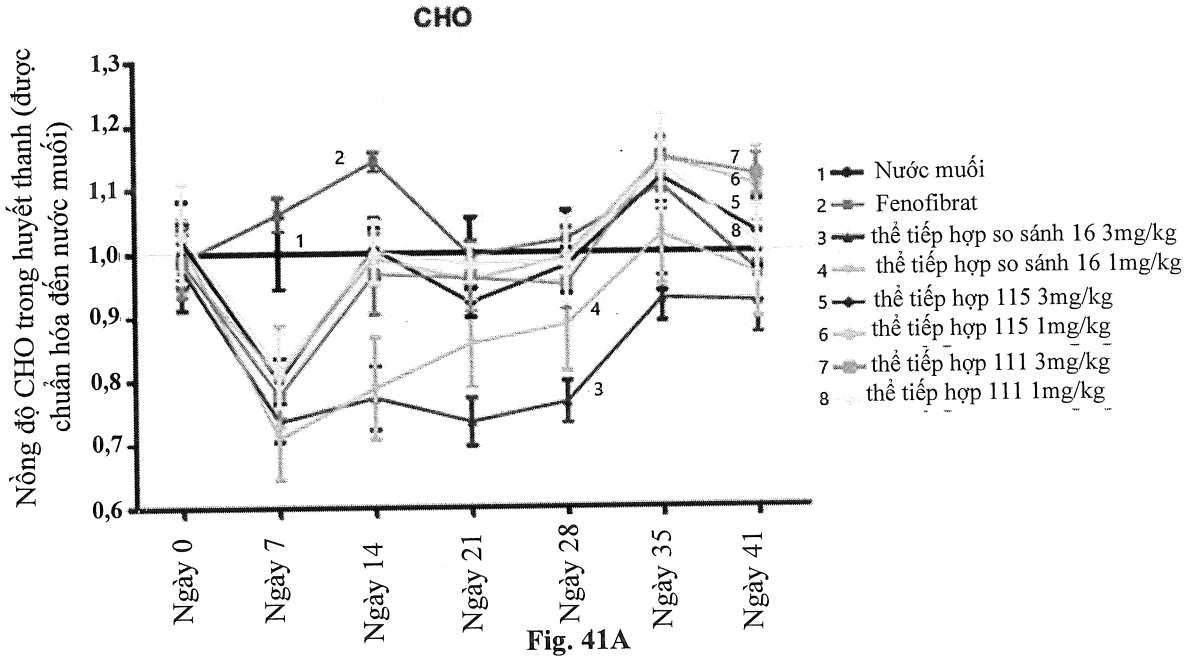


Fig. 41A

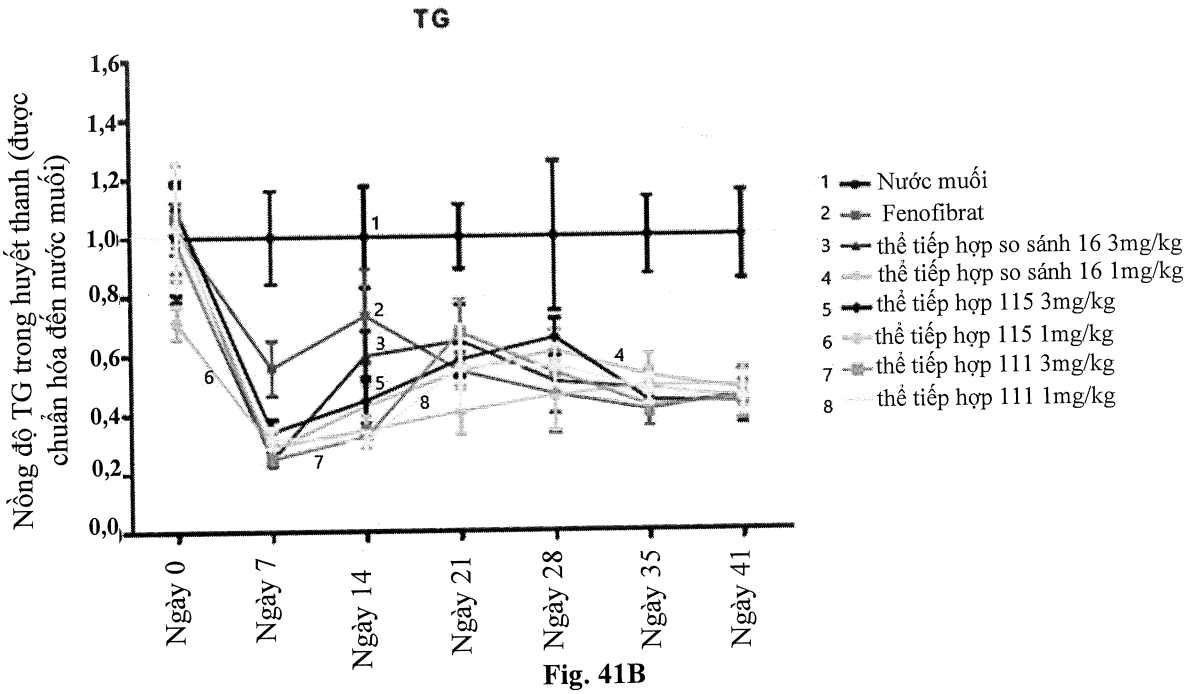


Fig. 41B

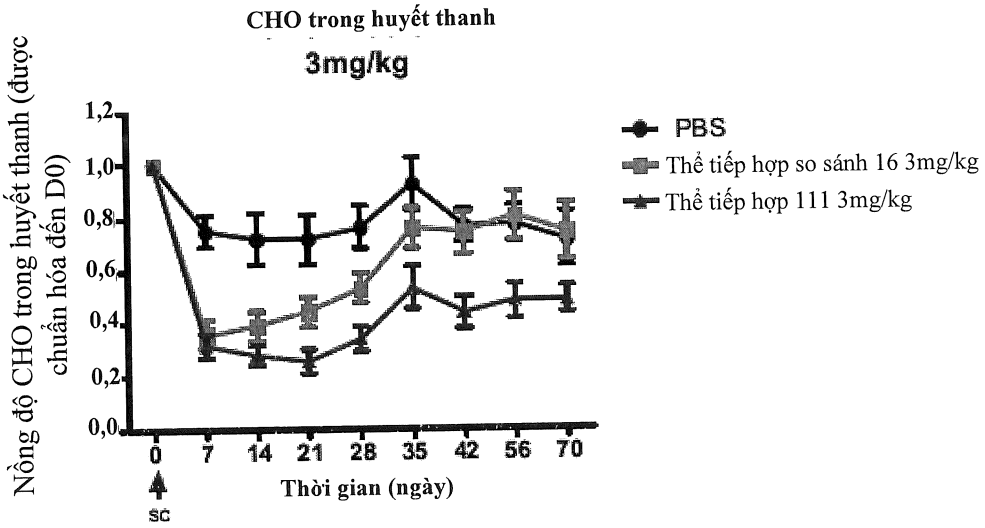


Fig. 42A

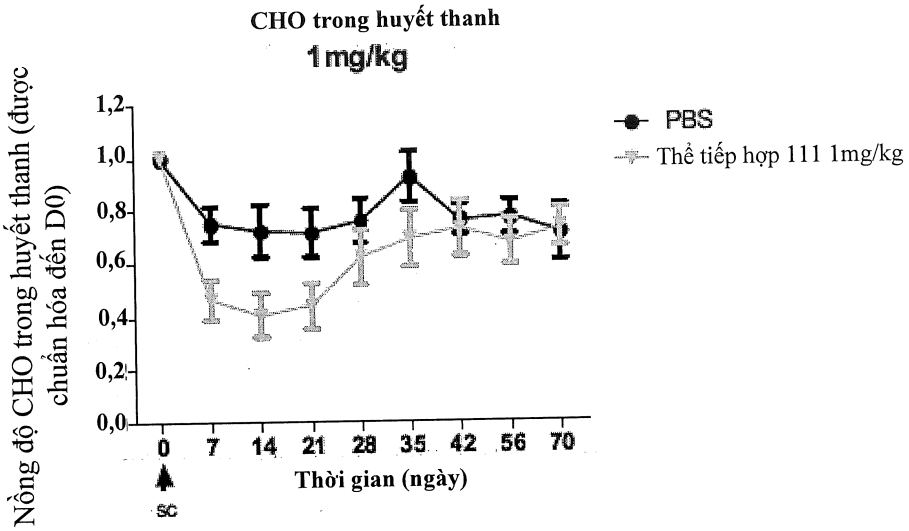


Fig. 42B

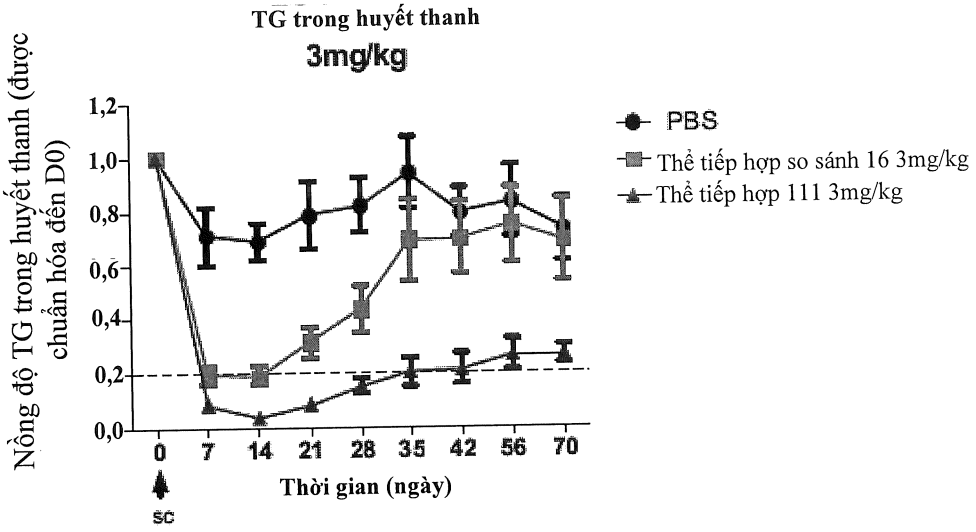


Fig. 42C

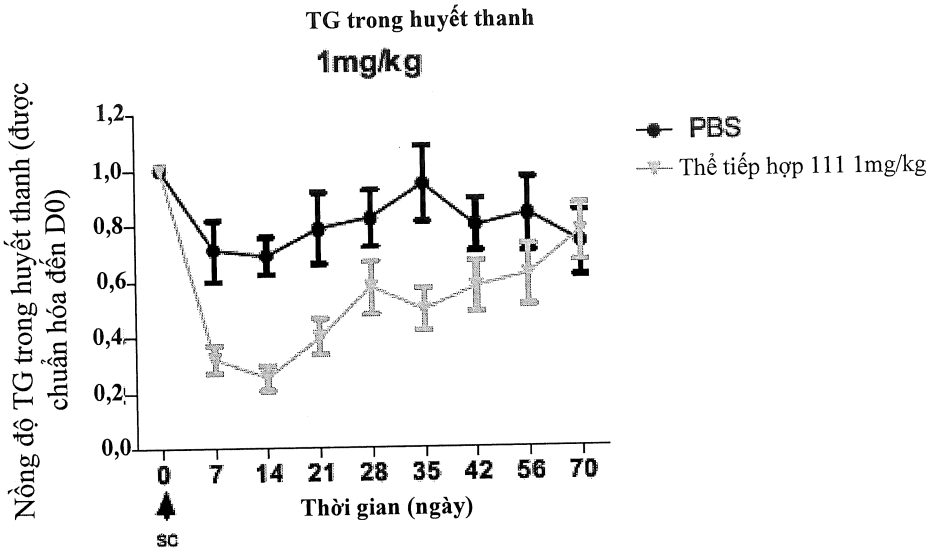


Fig. 42D

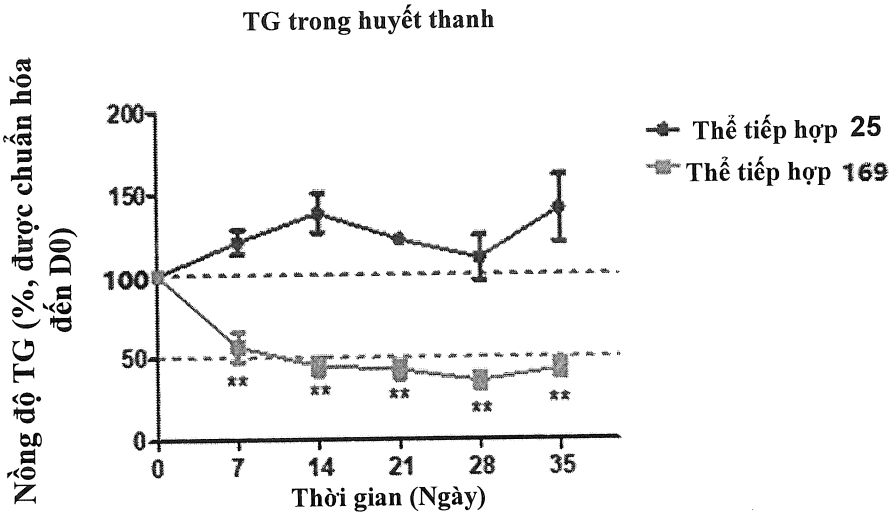


Fig. 43A

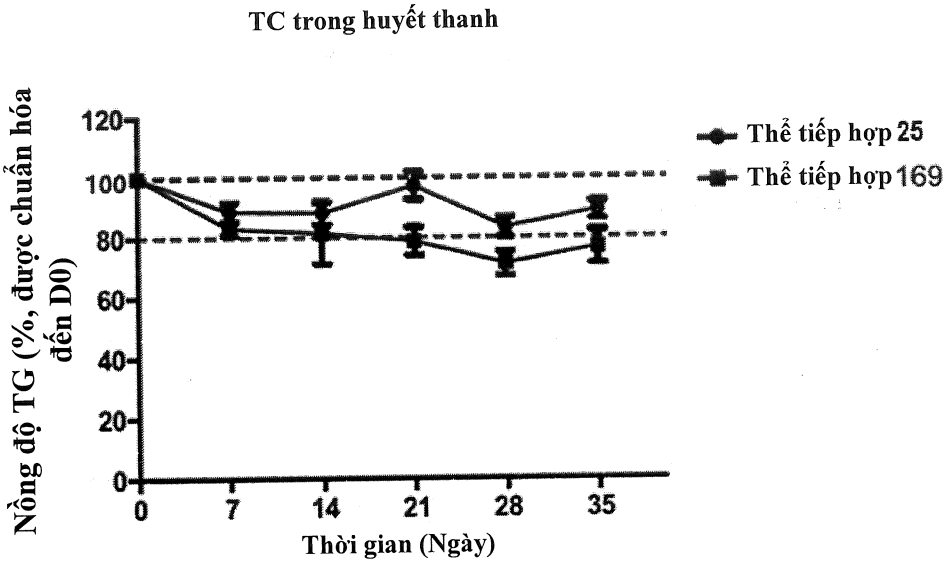


Fig. 43B

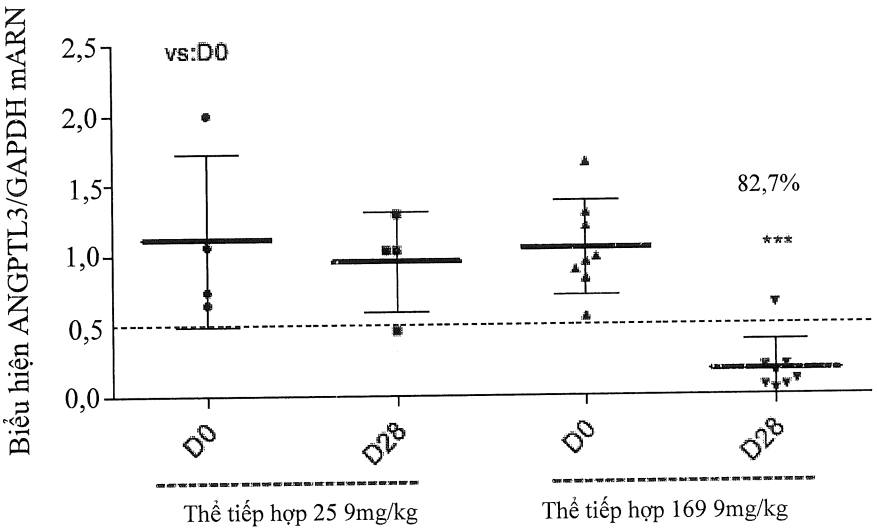


Fig. 43C

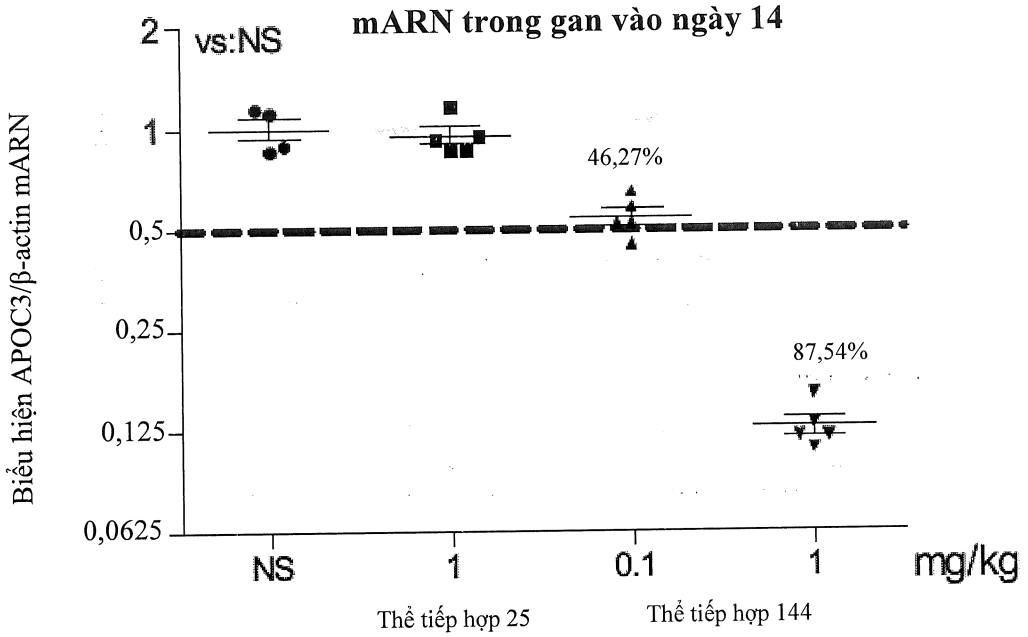


Fig. 44A

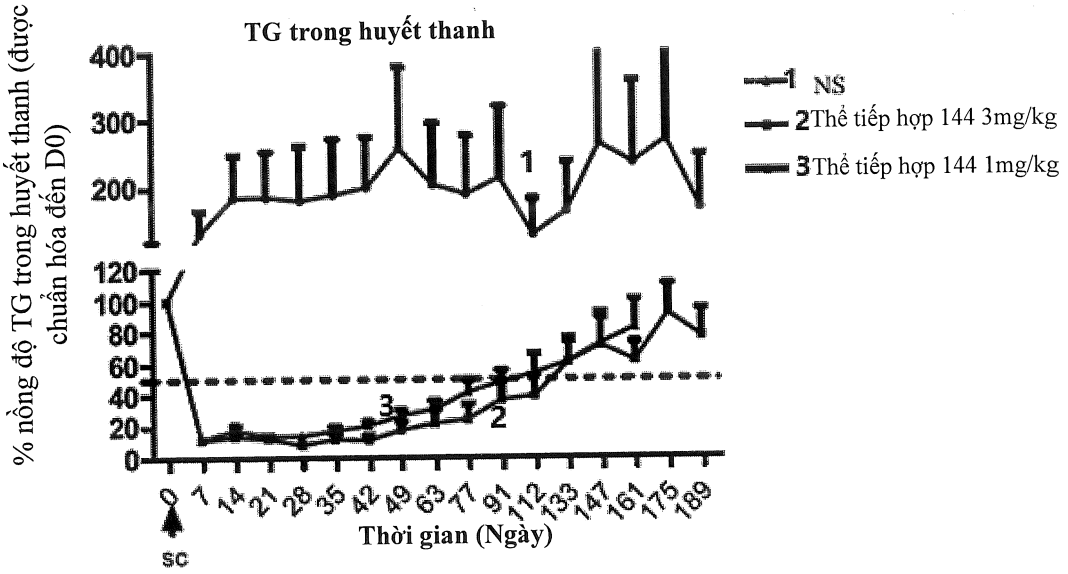


Fig. 44B

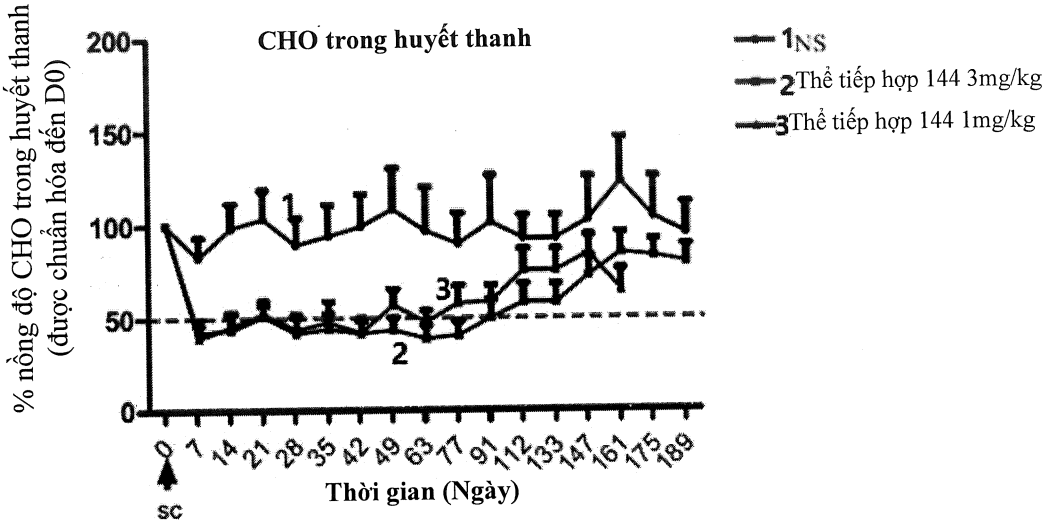


Fig. 44C

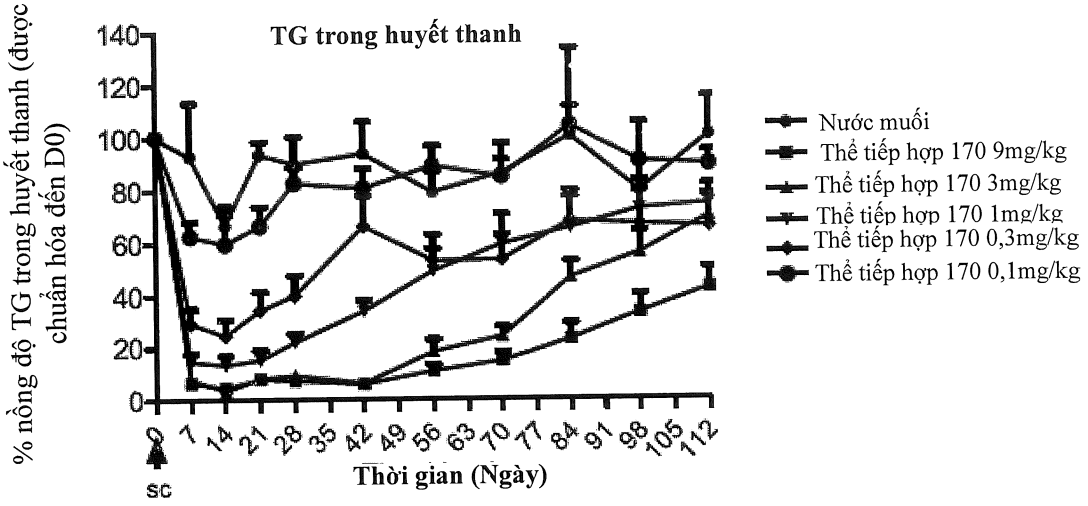


Fig. 45A

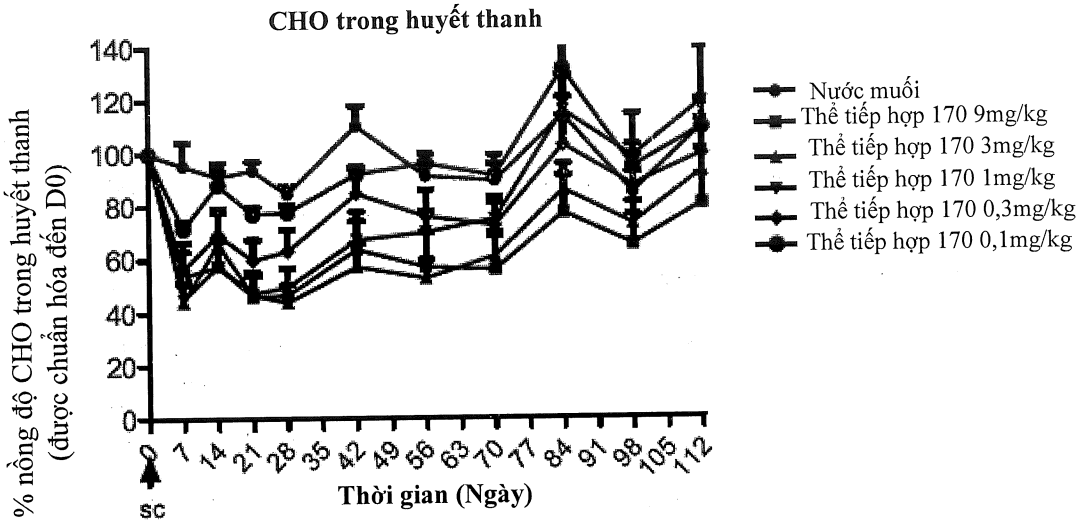


Fig. 45B

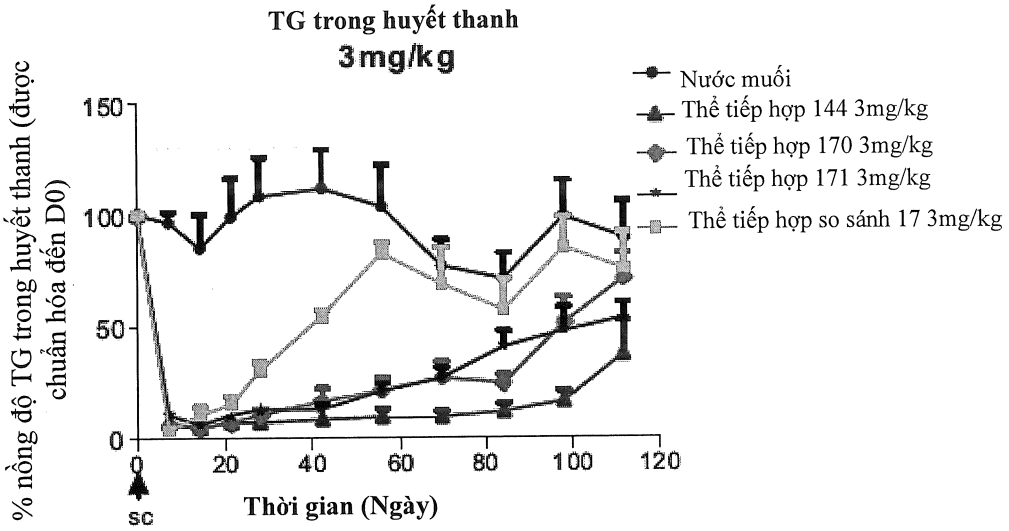


Fig. 46A

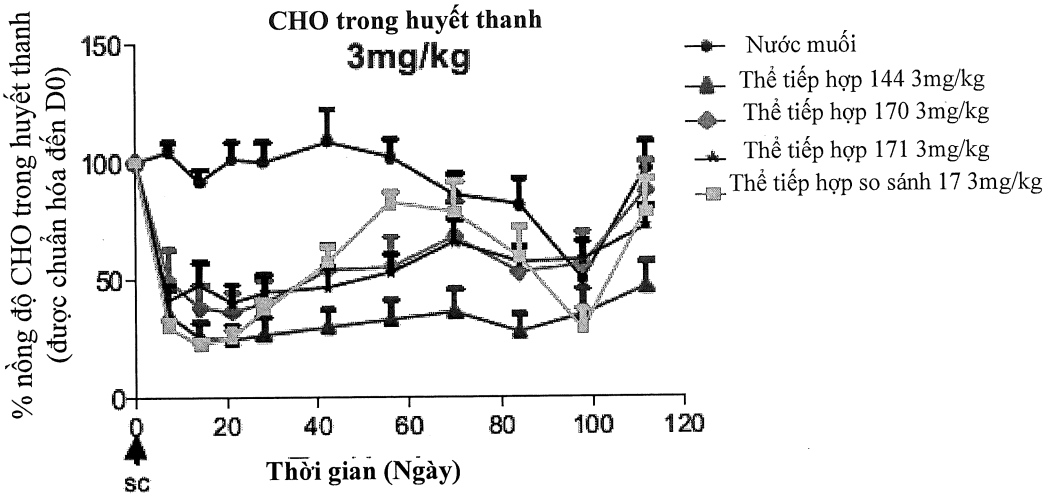


Fig. 46B

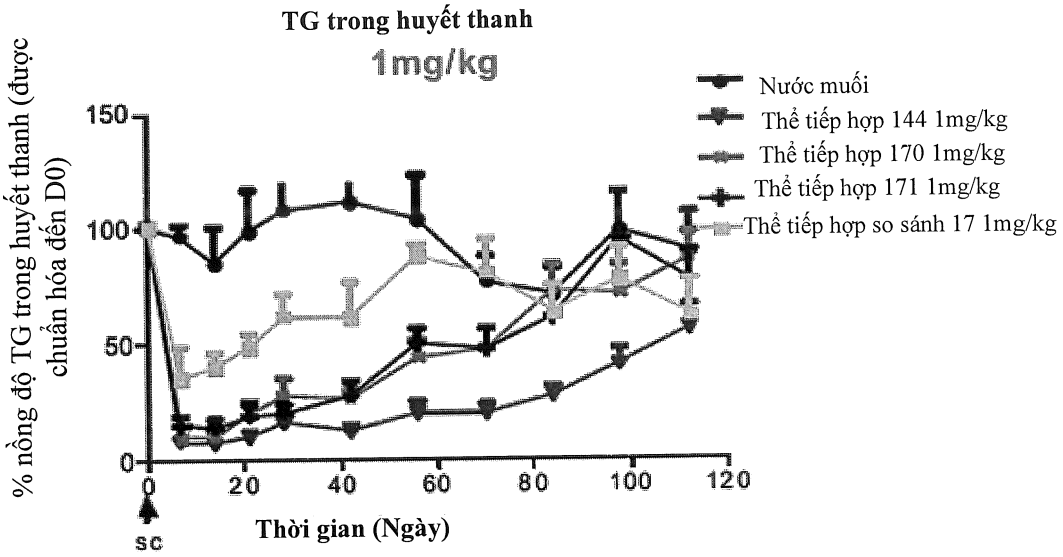


Fig. 46C

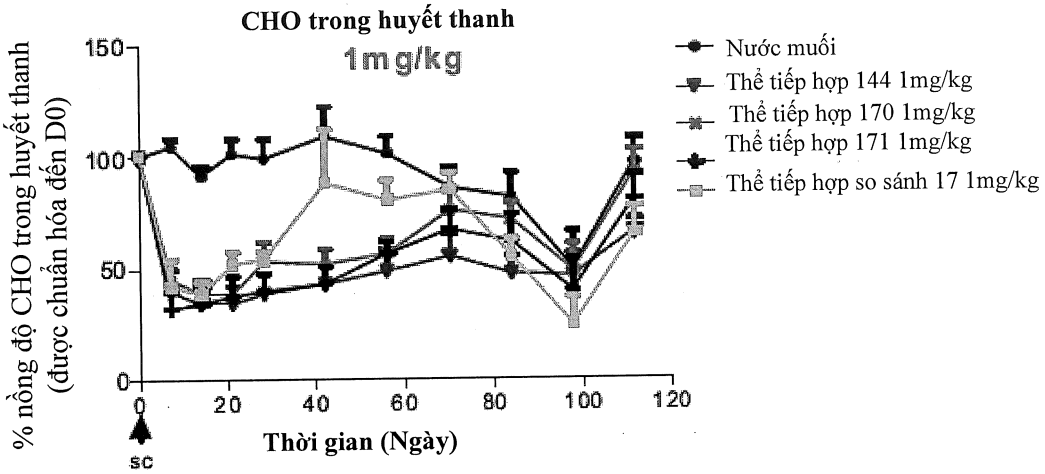


Fig. 46D