



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0049975

(51)^{2020.01} C12N 15/113; A61K 31/713; A61P 1/16 (13) B

(21) 1-2021-08123 (22) 21/05/2020
(86) PCT/CN2020/091489 21/05/2020 (87) WO2020/233655 26/11/2020
(30) 201910431319.2 22/05/2019 CN; 201910433243.7 23/05/2019 CN
(45) 25/08/2025 449 (43) 25/02/2022 407A
(73) SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD. (CN)
No.168, Yuanfeng Road, Yushan Town, Kunshan, Jiangsu 215300, China
(72) ZHANG, Hongyan (SE); GAO, Shan (CN); KANG, Daiwu (SE); TIAN, Baolei
(CN).
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) THỂ TIẾP HỢP SIARN

(21) 1-2021-08123

(57) Sáng chế đề cập đến siARN mà ức chế sự biểu hiện gen proprotein convertaza subtilisin/kexin typ 9 (PCSK9), được phẩm chứa siARN, và thể tiếp hợp. Mỗi nucleotit trong siARN độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến. siARN bao gồm mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa. Mạch có nghĩa chứa trình tự nucleotit I; trình tự nucleotit I có chiều dài bằng trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, với không quá ba khác biệt nucleotit. Mạch đối nghĩa chứa trình tự nucleotit II, trình tự nucleotit II có chiều dài bằng trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, với không quá ba khác biệt nucleotit. siARN, được phẩm của chúng và thể tiếp hợp có thể điều trị và/hoặc phòng ngừa hiệu quả chứng tăng cholesterol máu.

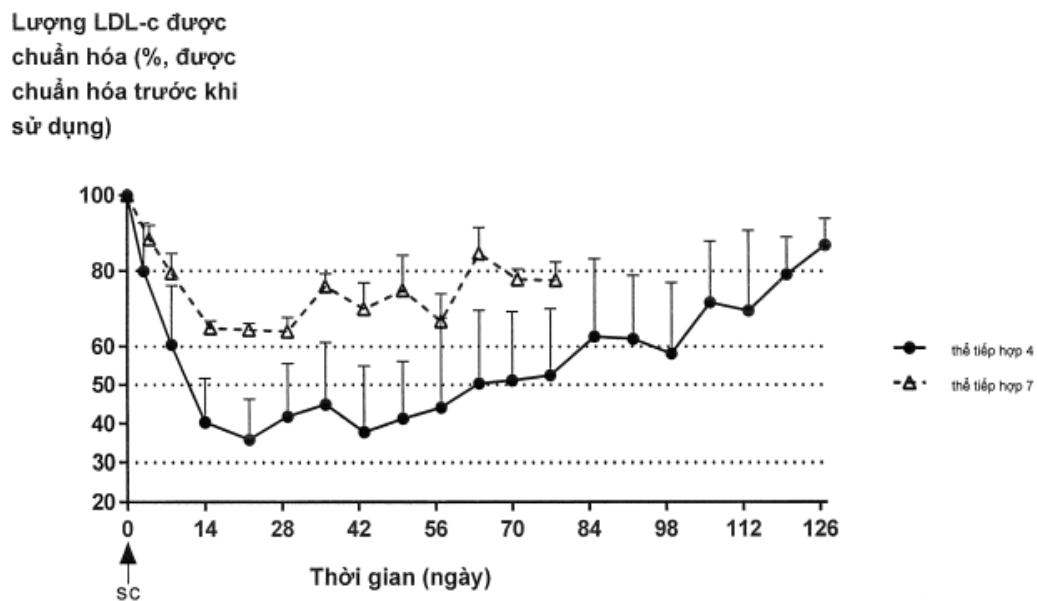


Fig.3

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến axit nucleic có khả năng ức chế sự biểu hiện của gen proprotein convertaza subtilisin/kexin typ 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9-PCSK9), được phẩm và thể tiếp hợp siARN. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất các axit nucleic này, được phẩm và thể tiếp hợp siARN.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Rối loạn lipid máu, đặc biệt là lượng lipoprotein cholesterol mật độ thấp (low-density lipoprotein cholesterol-LDL-c) cao liên tục, là một yếu tố nguy cơ quan trọng gây ra và thúc đẩy sự xuất hiện và sự phát triển chứng xơ vữa động mạch, và có liên quan mật thiết đến các bệnh mạch máu não và tim mạch do thiếu máu cục bộ, gây ra sự đe dọa nghiêm trọng đến sức khỏe con người. Các thuốc hiện nay để điều trị chứng rối loạn lipid máu chủ yếu bao gồm statin, chất ức chế hấp thu cholesterol, các nhựa, probucol, fibrat, niacin, và dẫn xuất của chúng. Việc sử dụng các thuốc làm hạ lipid để làm giảm lượng cholesterol trong huyết tương có thể làm giảm nguy cơ mắc bệnh tim mạch và các bệnh mạch máu não. Tuy nhiên, vẫn có một tỷ lệ đáng kể các bệnh nhân mà không đạt được lượng lipid mong muốn.

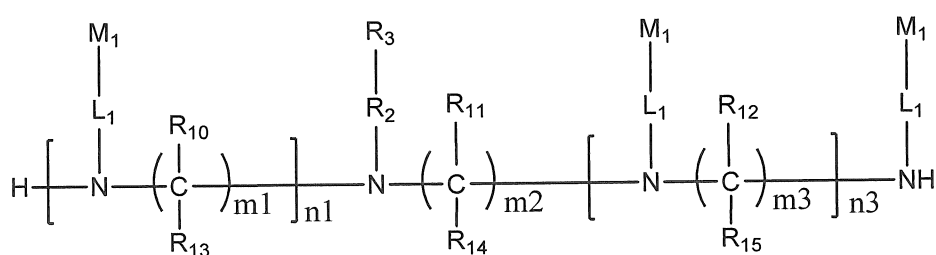
Các nghiên cứu chỉ ra rằng gen proprotein convertaza subtilisin/kexin typ 9 (PCSK9) đóng một vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa lipid, đặc biệt là quá trình chuyển hóa cholesterol. Bằng cách ức chế sự biểu hiện của gen PCSK9, lượng cholesterol trong huyết tương có thể được làm giảm một cách hiệu quả. Dựa trên cơ chế của ARN can thiệp (RNA interference-ARNi), ARN can thiệp nhỏ (small interfering RNA-siARN) có thể ức chế hoặc phong bế sự biểu hiện của gen đích quan tâm theo cách đặc hiệu trình tự, để đạt được mục đích điều trị bệnh việc ức chế sự biểu hiện của gen PCSK9 ở cấp độ mARN rõ ràng sẽ là cách điều trị lý tưởng nhất.

Chìa khóa để phát triển các thuốc siARN mà ức chế sự phát triển của gen PCSK9 và điều trị chứng tăng cholesterol máu là tìm ra siARN thích hợp và cải biến nó và hệ phân phối hiệu quả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng thể tiếp hợp siARN được đề xuất bởi sáng chế dưới đây là có khả năng ức chế đặc hiệu sự biểu hiện của gen PCSK9, và đặc biệt hướng vào gan và ức chế sự biểu hiện của gen PCSK9 trong gan, nhờ đó điều trị và phòng ngừa được chứng tăng cholesterol máu. Ngoài ra, các tác giả sáng chế còn tạo ra các siARN có hoạt tính cao hơn và các dược phẩm.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp siARN có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (308):



công thức (308),

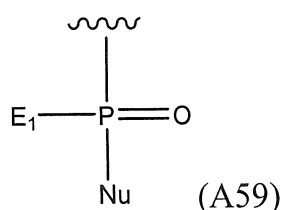
trong đó

$n1$ là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3, và $n3$ là một số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4;

$m1$, $m2$, hoặc $m3$ độc lập với nhau là một số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 10;

R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{14} , hoặc R_{15} độc lập với nhau là H, hoặc được chọn từ nhóm bao gồm C_1 - C_{10} alkyl, C_1 - C_{10} haloalkyl, và C_1 - C_{10} alkoxy;

R_3 là nhóm có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (A59):



trong đó,

E_1 là OH, SH hoặc BH_2 ;

Nu là siARN;

siARN bao gồm mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa; mỗi nucleotit trong siARN độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến; trong đó mạch có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II ít nhất bổ sung ngược một phần để tạo thành vùng mạch kép; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II là các trình tự được chọn từ một trong số các nhóm i)-vi) sau:

i) trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- AAGCAAGCAGACAUUUAUZ₁ -3' (SEQ ID NO: 1);

5'- Z₂AUAAAUGUCUGCUUGCUU -3' (SEQ ID NO: 2),

trong đó, Z₁ là C và Z₂ là G, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z₃ ở vị trí tương ứng với Z₁; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z₄ ở vị trí tương ứng với Z₂, trong đó Z₄ là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;

ii) trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 61 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 62 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- UUUGUAGCAUUUUUAUUAZ₅ -3' (SEQ ID NO: 61);

5'- Z₆UAAUAAAAAUGCUACAAA -3' (SEQ ID NO: 62),

trong đó, Z₅ là A và Z₆ là U, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z₇ ở vị trí tương ứng với Z₅; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z₈ ở vị trí tương ứng với Z₆, trong đó Z₈ là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;

iii) trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 121 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 122 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- GCCUGGAGUUUAUUCGGAZ₉ -3' (SEQ ID NO: 121);

5'- Z₁₀UCCGAAUAAACUCCAGGC -3' (SEQ ID NO: 122),

trong đó, Z₉ là A và Z₁₀ là U, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z₁₁ ở vị trí tương ứng với Z₉; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z₁₂ ở vị trí tương ứng với Z₁₀, trong đó Z₁₂ là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;

iv) trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 181 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 182 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- CUGUUUUGCUUUUGUAACZ₁₃ -3' (SEQ ID NO: 181);

5'- Z₁₄GUUACAAAAGCAAAACAG -3' (SEQ ID NO: 182),

trong đó, Z₁₃ là U và Z₁₄ là A, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z₁₅ ở vị trí tương ứng với Z₁₃; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z₁₆ ở vị trí tương ứng với Z₁₄, trong đó Z₁₆ là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;

v) trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 241 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 242 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- GGUUUUGUAGCAUUUUUAZ₁₇ -3' (SEQ ID NO: 241);

5'- Z₁₈UAAAAAUGCUACAAAACC -3' (SEQ ID NO: 242),

trong đó, Z₁₇ là U và Z₁₈ là A, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z₁₉ ở vị trí tương ứng với Z₁₇; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z₂₀ ở vị trí tương ứng với Z₁₈, trong đó Z₂₀ là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa; và

vi) trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 301 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 302 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- GUGACUUUUUAAAAUAAZ₂₁ -3' (SEQ ID NO: 301);

5'- Z₂₂UUUAUUUUAAAAAGUCAC -3' (SEQ ID NO: 302),

trong đó, Z_{21} là A và Z_{22} là U, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z_{23} ở vị trí tương ứng với Z_{21} ; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z_{24} ở vị trí tương ứng với Z_{22} , trong đó Z_{24} là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;

R_2 là alkylen mạch thẳng có chiều dài gồm từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tùy ý được thay thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, S(O)₂, C₂-C₁₀ alkenylen, C₂-C₁₀ alkynylen, C₆-C₁₀ arylen, C₃-C₁₈ heteroxycylen, và C₅-C₁₀ heteroarylen; và trong đó R_2 tùy ý có một hoặc nhiều nhóm thế bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: C₁-C₁₀ alkyl, C₆-C₁₀ aryl, C₅-C₁₀ heteroaryl, C₁-C₁₀ haloalkyl, -OC₁-C₁₀ alkyl, -OC₁-C₁₀ alkylphenyl, -C₁-C₁₀ alkyl-OH, -OC₁-C₁₀ haloalkyl, -SC₁-C₁₀ alkyl, -SC₁-C₁₀ alkylphenyl, -C₁-C₁₀ alkyl-SH, -SC₁-C₁₀ haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH₂, -C₁-C₁₀ alkyl-NH₂, -N(C₁-C₁₀ alkyl)(C₁-C₁₀ alkyl), -NH(C₁-C₁₀ alkyl), N(C₁-C₁₀ alkyl) (C₁-C₁₀ alkylphenyl), NH(C₁-C₁₀ alkylphenyl), xyano, nitro, -CO₂H, -C(O)O(C₁-C₁₀ alkyl), -CON(C₁-C₁₀ alkyl)(C₁-C₁₀ alkyl), -CONH(C₁-C₁₀ alkyl), -CONH₂, -NHC(O)(C₁-C₁₀ alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C₁-C₁₀ alkyl)C(O)(C₁-C₁₀ alkyl), -N(C₁-C₁₀ alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C₁-C₁₀ alkyl, -C(O)C₁-C₁₀ alkylphenyl, -C(O)C₁-C₁₀ haloalkyl, -OC(O)C₁-C₁₀ alkyl, -SO₂(C₁-C₁₀ alkyl), -SO₂(phenyl), -SO₂(C₁-C₁₀ haloalkyl), -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁-C₁₀ alkyl), -SO₂NH(phenyl), -NHSO₂(C₁-C₁₀ alkyl), -NHSO₂(phenyl), và -NHSO₂(C₁-C₁₀ haloalkyl);

Mỗi L_1 độc lập là alkylen mạch thẳng có chiều dài gồm từ 1 đến 70 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tùy ý được thay thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, S(O)₂, C₂-C₁₀ alkenylen, C₂-C₁₀ alkynylen, C₆-C₁₀ arylen, C₃-C₁₈ heteroxycylen, và C₅-C₁₀ heteroarylen; và trong đó L_1 tùy ý có một hoặc nhiều nhóm thế bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: C₁-C₁₀ alkyl, C₆-C₁₀ aryl, C₅-C₁₀ heteroaryl, C₁-C₁₀ haloalkyl, -OC₁-C₁₀ alkyl, -OC₁-C₁₀ alkylphenyl, -C₁-C₁₀ alkyl-OH, -OC₁-C₁₀ haloalkyl, -SC₁-C₁₀ alkyl, -SC₁-C₁₀ alkylphenyl, -C₁-C₁₀ alkyl-SH, -SC₁-C₁₀ haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH₂, -C₁-C₁₀ alkyl-NH₂, -N(C₁-C₁₀ alkyl)(C₁-C₁₀ alkyl), -NH(C₁-C₁₀ alkyl), N(C₁-C₁₀ alkyl) (C₁-C₁₀ alkylphenyl), NH(C₁-C₁₀ alkylphenyl), xyano, nitro, -CO₂H, -C(O)O(C₁-C₁₀ alkyl), -CON(C₁-C₁₀ alkyl)(C₁-C₁₀ alkyl), -CONH(C₁-C₁₀ alkyl), -CONH₂, -NHC(O)(C₁-C₁₀

alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C₁-C₁₀ alkyl)C(O)(C₁-C₁₀ alkyl), -N(C₁-C₁₀ alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C₁-C₁₀ alkyl, -C(O)C₁-C₁₀ alkylphenyl, -C(O)C₁-C₁₀ haloalkyl, -OC(O)C₁-C₁₀ alkyl, -SO₂(C₁-C₁₀ alkyl), -SO₂(phenyl), -SO₂(C₁-C₁₀ haloalkyl), -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁-C₁₀ alkyl), -SO₂NH(phenyl), -NHSO₂(C₁-C₁₀ alkyl), -NHSO₂(phenyl), và -NHSO₂(C₁-C₁₀ haloalkyl);

~~~~ là vị trí mà một nhóm được liên kết cộng hóa trị; và M<sub>1</sub> là nhóm hướng đích.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất siARN có khả năng ức chế sự biểu hiện của gen PCSK9, trong đó siARN bao gồm mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa; mỗi nucleotit trong mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa độc lập là nucleotit được cải biến có flo và nucleotit được cải biến không có flo; trong đó mạch có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit I và mạch đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II ít nhất bổ sung ngược một phần để tạo thành vùng mạch kép; nucleotit được cải biến có flo được nằm trong trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II; và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit I trong mạch có nghĩa là các nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong mạch có nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến không có flo; theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 2, 6, 14, và 16 của trình tự nucleotit II trong mạch đối nghĩa là các nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở phần còn lại của các vị trí trong mạch đối nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến không có flo; và trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II là các trình tự được chọn từ nhóm bất kỳ trong số các nhóm i)-iv) nêu trên.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm, chứa siARN theo sáng chế, và chất mang dược dụng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp siARN chứa siARN theo sáng chế và nhóm tiếp hợp được liên kết tiếp hợp với siARN.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả việc sử dụng siARN, và/hoặc dược phẩm, và/hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh lý do sự biểu hiện bất thường của gen PCSK9 gây ra.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh hoặc tình trạng bệnh lý do sự biểu hiện bất thường của gen PCSK9 gây ra,

bao gồm cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu của siARN, và/hoặc được phẩm, và/hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự biểu hiện của gen PCSK9 trong các tế bào gan, bao gồm cho các tế bào gan tiếp xúc với một lượng hữu hiệu của siARN, và/hoặc được phẩm, và/hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kit, chứa siARN, và/hoặc được phẩm, và/hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế.

#### Các hiệu quả có lợi

siARN, được phẩm, và thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có thể có độ ổn định tốt, hoạt tính ức chế đối với mRNA PCSK9 cao hơn, và độc tính và tác dụng ngoài đích thấp hơn, và/hoặc có thể điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh lý do sự biểu hiện bất thường của gen PCSK9 một cách đáng kể, như chứng tăng cholesterol máu.

Theo một số phương án, siARN, được phẩm hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có hoạt tính ức chế rất tốt đối với mRNA đích trong các thử nghiệm tế bào *in vitro*. Theo một số phương án, siARN, được phẩm hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có tỷ lệ ức chế đối với mRNA đích trong các tế bào gan ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 95%.

Theo một số phương án, siARN, được phẩm hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có thể có độ ổn định cao hơn và/hoặc hoạt tính *in vivo* cao hơn. Theo một số phương án, siARN, được phẩm hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có tỷ lệ ức chế đối với sự biểu hiện của gen đích *in vivo* ít nhất 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 95%. Theo một số phương án, siARN, được phẩm hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có tỷ lệ ức chế đối với sự biểu hiện của gen PCSK9 *in vivo* ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 95%. Theo một số phương án, siARN, được phẩm hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có tỷ lệ ức chế đối với sự biểu hiện của gen PCSK9 ở gan *in vivo* ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 95%. Theo một số phương án, siARN, được phẩm hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có tỷ lệ ức chế đối với sự biểu hiện của gen PCSK9 ở gan của các mẫu động vật *in vivo* ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 95%. Theo một số phương án, siARN, được phẩm hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có tỷ lệ ức chế đối với sự biểu hiện của gen PCSK9 ở gan của người *in vivo* ít nhất là 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%,

90% hoặc 95%. Theo một số phương án, siARN, được phẩm hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế không thể hiện tác dụng ngoài đích rõ ràng. Các tác dụng ngoài đích có thể là, ví dụ, ức chế sự biểu hiện bình thường của các gen không phải đích. Được tin rằng nếu việc gắn kết/ức chế sự biểu hiện của các gen ngoài đích là nhỏ hơn 50%, 40%, 30%, 20% hoặc 10% so với tác dụng trên gen đích, thì tác dụng ngoài đích là không đáng kể.

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế có hoạt tính ức chế cao hơn ở hệ psiCHECK, với các giá trị  $IC_{50}$  nằm trong khoảng từ 0,0194 nM đến 0,0561 nM đối với trình tự đích. Theo một số phương án, sau khi tiêm dưới da một liều 9 mg/kg vào khỉ cynomolgus, thể tiếp hợp siARN theo sáng chế thể hiện tỷ lệ ức chế đối với mRNA PCSK9 trong mô gan của NHP vào ngày 15 sau khi sử dụng lên đến 56-81% so với thời điểm ngày thứ 7 trước khi sử dụng. Theo một số phương án, thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có khả năng ức chế đối với sự biểu hiện của protein PCSK9 trong huyết thanh một cách đáng kể, và thể hiện tỷ lệ ức chế đối với sự biểu hiện protein PCSK9 trong huyết thanh lên đến hơn 90% vào ngày 14 sau khi sử dụng. Theo một số phương án, thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có thể ức chế đáng kể lượng LDL-c và CHO trong huyết thanh, và đặc biệt thể hiện tỷ lệ ức chế đối với LDL-c lên đến 30%, hoặc thậm chí lên đến 64% trong suốt giai đoạn từ ngày 14 đến ngày 29 sau khi sử dụng; thể tiếp hợp này cũng thể hiện tỷ lệ ức chế đối với CHO cao hơn, thậm chí lên đến hơn 35%. Theo một số phương án, sau khi sử dụng một liều đơn 9 mg/kg, thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có thể duy trì tỷ lệ ức chế đối với LDL-c cao hơn 50% trong 11 tuần, và thể tiếp hợp siARN theo sáng chế không thể hiện độc tính rõ ràng ở chuột cống hay chuột nhắt. Tóm lại, thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có tác dụng nhanh và thời gian tác dụng kéo dài, có thể ức chế đáng kể sự biểu hiện của mRNA đích, có thể làm giảm hiệu quả lượng protein PCSK9 trong huyết thanh, có tác dụng ức chế mạnh đến LDL-c và CHO trong huyết thanh, và có độ an toàn sinh học tốt.

Do đó, siARN, được phẩm và thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có thể ức chế sự biểu hiện của gen PCSK9, điều trị và/hoặc phòng ngừa hiệu quả bệnh hoặc các tình trạng bệnh do sự biểu hiện bất thường của gen PCSK9 gây ra, và do đó cho thấy một triển vọng ứng dụng đầy hứa hẹn.

Các đặc điểm và ưu điểm khác theo sáng chế sẽ được minh họa chi tiết trong phần “Mô tả chi tiết sáng chế” dưới đây.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A-1F thể hiện các đường cong liều-hiệu quả được xây dựng theo hoạt tính còn lại tương đối của gen báo cáo *Renilla* trong hệ thống psiCHECK sau khi chuyển nhiễm các siARN khác nhau (siARN 1-6).

Fig.2 thể hiện lượng protein PCSK9 được chuẩn hóa trong huyết thanh ở các thời điểm khác nhau sau khi tiêm dưới da một liều 9 mg/kg thể tiếp hợp 1, 4 hoặc 7 cho khỉ cynomolgus.

Fig.3 thể hiện lượng LDL-c được chuẩn hóa trong huyết thanh ở các thời điểm khác nhau sau khi tiêm dưới da một liều đơn 9 mg/kg thể tiếp hợp 4 hoặc 7 cho khỉ cynomolgus.

Fig.4 thể hiện lượng CHO được chuẩn hóa trong huyết thanh ở các thời điểm khác nhau sau khi tiêm dưới da một liều đơn 9 mg/kg thể tiếp hợp 4 hoặc 7 cho khỉ cynomolgus.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây là mô tả chi tiết về các phương án cụ thể của sáng chế. Cần hiểu rằng các phương án cụ thể được mô tả ở đây chỉ được sử dụng để minh họa và giải thích sáng chế và không được dự định là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Theo sáng chế, mARN PCSK9 là mARN của trình tự như được thể hiện trong số truy cập của ngân hàng gen NM\_174936.3. Hơn nữa, trừ khi được quy định theo cách khác, thuật ngữ “gen đích” được sử dụng trong sáng chế được dùng để chỉ gen mà có thể phiên mã thành mARN PCSK9 trên đây; và thuật ngữ “mARN đích” được dùng để chỉ mARN PCSK9 trên đây.

#### Các định nghĩa

Trong phạm vi sáng chế, trừ khi được quy định theo cách khác, C, G, U, A và T là thành phần bazơ của nucleotit; m biểu thị rằng nucleotit liền kề với bên trái của chữ cái m là nucleotit được cải biến có nhóm metoxy; f biểu thị rằng nucleotit liền kề với phía bên trái của chữ cái f là nucleotit được cải biến có flo; s biểu thị rằng hai nucleotit liền kề với cả hai phía của chữ cái s được liên kết với nhau bằng liên kết thiophosphat; P1 biểu thị rằng nucleotit liền kề với phía bên phải của P1 là nucleotit có nhóm 5'-phosphat hoặc

nucleotit được cải biến có nhóm tương tự 5'-phosphat, VP biểu thị rằng nucleotit liền kề với phía bên phải của VP là nucleotit được cải biến có nhóm vinyl phosphat; Ps biểu thị rằng nucleotit liền kề với phía bên phải của Ps là nucleotit được cải biến có nhóm thiophosphat; và P biểu thị rằng nucleotit liền kề với phía bên phải của chữ cái P là nucleotit có nhóm 5'-phosphat.

Trong phạm vi sáng chế, “nucleotit được cải biến có flo” được dùng để chỉ nucleotit được tạo thành bằng cách thay thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nguyên tử flo. Thuật ngữ “nucleotit được cải biến không có flo” được dùng để chỉ nucleotit được tạo thành bằng cách thay thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nhóm không có flo, hoặc nhóm tương tự nucleotit. Thuật ngữ “nhóm tương tự nucleotit” được dùng để chỉ nhóm mà có thể thay thế nucleotit trong axit nucleic, nhưng khác adenin ribonucleotit, guanin ribonucleotit, xytosin ribonucleotit, uraxil ribonucleotit, hoặc thymin deoxyribonucleotit về mặt cấu trúc, như isonucleotit, nucleotit cầu nối (axit nucleic cầu nối, BNA) hoặc nucleotit không vòng. Thuật ngữ “nucleotit được cải biến có nhóm metoxy” được dùng để chỉ nucleotit được tạo thành bằng cách thay thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nhóm metoxy.

Trong phạm vi sáng chế, thuật ngữ “bổ sung” và “bổ sung ngược” có thể được sử dụng thay đổi cho nhau, và có nghĩa đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, đó là, các bazơ trên mỗi một mạch được bắt cặp bổ sung với các bazơ trên mạch còn lại trong phân tử axit nucleic mạch kép. Trong các ADN, bazơ purin adenin (A) thường bắt cặp với bazơ pyrimidin thymin (T) (hoặc uraxil (U) trong các ARN); và bazơ purin guanin (G) thường bắt cặp với bazơ pyrimidin xytosin (C). Mỗi cặp bazơ bao gồm một purin và một pyrimidin. Nếu adenin trong một mạch luôn bắt cặp với thymin (hoặc uraxil) trong mạch khác, và guanin luôn bắt cặp với xytosin, thì hai mạch được coi là được bổ sung với nhau; và trình tự của một mạch có thể được suy ra từ trình tự của mạch bổ sung của nó. Do đó, thuật ngữ “bắt cặp nhằm” có nghĩa là các bazơ ở các vị trí tương ứng không có mặt theo cách bắt cặp bổ sung trong axit nucleic mạch kép.

Trong phạm vi sáng chế, trừ khi được quy định theo cách khác, “về cơ bản bổ sung ngược” có nghĩa là có không quá 3 bazơ bị bắt cặp nhằm giữa hai trình tự nucleotit. Thuật ngữ “bổ sung ngược đáng kể” có nghĩa là có không quá 1 bazơ bắt cặp nhằm giữa



hai trình tự nucleotit. Thuật ngữ “bổ sung ngược hoàn toàn” có nghĩa là không có bazơ bắt cặp nhầm giữa hai trình tự nucleotit.

Trong phạm vi sáng chế, khi trình tự nucleotit có “nucleotit khác” so với một trình tự nucleotit khác, thì các bazơ của các nucleotit ở cùng vị trí giữa nó bị thay đổi. Ví dụ, nếu bazơ nucleotit trong trình tự sau là A và bazơ nucleotit ở cùng vị trí trong trình tự trước là U, C, G, hoặc T, thì hai trình tự nucleotit được coi là có sự khác biệt về nucleotit ở vị trí này. Theo một số phương án, nếu nucleotit ở một vị trí được thay thế bằng nucleotit không phải purin hoặc pyrimidin hoặc nhóm tương tự nucleotit, thì được coi là có sự khác biệt về nucleotit ở vị trí này.

Trong phạm vi sáng chế, cụ thể là ở phần mô tả siARN, được phẩm, hoặc phương pháp sản xuất thể tiếp hợp siARN theo sáng chế, trừ khi được quy định theo cách khác, thuật ngữ “monome nucleosit” được dùng để chỉ, theo loại và trình tự của các nucleotit trong siARN hoặc thể tiếp hợp siARN được sản xuất, monome nucleosit phosphoramidit được cải biến hoặc không được cải biến (phosphoramidit ARN được cải biến hoặc không được cải biến; đôi khi phosphoramidit ARN được dùng để chỉ nucleosit phosphoramidit) được sử dụng trong phương pháp tổng hợp ở pha rắn sử dụng phosphoramidit. Phương pháp tổng hợp ở pha rắn sử dụng phosphoramidit là phương pháp đã biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dùng để tổng hợp ARN. Monome nucleosit được sử dụng trong sáng chế là các monome sẵn có trên thị trường.

Trong phạm vi sáng chế, trừ khi được quy định theo cách khác, thuật ngữ “tiếp hợp” có nghĩa là hai hoặc nhiều gốc hóa học mỗi gốc có chức năng riêng được liên kết với nhau thông qua liên kết cộng hóa trị. Do đó, thuật ngữ “thể tiếp hợp” được dùng để chỉ hợp chất được tạo thành bằng cách liên kết cộng hóa trị các gốc hóa học riêng. Hơn nữa, thuật ngữ “thể tiếp hợp siARN” là hợp chất được tạo thành bằng cách gắn kết cộng hóa trị một hoặc nhiều gốc hóa học với siARN mỗi gốc có chức năng riêng. Trong phần dưới đây, thể tiếp hợp siARN theo sáng chế đôi khi được gọi tắt là “thể tiếp hợp”. Theo phạm vi sáng chế, thể tiếp hợp siARN nên được hiểu là thuật ngữ chung của nhiều thể tiếp hợp siARN, hoặc thể tiếp hợp siARN được thể hiện bằng công thức hóa học. Trong phạm vi sáng chế, “các phân tử tiếp hợp” nên được hiểu là các hợp chất cụ thể có khả năng được tiếp hợp với siARN thông qua các phản ứng, nhờ đó cuối cùng tạo ra thể tiếp hợp siARN theo sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tùy ý” hoặc “một cách tùy ý” có nghĩa là sự kiện hoặc tình huống được mô tả sau đó có thể có hoặc không xảy ra, và thuật ngữ này bao gồm cả các trường hợp trong đó sự kiện hoặc tình huống xảy ra và các trường hợp mà sự kiện hoặc tình huống không xảy ra. Ví dụ, “alkyl tùy ý được thế” bao gồm cả “alkyl” và “alkyl được thế” như được nêu dưới đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng, đối với nhóm bất kỳ chứa một hoặc nhiều nhóm thế, thì các nhóm như vậy không được dự định là đưa vào kiểu thế bất kỳ hoặc các kiểu thế mà không thực hiện được trong không gian, không tổng hợp được hoặc vốn không ổn định.

Như được sử dụng ở đây, “alkyl” được dùng để chỉ alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có số nguyên tử cacbon được chỉ rõ, thường nằm trong khoảng từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon, ví dụ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, như 1 đến 8 hoặc 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Ví dụ, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alkyl bao gồm cả alkyl mạch thẳng và mạch nhánh có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Khi gốc alkyl có một số nguyên tử cacbon cụ thể được dùng để chỉ, cả dạng mạch thẳng và mạch nhánh có số nguyên tử cacbon đó được dự định là được bao gồm; do đó, ví dụ, “butyl” có nghĩa bao gồm cả n-butyl, sec-butyl, isobutyl, và t-butyl; “propyl” bao gồm cả n-propyl và isopropyl. Alkylen là một nhóm nhỏ của alkyl, được dùng để chỉ các gốc giống như alkyl, nhưng có hai điểm gắn kết.

Như được sử dụng ở đây, “alkenyl” được dùng để chỉ nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh chưa no có ít nhất một liên kết đôi cacbon-cacbon được tạo ra bằng cách loại bỏ tương ứng một phân tử hydro ra khỏi hai nguyên tử cacbon liền kề của alkyl gốc. Nhóm này có thể có cấu hình cis hoặc trans gồm (các) liên kết đôi. Các nhóm alkenyl điển hình bao gồm, nhưng không chỉ 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-2-yl, buta-1,3-dien-1-yl, buta-1,3-dien-2-yl; và nhóm tương tự. Theo các phương án nhất định, nhóm alkenyl có từ 2 đến 20 nguyên tử cacbon, và theo các phương án khác, có từ 2 đến 10, 2 đến 8, hoặc 2 đến 6 nguyên tử cacbon. Alkenylen là một tập hợp con của alkenyl, được dùng để chỉ các gốc giống như alkenyl, nhưng có hai điểm gắn kết.

Như được sử dụng ở đây, “alkynyl” được dùng để chỉ nhóm alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh chưa no có ít nhất một liên kết ba cacbon-cacbon được tạo ra bằng cách loại bỏ tương ứng hai phân tử hydro ra khỏi hai nguyên tử cacbon liền kề của alkyl gốc.

Các nhóm alkynyl điển hình bao gồm, nhưng không chỉ 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 nhóm tương tự. Theo các phương án nhất định, nhóm alkynyl có từ 2 đến 20 nguyên tử cacbon, và theo các phương án khác, có từ 2 đến 10, 2 đến 8, hoặc 2 đến 6 nguyên tử cacbon. Alkynylen là một nhóm nhỏ của alkynyl, được dùng để chỉ các gốc giống như alkynyl, nhưng có hai điểm gắn kết.

Như được sử dụng ở đây, “alkoxy” được dùng để chỉ nhóm alkyl có số nguyên tử cacbon được chỉ rõ gắn kết thông qua cầu oxy, ví dụ, metoxy, etoxy, propoxy, isopropoxy, n-butoxy, sec-butoxy, tert-butoxy, pentyloxy, 2-pentyloxy, isopentyloxy, neopentyloxy, hexyloxy, 2-hexyloxy, 3-hexyloxy, 3-methylpentyloxy, và nhóm tương tự. Nhóm alkoxy thường có từ 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, hoặc 1 đến 4 nguyên tử cacbon được gắn kết thông qua cầu oxy.

Như được sử dụng ở đây, “aryl” được dùng để chỉ gốc thu được từ hệ vòng hydrocacbon đơn vòng hoặc đa vòng thơm bằng cách loại bỏ nguyên tử hydro ra khỏi nguyên tử cacbon vòng. Hệ vòng hydrocacbon đơn vòng hoặc đa vòng thơm chỉ chứa một nguyên tử hydro và 6 đến 18 nguyên tử cacbon, trong đó ít nhất một vòng trong hệ vòng là không no hoàn toàn, tức là nó chứa hệ điện tử  $(4n+2)\pi$  vòng được chuyển vị theo thuyết Hückel. Các nhóm aryl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm như phenyl, fluorenyl, và naphthyl. Arylen là một tập hợp con của aryl, được dùng để chỉ các gốc giống như aryl, nhưng có hai điểm gắn kết.

Như được sử dụng ở đây, “nhóm thế halo” hoặc “halo” được dùng để chỉ flo, cloro, bromo, hoặc iodo, và thuật ngữ “halogen” bao gồm flo, clo, brom, hoặc iot.

Như được sử dụng ở đây, “haloalkyl” được dùng để chỉ alkyl như nêu trên đây trong đó số nguyên tử cacbon được chỉ rõ được thế bằng một hoặc nhiều (lên tới số tối đa cho phép) nguyên tử halogen. Ví dụ về haloalkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, triflometyl, diflometyl, 2-floetyl, hoặc penta-floetyl.

“Heteroxyclyl” được dùng để chỉ gốc vòng không thơm có từ 3 đến 18 cạnh ổn định mà chứa từ 2 đến 12 nguyên tử cacbon và từ 1 đến 6 nguyên tử khác loại được chọn từ nitơ, oxy hoặc lưu huỳnh. Trừ khi được chỉ ra theo cách khác trong bản mô tả, heteroxyclyl là hệ vòng đơn vòng, hai vòng, ba vòng hoặc bốn vòng mà có thể bao gồm (các) hệ vòng ngưng tụ hoặc có cầu nối. (Các) nguyên tử khác loại trong heteroxyclyl có

thể tùy ý được oxy hóa. Một hoặc nhiều nguyên tử nitơ, nếu có, tùy ý được tạo bậc bốn. Heteroxyclyl là no một phần hoặc no hoàn toàn. Heteroxyclyl có thể được gắn với phần còn lại của phân tử thông qua nguyên tử vòng bất kỳ. Các ví dụ về nhóm heteroxyclyl này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dioxolanyl, thienyl[1,3]dithianyl, decahydroisoquinolyl, imidazolyl, imidazolidinyl, isothiazolidinyl, isoxazolidinyl, morpholyl, octahydroindolyl, octahydroisoindolyl, 2-oxapiperazinyl, 2-oxapiperidinyl, 2-oxapyrrolidinyl, oxazolidinyl, piperidinyl, piperazinyl, 4-piperidonyl, pyrrolidinyl, pyrazolidinyl, quinuclidinyl, thiazolidinyl, tetrahydrofuryl, trithianyl, tetrahydropyranyl, thiomorpholyl, thiamorpholyl, 1-oxo-thiomorpholyl, và 1,1-dioxo-thiomorpholyl.

“Heteroaryl” được dùng để chỉ gốc thu được từ gốc vòng thơm có từ 3 đến 18 cạnh mà có từ 2 đến 17 nguyên tử cacbon và 1 đến 6 nguyên tử khác loại được chọn từ nitơ, oxy hoặc lưu huỳnh. Như được sử dụng ở đây, heteroaryl có thể là hệ vòng một vòng, hai vòng, ba vòng hoặc bốn vòng, trong đó ít nhất một vòng trong hệ vòng là no hoàn toàn, tức là, hệ vòng này chứa hệ điện tử  $(4n+2)\pi$  vòng được chuyển vị theo thuyết Hückel. Heteroaryl bao gồm (các) hệ vòng ngưng tụ hoặc cầu nối. (Các) nguyên tử khác loại trong heteroaryl tùy ý được oxy hóa. Một hoặc nhiều nguyên tử nitơ, nếu có, tùy ý được tạo bậc bốn. Heteroaryl được gắn với phần còn lại của phân tử thông qua nguyên tử vòng bất kỳ. Các ví dụ về heteroaryl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, azepinyl, acridinyl, benzimidazolyl, benzindolyl, 1,3-benzodioxazolyl, benzofuranyl, benzoxazolyl, benzo[d]thiazolyl, benzothiadiazolyl, benzo[b][1,4]dioxepinyl, benzo[b][1,4]oxazinyl, 1,4-benzodioxanyl, benzonaphthofuranyl, benzoaxazolyl, benzodioxolyl, benzodioxinyl, benzopyranyl, benzopyranonyl, benzofuranyl, benzofuranonyl, benzothienyl, benzothieno[3,2-d]pyrimidinyl, benzotriazolyl, benzo[4,6]imidazo[1,2-a]pyridinyl, carbazolyl, cinnolinyl, xyclopenta[d]pyrimidinyl, 6,7-dihydro-5H-xyclopenta[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidinyl, 5,6-dihydrobenzo[h]quinazolinyl, 5,6-dihydrobenzo[h]cinnolinyl, 6,7-dihydro-5H-benzo[6,7]xyclohepta[1,2-c]pyridazinyl, dibenzofuranyl, dibenzothienyl, furanyl, furanonyl, furo[3,2-c]pyridinyl, 5,6,7,8,9,10 hexahydroxycloocta[d]pyrimidinyl, 5,6,7,8,9,10-hexahydroxyclohepta[d]pyridazinyl, 5,6,7,8,9,10-hexahydroxycloocta[d]pyridinyl, isothiazolyl, imidazolyl, indazolyl, indolyl, isoindolyl, indolinyl, isoindolinyl, isoquinolyl, indolizinyl, isoxazolyl,

5,8-methano-5,6,7,8-tetrahydroquinazolinyl, naphthyridinonyl, 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, phthalazinyl, pteridinyl, purinyl, pyrrolyl, pyrazolyl, pyrazolo[3,4-d]pyrimidinyl, pyridinyl, pyrido[3,2-d]pyrimidinyl, pyrido[3,4-d]pyrimidinyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, pyridazinyl, quinazolinyl, quinoxalinyl, quinolinyl, tetrahydroquinolinyl, 5,6,7,8-tetrahydroquinazolinyl, 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidinyl, 6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-xyclohepta[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/thienyl.

Các nhóm bảo vệ hydroxyl khác nhau có thể được sử dụng trong sáng chế. Nói chung, các nhóm bảo vệ làm cho các nhóm chức hóa học trở với các điều kiện phản ứng cụ thể, và có thể được gắn vào và tách ra khỏi các nhóm chức này trong phân tử mà không làm ảnh hưởng đáng kể đến phần còn lại của phân tử. Các nhóm bảo vệ hydroxyl tiêu biểu được bộc lộ trong tài liệu Beaucage *et al.*, Tetrahedron 1992, 48, 2223-2311, và cũng được bộc lộ trong tài liệu Greene và Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Chapter 2, 2d ed, John Wiley & Sons, New York, 1991, mà lần lượt được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Theo một số phương án, nhóm bảo vệ là ổn định trong các điều kiện bazơ nhưng có thể được loại bỏ trong các điều kiện axit. Theo một số phương án, các ví dụ chung về các nhóm bảo vệ hydroxyl mà có thể được sử dụng ở đây bao gồm dimetoxyltrityl (DMT), monometoxyltrityl, 9-phenylxanthen-9-yl (Pixyl) và 9-(*p*-metoxyphenyl)xanthen-9-yl (Mox). Theo một số phương án, các ví dụ chung về các nhóm bảo vệ hydroxyl mà có thể được sử dụng ở đây bao gồm Tr (trityl), MMTr (4-metoxyltrityl), DMTr (4,4'-dimetoxyltrityl), và TMTr (4,4',4''-trimetoxyltrityl).

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

Như được sử dụng ở đây, “điều trị” được dùng để chỉ phương pháp đạt được các kết quả có lợi hoặc mong muốn, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở lợi ích điều trị.

Thuật ngữ “lợi ích điều trị” có nghĩa là loại trừ hoặc cải thiện rối loạn cơ bản cần điều trị. Ngoài ra, lợi ích điều trị đạt được bằng cách loại trừ hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng sinh lý có liên quan đến rối loạn cơ bản, nhờ đó quan sát được sự cải thiện ở đối tượng, mặc dù đối tượng này có thể vẫn mắc rối loạn cơ bản.

Như được sử dụng ở đây, “ngăn ngừa” được dùng để chỉ phương pháp thu được các kết quả có lợi hoặc mong muốn, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở lợi ích phòng bệnh. Để thu được “lợi ích phòng bệnh”, các thể tiếp hợp siARN hoặc được phẩm có thể được sử dụng cho đối tượng có nguy cơ phát triển bệnh cụ thể, hoặc cho đối tượng có một hoặc nhiều triệu chứng sinh lý của bệnh, ngay cả khi không được chẩn đoán bệnh này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất sáu siARN có khả năng ức chế sự biểu hiện của gen PCSK9.

siARN theo sáng chế bao gồm các nhóm nucleotit làm các đơn vị cấu trúc cơ bản. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ rằng nhóm nucleotit bao gồm nhóm phosphat, nhóm riboza và bazơ. Minh họa chi tiết về các nhóm này không được đề cập ở đây.

siARN theo sáng chế bao gồm mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa. Mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa có chiều dài bằng nhau hoặc khác nhau, trong đó mạch có nghĩa có chiều dài gồm 19 đến 23 nucleotit, và mạch đối nghĩa có chiều dài gồm 19 đến 26 nucleotit. Trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN theo sáng chế có thể là 19/19, 19/20, 19/21, 19/22, 19/23, 19/24, 19/25, 19/26, 20/20, 20/21, 20/22, 20/23, 20/24, 20/25, 20/26, 21/20, 21/21, 21/22, 21/23, 21/24, 21/25, 21/26, 22/20, 22/21, 22/22, 22/23, 22/24, 22/25, 22/26, 23/20, 23/21, 23/22, 23/23, 23/24, 23/25 hoặc 23/26. Theo một số phương án, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN là 19/21, 21/23 hoặc 23/25.

siARN thứ nhất

Theo sáng chế, siARN có thể là siARN thứ nhất.

siARN thứ nhất bao gồm mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa, và mỗi nucleotit trong siARN thứ nhất độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến, trong đó mạch có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II ít nhất bổ sung ngược một phần để tạo thành

vùng mạch kép; trong đó trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- AAGCAAGCAGACAUUUAUZ<sub>1</sub> -3'(SEQ ID NO: 1);

5'- Z<sub>2</sub>AUAAAUGUCUGCUUGCUU -3'(SEQ ID NO: 2),

trong đó, Z<sub>1</sub> là C và Z<sub>2</sub> là G, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z<sub>3</sub> ở vị trí tương ứng với Z<sub>1</sub>; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z<sub>4</sub> ở vị trí tương ứng với Z<sub>2</sub>, trong đó Z<sub>4</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;

trong phạm vi sáng chế, “vị trí tương ứng” được dùng để chỉ, cùng một vị trí trong nucleotit khi tính từ cùng một đầu của trình tự nucleotit. Ví dụ, nucleotit thứ nhất ở đầu 3' của trình tự nucleotit I là nucleotit ở vị trí tương ứng với nucleotit thứ nhất ở đầu 3' của SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, mạch có nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit II.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 khác nhau không quá 1 nucleotit, và/hoặc trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 khác nhau không quá 1 nucleotit.

Theo một số phương án, nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 bao gồm khác nhau ở vị trí Z<sub>4</sub>, trong đó Z<sub>4</sub> được chọn từ A, U hoặc C. Theo một số phương án, nucleotit khác nhau này là khác nhau ở vị trí Z<sub>4</sub>, trong đó Z<sub>4</sub> được chọn từ A, U hoặc C. Theo một số phương án, Z<sub>3</sub> là nucleotit bổ sung với Z<sub>4</sub>. siARN với các nucleotit khác nhau nêu trên có khả năng ức chế đối với mARN đích cao hơn và các siARN bao gồm các nucleotit khác nhau này đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II về cơ bản là bổ sung ngược, bổ sung ngược đáng kể, hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau; “về cơ bản bổ sung ngược” có nghĩa là có không quá 3 bazơ bị bắt cặp nhầm giữa hai trình tự nucleotit; “bổ sung ngược đáng kể” có nghĩa là có không quá 1 bazơ bắt cặp nhầm giữa

hai trình tự nucleotit; “bổ sung ngược hoàn toàn” có nghĩa là không có bất cặp nhằm giữa hai trình tự nucleotit.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3, và trình tự nucleotit II là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4:

5'-AAGCAAGCAGACAUUUAU<sub>Z<sub>3</sub></sub>-3'(SEQ ID NO: 3);

5'-Z<sub>4</sub>AUAAAUGUCUGCUUGCUU-3'(SEQ ID NO: 4),

trong đó, Z<sub>4</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa, Z<sub>3</sub> được chọn từ A, U, G, hoặc C, và Z<sub>4</sub> là nucleotit bổ sung với Z<sub>3</sub>; theo một số phương án, Z<sub>3</sub> là C, và Z<sub>4</sub> là G.

Theo một số phương án, mạch có nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit III, mạch đối nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit IV, và trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV độc lập với nhau có chiều dài gồm từ 1 đến 4 nucleotit; trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài tương đương nhau, và bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau; trình tự nucleotit III được liên kết ở đầu 5' của trình tự nucleotit I, trình tự nucleotit IV được liên kết với đầu 3' của trình tự nucleotit II. Theo một số phương án, trình tự nucleotit IV và trình tự nucleotit thứ hai bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau; trình tự nucleotit thứ hai được dùng để chỉ trình tự nucleotit mà liên kết với đầu 5' của trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:1 của mARN đích và có cùng chiều dài với trình tự nucleotit IV.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 1 nucleotit, và bazơ của trình tự nucleotit III là C, và bazơ của trình tự nucleotit IV là G; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 20/20; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là CC, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là GG; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 21/21; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 3 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là CCC, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là GGG; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 22/22; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều



dài gồm 4 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là ACCC, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là GGGU; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 23/23. Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là CC và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là GG; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 21/21.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV bổ sung ngược hoàn toàn. Do đó, nếu (các) bazơ của trình tự nucleotit III được đề cập, thì (các) bazơ của trình tự nucleotit IV cũng được xác định.

siARN thứ hai

Theo sáng chế, siARN có thể là siARN thứ hai.

siARN thứ hai bao gồm mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa, và mỗi nucleotit trong siARN thứ hai độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến, trong đó mạch có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II ít nhất bổ sung ngược một phần để tạo thành vùng mạch kép; trong đó trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 61 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 62 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- UUUGUAGCAUUUUUAUUAZ<sub>5</sub> -3' (SEQ ID NO: 61);

5'- Z<sub>6</sub>UAAUAAAAAUGCUACAAA -3' (SEQ ID NO: 62),

trong đó, Z<sub>5</sub> là A và Z<sub>6</sub> là U, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z<sub>7</sub> ở vị trí tương ứng với Z<sub>5</sub>; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z<sub>8</sub> ở vị trí tương ứng với Z<sub>6</sub>, trong đó Z<sub>8</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;

Theo một số phương án, mạch có nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit II.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 61 khác nhau không quá 1 nucleotit, và/hoặc trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 62 khác nhau không quá 1 nucleotit.

Theo một số phương án, nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 62 bao gồm khác nhau ở vị trí Z<sub>8</sub>, trong đó Z<sub>8</sub> được chọn từ A, C hoặc G. Theo một số phương án, nucleotit khác nhau là khác nhau ở vị trí Z<sub>8</sub>, trong đó Z<sub>8</sub> được chọn từ A, C hoặc G. Theo một số phương án, Z<sub>7</sub> là nucleotit bổ sung với Z<sub>8</sub>. siARN có các nucleotit khác nhau nêu trên có khả năng ức chế đối với ARN đích cao hơn và các siARN bao gồm các nucleotit khác nhau này đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II về cơ bản bổ sung ngược, bổ sung ngược đáng kể, hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 63, và trình tự nucleotit II is trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 64:

5'- UUUGUAGCAUUUUUAUUAZ<sub>7</sub> -3' (SEQ ID NO: 63);

5'- Z<sub>8</sub>UAAUAAAAAUGCUACAAA -3' (SEQ ID NO: 64),

trong đó, Z<sub>8</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa, Z<sub>7</sub> được chọn từ A, U, G, hoặc C, và Z<sub>8</sub> là nucleotit bổ sung với Z<sub>7</sub>; theo một số phương án, Z<sub>7</sub> là A, và Z<sub>8</sub> là U.

Theo một số phương án, mạch có nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit III, mạch đối nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit IV, và trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV độc lập với nhau có chiều dài gồm từ 1 đến 4 nucleotit; trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài tương đương nhau, và bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau; trình tự nucleotit III được liên kết với đầu 5' của trình tự nucleotit I, trình tự nucleotit IV được liên kết với đầu 3' của trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit IV và trình tự nucleotit thứ hai bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau; trình tự nucleotit thứ hai được dùng để chỉ trình tự nucleotit mà liên kết với đầu 5' của trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 61 của mARN đích và có cùng chiều dài với trình tự nucleotit IV.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 1 nucleotit, và bazơ của trình tự nucleotit III là U, và bazơ của trình tự nucleotit IV là A; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 20/20; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 2

nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là GU, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là AC; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 21/21; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 3 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là GGU, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là ACC; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 22/22; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 4 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là GGGU, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là ACCC; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 23/23. Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là GU, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là AC; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 21/21.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV bổ sung ngược hoàn toàn. Do đó, nếu (các) bazơ của trình tự nucleotit III được đề cập, thì (các) bazơ của trình tự nucleotit IV cũng được xác định.

siARN thứ ba

Theo sáng chế, siARN có thể là siARN thứ ba.

siARN thứ ba bao gồm mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa, và mỗi nucleotit trong siARN thứ ba độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến; trong đó mạch có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II ít nhất bổ sung ngược một phần để tạo thành vùng mạch kép; trong đó, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 121 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 122 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'-GCCUGGAGUUUAUUCGGAZ<sub>9</sub>-3' (SEQ ID NO: 121);

5'-Z<sub>10</sub>UCCGAAUAAACUCCAGGC-3' (SEQ ID NO: 122),

trong đó, Z<sub>9</sub> là A và Z<sub>10</sub> là U, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit  $Z_{11}$  ở vị trí tương ứng với  $Z_9$ ; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit  $Z_{12}$  ở vị trí tương ứng với  $Z_{10}$ , trong đó  $Z_{12}$  là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;

Theo một số phương án, mạch có nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit II.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 121 khác nhau không quá 1 nucleotit, và/hoặc trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 122 khác nhau không quá 1 nucleotit.

Theo một số phương án, nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 122 bao gồm khác biệt ở vị trí  $Z_{12}$ , trong đó  $Z_{12}$  được chọn từ A, C hoặc G. Theo một số phương án, nucleotit khác nhau là khác nhau ở vị trí  $Z_{12}$ , trong đó  $Z_{12}$  được chọn từ A, C hoặc G. Theo một số phương án,  $Z_{11}$  là nucleotit bổ sung với  $Z_{12}$ . siARN có các nucleotit khác nhau nêu trên có khả năng ức chế ARN đích cao hơn và các siARN bao gồm các nucleotit khác nhau này đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II về cơ bản bổ sung ngược, bổ sung ngược đáng kể, hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 123, và trình tự nucleotit II là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 124:

5'- GCCUGGAGUUUAUUCGGAZ<sub>11</sub> -3' (SEQ ID NO: 123);

5'- Z<sub>12</sub>UCCGAAUAAACUCCAGGC -3' (SEQ ID NO: 124),

trong đó,  $Z_{12}$  là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa,  $Z_{11}$  được chọn từ A, U, G, hoặc C, và  $Z_{12}$  là nucleotit bổ sung với  $Z_{11}$ ; theo một số phương án,  $Z_{11}$  là A, và  $Z_{12}$  là U.

Theo một số phương án, mạch có nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit III, mạch đối nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit IV, và trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV độc lập với nhau có chiều dài gồm từ 1 đến 4 nucleotit; trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài tương đương nhau, và bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau; trình tự nucleotit III được liên kết với đầu 5' của trình tự

nucleotit I, trình tự nucleotit IV được liên kết với đầu 3' của trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit IV và trình tự nucleotit thứ hai bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau; trình tự nucleotit thứ hai được dùng để chỉ trình tự nucleotit mà liên kết với đầu 5' của trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 121 của mARN đích và có cùng chiều dài với trình tự nucleotit IV.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 1 nucleotit, và bazơ của trình tự nucleotit III là G, và bazơ của trình tự nucleotit IV là C; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 20/20; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là AG, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là CU; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 21/21; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 3 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là UAG, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là CUA; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 22/22; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 4 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là AUAG, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là CUAU; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 23/23. Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là AG, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là CU; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 21/21.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV bổ sung ngược hoàn toàn. Do đó, nếu (các) bazơ của trình tự nucleotit III được đề cập, thì (các) bazơ của trình tự nucleotit IV cũng được xác định.

siARN thứ tư

Theo sáng chế, siARN có thể là siARN thứ tư.

siARN thứ tư bao gồm mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa, và mỗi nucleotit trong siARN thứ tư độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến; trong đó mạch có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit II;

trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II ít nhất bổ sung ngược một phần để tạo thành vùng mạch kép; trong đó, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 181 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 182 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- CUGUUUUGCUUUUGUAACZ<sub>13</sub> -3' (SEQ ID NO: 181);

5'- Z<sub>14</sub>GUUACAAAAGCAAAACAG -3' (SEQ ID NO: 182),

trong đó, Z<sub>13</sub> là U và Z<sub>14</sub> là A, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z<sub>15</sub> ở vị trí tương ứng với Z<sub>13</sub>, trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z<sub>16</sub> ở vị trí tương ứng với Z<sub>14</sub>, trong đó Z<sub>16</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa.

Theo một số phương án, mạch có nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit II.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 181 khác nhau không quá 1 nucleotit, và/hoặc trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 182 khác nhau không quá 1 nucleotit.

Theo một số phương án, nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 182 bao gồm khác biệt ở vị trí Z<sub>16</sub>, trong đó Z<sub>16</sub> được chọn từ U, C hoặc G. Theo một số phương án, nucleotit khác nhau là khác nhau ở vị trí Z<sub>16</sub>, trong đó Z<sub>16</sub> được chọn từ U, C hoặc G. Theo một số phương án, Z<sub>15</sub> là nucleotit bổ sung với Z<sub>16</sub>. siARN có các nucleotit khác nhau nêu trên có khả năng ức chế ARN đích cao hơn và các siARN bao gồm các nucleotit khác nhau này đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II về cơ bản bổ sung ngược, bổ sung ngược đáng kể, hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 183, và trình tự nucleotit II là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 184:

5'- CUGUUUUGCUUUUGUAACZ<sub>15</sub> -3' (SEQ ID NO: 183);

5'- Z<sub>16</sub>GUUACAAAAGCAAAACAG -3' (SEQ ID NO: 184),

trong đó,  $Z_{16}$  là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa,  $Z_{15}$  được chọn từ A, U, G, hoặc C, và  $Z_{16}$  là nucleotit bổ sung với  $Z_{15}$ ; theo một số phương án,  $Z_{15}$  là U, và  $Z_{16}$  là A.

Theo một số phương án, mạch có nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit III, mạch đối nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit IV, và trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV độc lập với nhau có chiều dài gồm từ 1 đến 4 nucleotit; trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài tương đương nhau, và bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau; trình tự nucleotit III được liên kết với đầu 5' của trình tự nucleotit I, trình tự nucleotit IV được liên kết với đầu 3' của trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit IV và trình tự nucleotit thứ hai bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau; trình tự nucleotit thứ hai được dùng để chỉ trình tự nucleotit mà liên kết với đầu 5' của trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 181 của mRNA đích và có cùng chiều dài với trình tự nucleotit IV.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 1 nucleotit, và bazơ của trình tự nucleotit III là C, và bazơ của trình tự nucleotit IV là G; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 20/20; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là AC, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là GU; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 21/21; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 3 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là GAC, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là GUC; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 22/22; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 4 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là AGAC, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là GUCU; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 23/23. Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là AC, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là GU; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 21/21.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV bổ sung ngược hoàn toàn. Do đó, nếu (các) bazơ của trình tự nucleotit III được đề cập, thì (các) bazơ của trình tự nucleotit IV cũng được xác định.

siARN thứ năm

Theo sáng chế, siARN có thể là siARN thứ năm.

siARN thứ năm bao gồm mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa, và mỗi nucleotit trong siARN thứ năm độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến; trong đó mạch có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II ít nhất bổ sung ngược một phần để tạo thành vùng mạch kép; trong đó, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 241 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 242 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'-GGUUUUGUAGCAUUUUUAZ<sub>17</sub>-3' (SEQ ID NO: 241);

5'-Z<sub>18</sub>UAAAAAUGCUACAAAACC-3' (SEQ ID NO: 242),

trong đó, Z<sub>17</sub> là U và Z<sub>18</sub> là A, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z<sub>19</sub> ở vị trí tương ứng với Z<sub>17</sub>, trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z<sub>20</sub> ở vị trí tương ứng với Z<sub>18</sub>, trong đó Z<sub>20</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa.

Theo một số phương án, mạch có nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit II.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 241 khác nhau không quá 1 nucleotit, và/hoặc trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 242 khác nhau không quá 1 nucleotit.

Theo một số phương án, nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 242 bao gồm khác nhau ở vị trí Z<sub>20</sub>, trong đó Z<sub>20</sub> được chọn từ U, C hoặc G. Theo một số phương án, nucleotit khác nhau là khác nhau ở vị trí Z<sub>20</sub>, trong đó Z<sub>20</sub> được chọn từ U, C hoặc G. Theo một số phương án, Z<sub>19</sub> là nucleotit bổ sung với Z<sub>20</sub>. siARN có các nucleotit khác nhau nêu trên có khả năng ức chế



đối với ARN đích cao hơn và các siARN bao gồm các nucleotit khác nhau này đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II về cơ bản bổ sung ngược, bổ sung ngược đáng kể, hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 243, và trình tự nucleotit II là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 244:

5'-GGUUUUGUAGCAUUUUUAZ<sub>19</sub>-3' (SEQ ID NO: 243);

5'-Z<sub>20</sub>UAAAAAUGCUACAAAACC-3' (SEQ ID NO: 244),

trong đó, Z<sub>20</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa, Z<sub>19</sub> được chọn từ A, U, G, hoặc C, và Z<sub>20</sub> là nucleotit bổ sung với Z<sub>19</sub>; theo một số phương án, Z<sub>19</sub> là U, và Z<sub>20</sub> là A.

Theo một số phương án, mạch có nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit III, mạch đối nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit IV, và trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV độc lập với nhau có chiều dài gồm từ 1 đến 4 nucleotit; trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài tương đương nhau, và bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau; trình tự nucleotit III được liên kết với đầu 5' của trình tự nucleotit I, trình tự nucleotit IV được liên kết với đầu 3' của trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit IV và trình tự nucleotit thứ hai bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau; trình tự nucleotit thứ hai được dùng để chỉ trình tự nucleotit mà liên kết với đầu 5' của trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 241 của mARN đích và có cùng chiều dài với trình tự nucleotit IV.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 1 nucleotit, và bazơ của trình tự nucleotit III là G, và bazơ của trình tự nucleotit IV là C; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 20/20; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là UG, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là CA; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 21/21; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 3 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là CUG, và thành phần bazơ của trình tự

nucleotit IV là CAG; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 22/22; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 4 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là UCUG, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là CAGA; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 23/23. Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là UG, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là CA; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 21/21.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV bổ sung ngược hoàn toàn. Do đó, nếu (các) bazơ của trình tự nucleotit III được đề cập, thì (các) bazơ của trình tự nucleotit IV cũng được xác định.

siARN thứ sáu

Theo sáng chế, siARN có thể là siARN.

siARN thứ sáu bao gồm mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa, và mỗi nucleotit trong siARN thứ sáu độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến; trong đó mạch có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II ít nhất bổ sung ngược một phần để tạo thành vùng mạch kép; trong đó, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 301 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 302 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- GUGACUUUUUAAAAUAAAZ<sub>21</sub> -3' (SEQ ID NO: 301);

5'- Z<sub>22</sub>UUUAUUUUAAAAAGUCAC -3' (SEQ ID NO: 302),

trong đó, Z<sub>21</sub> là A và Z<sub>22</sub> là U, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z<sub>23</sub> ở vị trí tương ứng với Z<sub>21</sub>, trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z<sub>24</sub> ở vị trí tương ứng với Z<sub>22</sub>, trong đó Z<sub>24</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa.

Theo một số phương án, mạch có nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit II.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 301 khác nhau không quá 1 nucleotit, và/hoặc trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 302 khác nhau không quá 1 nucleotit.

Theo một số phương án, nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 302 bao gồm khác nhau ở vị trí  $Z_{24}$ , trong đó  $Z_{24}$  được chọn từ A, C hoặc G. Theo một số phương án, nucleotit khác nhau là khác nhau ở vị trí  $Z_{24}$ , trong đó  $Z_{24}$  được chọn từ A, C hoặc G. Theo một số phương án,  $Z_{23}$  là nucleotit bổ sung với  $Z_{24}$ . siARN có các nucleotit khác nhau nêu trên có khả năng ức chế ARN đích cao hơn và các siARN bao gồm các nucleotit khác nhau này đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II về cơ bản bổ sung ngược, bổ sung ngược đáng kể, hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 303, và trình tự nucleotit II là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 304:

5'- GUGACUUUUUAAAAUAAAZ<sub>23</sub> -3' (SEQ ID NO: 303);

5'- Z<sub>24</sub>UUUAUUUUAAAAAGUCAC -3' (SEQ ID NO: 304),

trong đó,  $Z_{24}$  là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa,  $Z_{23}$  được chọn từ A, U, G, hoặc C, và  $Z_{24}$  là nucleotit bổ sung với  $Z_{23}$ ; theo một số phương án,  $Z_{23}$  là A, và  $Z_{24}$  là U.

Theo một số phương án, mạch có nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit III, mạch đối nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit IV, và trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV độc lập với nhau có chiều dài gồm từ 1 đến 4 nucleotit; trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài tương đương nhau, và bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau; trình tự nucleotit III được liên kết với đầu 5' của trình tự nucleotit I, trình tự nucleotit IV được liên kết với đầu 3' của trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit IV và trình tự nucleotit thứ hai bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau; trình tự nucleotit thứ hai được dùng để chỉ trình tự nucleotit mà liên kết với đầu 5' của trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 301 của mARN đích và có cùng chiều dài với trình tự nucleotit IV.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 1 nucleotit, và bazơ của trình tự nucleotit III là G, và bazơ của trình tự nucleotit IV là C; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 20/20; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là UG, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là CA; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 21/21; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 3 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là AUG, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là CAU; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 22/22; hoặc, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 4 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là UAUG, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là CAUA; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 23/23. Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là UG, và thành phần bazơ của trình tự nucleotit IV là CA; trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của nó là 21/21.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV bổ sung ngược hoàn toàn. Do đó, nếu (các) bazơ của trình tự nucleotit III được đề cập, thì (các) bazơ của trình tự nucleotit IV cũng được xác định.

#### Đầu nhô ra và cải biến siARN

Phần mô tả sau đây về trình tự nucleotit V, trình tự axit nucleic, hoặc cải biến nucleotit và trình tự được cải biến của siARN có thể áp dụng được cho siARN bất kỳ trong số các siARN thứ nhất đến siARN thứ sáu. Cụ thể là, trừ khi được quy định theo cách khác, phần mô tả dưới đây về siARN nên được coi là phần mô tả của mỗi trong số các siARN thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm và thứ sáu. Ví dụ, nếu không chỉ rõ cụ thể là siARN nào, thì “siARN còn bao gồm trình tự nucleotit V” có nghĩa là “siARN thứ nhất, siARN thứ hai, siARN thứ ba, siARN thứ tư, siARN thứ năm và siARN thứ sáu còn bao gồm trình tự nucleotit V”.

Theo một số phương án, mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa có chiều dài bằng hoặc khác nhau, và mạch đối nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit V. Trình tự nucleotit V có chiều dài gồm từ 1 đến 3 nucleotit và được liên kết với đầu 3' của mạch đối nghĩa, nhờ đó tạo thành đầu nhô ra 3' của mạch đối nghĩa. Trong trường hợp này, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN theo sáng chế có thể là 19/20, 19/21, 19/22, 20/21, 20/22, 20/23, 21/22, 21/23, 21/24, 22/23, 22/24, 22/25, 23/24, 23/25, hoặc 23/26. Theo một số phương án, trình tự nucleotit V có chiều dài gồm 2 nucleotit. Do đó, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN theo sáng chế có thể là 19/21, 21/23 hoặc 23/25.

Mỗi nucleotit trong trình tự nucleotit V có thể là nucleotit bất kỳ. Để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tổng hợp và tiết kiệm chi phí tổng hợp, trình tự nucleotit V là 2 thymin deoxyribonucleotit liên tiếp (dTdT) hoặc 2 uraxil ribonucleotit (UU); để làm tăng ái lực giữa mạch đối nghĩa của siARN và mARN đích, trình tự nucleotit V bổ sung với các nucleotit ở các vị trí tương ứng của mARN đích. Do đó, theo một số phương án, tỷ lệ chiều dài của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN theo sáng chế là 19/21 hoặc 21/23. Trong trường hợp này, siARN theo sáng chế thể hiện hoạt tính làm câm mARN tốt hơn.

Các nucleotit ở các vị trí tương ứng của mARN đích được dùng để chỉ các nucleotit hoặc trình tự nucleotit liên kề với đầu 5' của trình tự nucleotit thứ ba của mARN đích. Trình tự nucleotit thứ ba được dùng để chỉ đoạn trình tự nucleotit mà bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với trình tự nucleotit II, hoặc bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với trình tự nucleotit bao gồm trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit IV.

Theo một số phương án, đối với siARN thứ nhất, mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5, và mạch đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 6:

5'-AAGCAAGCAGACAUUUAUZ<sub>3</sub>-3'(SEQ ID NO: 5);

5'-Z<sub>4</sub>AUAAAUGUCUGCUUGCUUGG-3'(SEQ ID NO: 6);

Theo cách khác, mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 7, và mạch đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 8:

5'- CCAAGCAAGCAGACAUUUAUZ<sub>3</sub> -3' (SEQ ID NO: 7);

5'- Z<sub>4</sub>AUAAAUGUCUGCUUGCUUGGGU -3' (SEQ ID NO: 8);

trong đó, Z<sub>4</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa; Z<sub>3</sub> được chọn từ A, U, G hoặc C, và Z<sub>4</sub> là nucleotit bổ sung với Z<sub>3</sub>.

Theo một số phương án, đối với siARN thứ hai, mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 65, và mạch đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 66:

5'- UUUGUAGCAUUUUUAUUAZ<sub>7</sub> -3' (SEQ ID NO: 65);

5'- Z<sub>8</sub>UAAUAAAAAUGCUACAAAAC -3' (SEQ ID NO: 66),

Theo cách khác, mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 67, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 68:

55'- GUUUUGUAGCAUUUUUAUUAZ<sub>7</sub> -3' (SEQ ID NO: 67);

5'- Z<sub>8</sub>UAAUAAAAAUGCUACAAAACCC -3' (SEQ ID NO: 68),

trong đó, Z<sub>8</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa; Z<sub>7</sub> được chọn từ A, U, G hoặc C, và Z<sub>8</sub> là nucleotit bổ sung với Z<sub>7</sub>.

Theo một số phương án, đối với siARN thứ ba, mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 125, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 126:

5'- GCCUGGAGUUUAUUCGGAZ<sub>11</sub> -3' (SEQ ID NO: 125);

5'-Z<sub>12</sub>UCCGAAUAAACUCCAGGCCU -3' (SEQ ID NO: 126),

Theo cách khác, mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 127, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 128:

5'- AGGCCUGGAGUUUAUUCGGAZ<sub>11</sub> -3' (SEQ ID NO: 127);

5'-Z<sub>12</sub>UCCGAAUAAACUCCAGGCCUAU -3' (SEQ ID NO: 128),

trong đó, Z<sub>12</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa; Z<sub>11</sub> được chọn từ A, U, G hoặc C, và Z<sub>12</sub> là nucleotit bổ sung với Z<sub>11</sub>.

Theo một số phương án, đối với siARN thứ tư, mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 185, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 186:

5'- CUGUUUUGCUUUUGUAACZ<sub>15</sub> -3' (SEQ ID NO: 185);

5'-Z<sub>16</sub>GUUACAAAAGCAAAACAGGU -3' (SEQ ID NO: 186),

Theo cách khác, mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 187, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 188:

5'- ACCUGUUUUGCUUUUGUAACZ<sub>15</sub> -3' (SEQ ID NO: 187);

5'-Z<sub>16</sub>GUUACAAAAGCAAAACAGGUCU -3' (SEQ ID NO: 188),

trong đó, Z<sub>16</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa; Z<sub>15</sub> được chọn từ A, U, G hoặc C, và Z<sub>16</sub> là nucleotit bổ sung với Z<sub>15</sub>.

Theo một số phương án, đối với siARN thứ năm, mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 245, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 246:

5'- GGUUUUGUAGCAUUUUUAZ<sub>19</sub> -3' (SEQ ID NO: 245);

5'- Z<sub>20</sub>UAAAAAUGCUACAAAACCCA -3' (SEQ ID NO: 246),

Theo cách khác, mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 247, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 248:

5'- UGGGUUUUGUAGCAUUUUUAZ<sub>19</sub> -3' (SEQ ID NO: 247);

5'-Z<sub>20</sub>UAAAAAUGCUACAAAACCCAGA -3' (SEQ ID NO: 248),

trong đó, Z<sub>20</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa; Z<sub>19</sub> được chọn từ A, U, G hoặc C, và Z<sub>20</sub> là nucleotit bổ sung với Z<sub>19</sub>.

Theo một số phương án, đối với siARN thứ sáu, mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 305, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 306:

5'- GUGACUUUUUAAAAUAAAZ<sub>23</sub> -3' (SEQ ID NO: 305);

5'- Z<sub>24</sub>UUUAUUUUAAAAAGUCACCA -3' (SEQ ID NO: 306),

Theo cách khác, mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 307, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 308:

5'- UGGUGACUUUUUAAAAUAAAZ<sub>23</sub> -3' (SEQ ID NO: 307);

5'- Z<sub>24</sub>UUUAUUUUAAAAAGUCACCAUA -3' (SEQ ID NO: 308),

trong đó,  $Z_{24}$  là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;  $Z_{23}$  được chọn từ A, U, G hoặc C, và  $Z_{24}$  là nucleotit bổ sung với  $Z_{23}$ .

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế là siPCSKa1, siPCSKa2, siPCSKb1, siPCSKb2, siPCSKc1, siPCSKc2, siPCSKd1, siPCSKd2, siPCSKe1, siPCSKe2, siPCSKf1 hoặc siPCSKf2 được liệt kê trong các bảng 1a-1f.

Như đề cập trên đây, trong siARN theo sáng chế, mỗi nucleotit độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến. Theo một số phương án, nucleotit trong siARN theo sáng chế là nucleotit không được cải biến; theo một số phương án, trong siARN theo sáng chế, một vài hoặc toàn bộ các nucleotit là các nucleotit được cải biến. Các cải biến trên các nhóm nucleotit này sẽ dẫn đến làm giảm đáng kể hoặc làm mất các chức năng ức chế sự biểu hiện của gen PCSK9 của siARN theo sáng chế.

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế bao gồm ít nhất một nucleotit được cải biến. Trong phạm vi sáng chế, thuật ngữ “nucleotit được cải biến” được sử dụng được dùng để chỉ nucleotit được tạo thành bằng cách thay thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng các nhóm khác, hoặc nhóm tương tự nucleotit, hoặc nucleotit với bazơ được cải biến. Nucleotit được cải biến không làm suy yếu đáng kể hoặc làm mất chức năng ức chế sự biểu hiện gen của thể tiếp hợp siARN. Ví dụ, các nucleotit được cải biến được bộc lộ trong tài liệu *Watts, J.K., G. F. Deleavey and M. J. Damha, Chemically Modified siARN: tools and applications. Drug Discov Today, 2008.13(19-20): p.842-55* có thể được chọn.

Theo một số phương án, ít nhất một nucleotit trong mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của siARN theo sáng chế là nucleotit được cải biến, và/hoặc ít nhất một nhóm phosphat là nhóm phosphat có (các) nhóm cải biến. Nói cách khác, ít nhất một phần của các nhóm phosphat và/hoặc riboza trong khung phosphat-riboza của ít nhất một mạch trong mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa là các nhóm phosphat có các nhóm cải biến và/hoặc các nhóm riboza có các nhóm cải biến.

Theo một số phương án, toàn bộ các nucleotit trong mạch có nghĩa và/hoặc mạch đối nghĩa là các nucleotit được cải biến. Theo một số phương án, mỗi nucleotit trong mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN theo sáng chế độc lập là nucleotit được cải biến có flo hoặc nucleotit được cải biến không có flo.



Các tác giả sáng chế ngạc nhiên phát hiện ra rằng siARN theo sáng chế đạt được sự cân bằng giữa độ ổn định trong huyết tương và hiệu quả làm câm gen trong các thử nghiệm trên động vật ở mức cao.

Theo một số phương án, nucleotit được cải biến có flo nằm trong trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II; và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ít nhất ở các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit I là nucleotit được cải biến có flo; và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở ít nhất các vị trí 2, 6, 14, và 16 của trình tự nucleotit II là nucleotit được cải biến có flo.

Theo một số phương án, nucleotit được cải biến có flo được định vị trong trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II; và trình tự nucleotit I bao gồm không quá 5 nucleotit được cải biến có flo; và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit I là nucleotit được cải biến có flo; trình tự nucleotit II bao gồm không quá 7 nucleotit được cải biến có flo; và các nucleotit ở các vị trí 2, 6, 14, và 16 của trình tự nucleotit II là nucleotit được cải biến có flo.

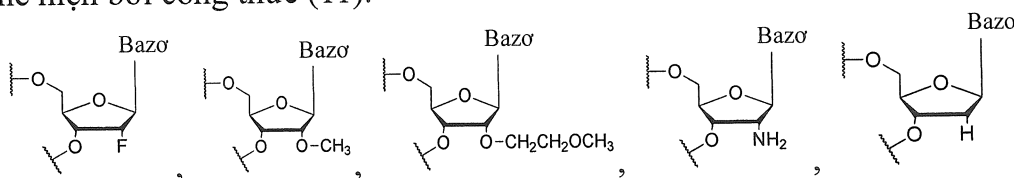
Theo một số phương án, theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 7, 8 và 9 hoặc ở các vị trí 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit I trong mạch có nghĩa là nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác trong mạch có nghĩa là nucleotit được cải biến không có flo; theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 2, 6, 14, và 16 hoặc ở các vị trí 2, 6, 8, 9, 14, và 16 của trình tự nucleotit II trong mạch đối nghĩa là nucleotit được cải biến có flo, và nucleotit ở các vị trí khác trong mạch đối nghĩa là nucleotit được cải biến không có flo.

Trong phạm vi sáng chế, “nucleotit được cải biến có flo” được dùng để chỉ nucleotit được tạo thành bằng cách thay thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nguyên tử flo, mà có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (7) dưới đây. Thuật ngữ “nucleotit được cải biến không có flo” được dùng để chỉ nucleotit được tạo thành bằng cách thay thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nhóm không có flo, hoặc nhóm tương tự nucleotit. Theo một số phương án, mỗi nucleotit được cải biến không có flo độc lập được chọn từ nucleotit được tạo thành bằng cách thay thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nucleotit bằng nhóm không có flo, hoặc nhóm tương tự nucleotit.

Các nucleotit được tạo thành bằng cách thay thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nhóm không có flo là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, và có thể được chọn từ nhóm

bao gồm nucleotit được cải biến có nhóm 2'-alkoxy, nucleotit được cải biến có nhóm alkoxy được thay thế ở vị trí 2', nucleotit được cải biến có nhóm 2'-alkyl, nucleotit được cải biến có nhóm alkyl được thay thế ở vị trí 2', nucleotit được cải biến có nhóm 2'-amino, nucleotit được cải biến có nhóm amino được thay thế ở vị trí 2', và nucleotit 2'-deoxy.

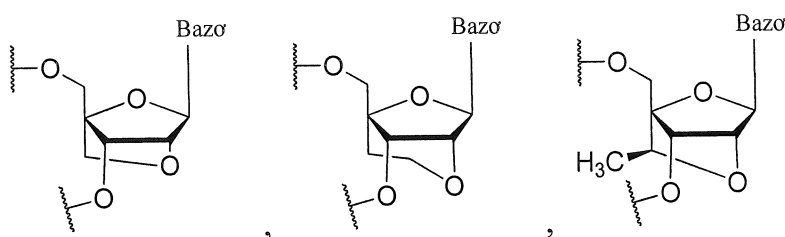
Theo một số phương án, nucleotit được cải biến có nhóm 2'-alkoxy là nucleotit được cải biến có nhóm 2'-metoxy (2'-OMe), như được thể hiện bởi công thức (8). Theo một số phương án, nucleotit được cải biến có nhóm alkoxy được thay thế ở vị trí 2' ví dụ là nucleotit được cải biến có nhóm 2'-O-metoxyletyl (2'-MOE), như được thể hiện bởi công thức (9). Theo một số phương án, nucleotit được cải biến có nhóm 2'-amino (2'-NH<sub>2</sub>) như được thể hiện bởi công thức (10). Theo một số phương án, nucleotit 2'-deoxy (ADN) như được thể hiện bởi công thức (11).



công thức (7) công thức (8) công thức (9) công thức (10) công thức (11)

Nhóm tương tự nucleotit được dùng để chỉ nhóm mà có thể thay thế nucleotit trong axit nucleic, song vẫn khác biệt với adenin ribonucleotit, guanin ribonucleotit, xytosin ribonucleotit, uraxil ribonucleotit, hoặc thymine deoxyribonucleotit về mặt cấu trúc. Theo một số phương án, nhóm tương tự nucleotit có thể là isonucleotit, nucleotit cầu nối hoặc nucleotit không vòng.

Nucleotit BNA (axit nucleic cầu nối, BNA) là nucleotit mà được kiểm chế hoặc không thể tiếp cận được. BNA có thể chứa cấu trúc cầu nối dạng vòng có 5, 6 hoặc 7 cạnh với chế độ gấp phân tử nội đường C3' "cố định". Cầu nối thường được liên kết tại các vị trí 2'- và 4' của riboza để tạo ra 2',4'-BNA nucleotit. Theo một số phương án, BNA có thể là LNA, ENA, cET BNA và v.v., mà được thể hiện bằng các công thức (12), (13) và (14), tương ứng.

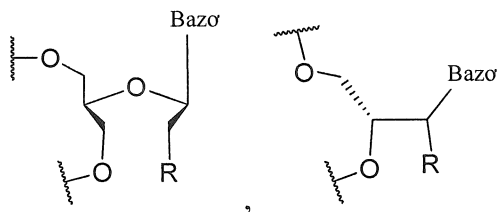


công thức (12)

công thức (13)

công thức (14)

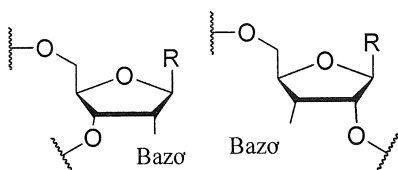
Nucleotit không vòng được dùng để chỉ nhóm các nucleotit trong đó vòng đường được mở. Theo một số phương án, acrylic nucleotit là một axit nucleic không khóa (unlocked nucleic acid-UNA) hoặc axit glyxerol nucleic (GNA), như được thể hiện bởi các công thức (15) và (16), tương ứng.



công thức (15)      công thức (16)

Trong các công thức (15) và (16) trên đây, R được chọn từ H, OH hoặc alkoxy (O-alkyl).

Isonucleotit là một hợp chất được tạo thành bằng cách thay đổi vị trí của bazơ trên vòng riboza trong nucleotit. Theo một số phương án, isonucleotit là một hợp chất được tạo thành bằng cách chuyển vị bazơ từ vị trí 1' sang vị trí 2' hoặc vị trí 3' trên vòng riboza, như được thể hiện bởi công thức (17) hoặc (18), tương ứng.



công thức (17)      công thức (18)

Trong các hợp chất có công thức (17)-(18) trên đây, “bazơ” là bazơ, như A, U, G, C, hoặc T; R được chọn từ H, OH, F, hoặc nhóm không có flo nêu trên.

Theo một số phương án, nhóm tương tự nucleotit là nhóm được chọn từ nhóm bao gồm isonucleotit, LNA, ENA, cET, UNA, và GNA. Theo một số phương án, mỗi nucleotit được cải biến không có flo là nucleotit được cải biến có nhóm metoxy. Trong phạm vi sáng chế, “nucleotit được cải biến có nhóm metoxy được dùng để chỉ nucleotit được tạo thành bằng cách thay thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nhóm metoxy.

Trong phạm vi sáng chế, “nucleotit được cải biến có flo”, “nucleotit được cải biến có flo ở vị trí 2'”, “nucleotit trong đó 2'-hydroxy của nhóm riboza được thế bằng nguyên tử flo”, và “nucleotit có nhóm 2'-floribosyl” có nghĩa như nhau, được dùng để chỉ hợp chất trong đó 2'-hydroxy của nucleotit được thay thế bằng nguyên tử flo, mà có cấu trúc

như được thể hiện bởi công thức (7). “Nucleotit được cải biến có nhóm metoxy”, “nucleotit được cải biến có nhóm metoxy ở vị trí 2’”, “nucleotit trong đó 2'-hydroxy của nhóm riboza được thế bằng nhóm metoxy”, và “nucleotit có nhóm 2'-metoxyribosyl” có nghĩa như nhau, được dùng để chỉ hợp chất trong đó 2'-hydroxy của nhóm riboza được thay thế bằng nhóm metoxy, mà có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (8).

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế là siARN có các cải biến sau: theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 7, 8 và 9 hoặc ở các vị trí 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit I trong mạch có nghĩa là nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác trong mạch có nghĩa là nucleotit được cải biến có nhóm metoxy; các nucleotit ở các vị trí 2, 6, 14, và 16 hoặc ở các vị trí 2, 6, 8, 9, 14, và 16 của trình tự nucleotit II trong mạch đối nghĩa là nucleotit được cải biến có flo, và nucleotit ở các vị trí khác trong mạch đối nghĩa là nucleotit được cải biến có metoxy.

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế là siARN có các cải biến sau: theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 5, 7, 8, và 9 của trình tự nucleotit I trong mạch có nghĩa của siARN là nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác của mạch có nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có nhóm metoxy; và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 2, 6, 8, 9, 14, và 16 của trình tự nucleotit II trong mạch đối nghĩa của siARN là nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác trong mạch đối nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có nhóm metoxy;

Theo cách khác, theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 5, 7, 8, và 9 của trình tự nucleotit I trong mạch có nghĩa của siARN là nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác trong mạch có nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có nhóm metoxy; và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 2, 6, 14, và 16 của trình tự nucleotit II trong mạch đối nghĩa của siARN là nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác trong mạch đối nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có nhóm metoxy.

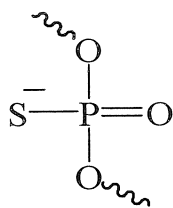
Theo cách khác, theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit I trong mạch có nghĩa của siARN là nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác trong mạch có nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có nhóm metoxy; và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 2,

6, 14, và 16 ở trình tự nucleotit II trong mạch đối nghĩa của siARN là nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác trong mạch đối nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có nhóm metoxy.

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế là một trong số siPCSKa1-M1, siPCSKa1-M2, siPCSKa1-M3, siPCSKa2-M1, siPCSKa2-M2, siPCSKa2-M3, siPCSKb1-M1, siPCSKb1-M2, siPCSKb1-M3, siPCSKb2-M1, siPCSKb2-M2, siPCSKb2-M3, siPCSKc1-M1, siPCSKc1-M2, siPCSKc1-M3, siPCSKc2-M1, siPCSKc2-M2, siPCSKc2-M3, siPCSKd1-M1, siPCSKd1-M2, siPCSKd1-M3, siPCSKd2-M1, siPCSKd2-M2, siPCSKd2-M3, siPCSKe1-M1, siPCSKe1-M2, siPCSKe1-M3, siPCSKe2-M1, siPCSKe2-M2, siPCSKe2-M3, siPCSKf1-M1, siPCSKf1-M2, siPCSKf1-M3, siPCSKf2-M1, siPCSKf2-M2 hoặc siPCSKf2-M3 được nêu trong các bảng 1a-1f.

Các siARN với các cải biến nêu trên không chỉ có giá thành thấp, mà còn khiến cho các ribonucleaza trong máu không phân cắt axit một cách dễ dàng, nhờ đó làm tăng độ ổn định của axit nucleic và làm cho axit nucleic có khả năng chống lại sự thủy phân nucleaza mạnh hơn. Ngoài ra, siARN với các cải biến nêu trên cũng thể hiện hoạt tính ức chế đối với mRNA đích cao hơn.

Theo một số phương án, ít nhất một phần các nhóm phosphat trong khung phosphat-riboza của ít nhất một mạch đơn trong mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN theo sáng chế là các nhóm phosphat với các nhóm cải biến. Theo một số phương án, nhóm phosphat với (các) nhóm cải biến là nhóm phosphorothioat được tạo thành bằng cách thay thế ít nhất một nguyên tử oxy trong liên kết phosphodiester trong các nhóm phosphat bằng nguyên tử lưu huỳnh. Theo một số phương án, nhóm phosphat với (các) nhóm cải biến là nhóm phosphorothioat có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (1):



công thức (1).

Cải biến này làm ổn định cấu trúc mạch kép của siARN, nhờ đó duy trì được tính đặc hiệu cao và ái lực cao khi bắt cặp bazơ.

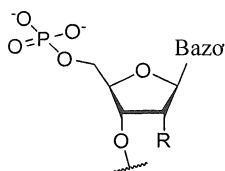
Theo một số phương án, trong siARN theo sáng chế, liên kết phosphorothioat được bố trí ở ít nhất một nhóm bao gồm các vị trí sau: vị trí giữa nucleotit thứ nhất và nucleotit thứ hai ở một trong hai đầu của mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa, vị trí giữa nucleotit thứ hai và nucleotit thứ ba ở một trong hai đầu của mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một số phương án, liên kết phosphorothioat nằm ở tất cả các vị trí trên đây ngoại trừ đầu 5' của mạch có nghĩa. Theo một số phương án, liên kết phosphorothioat nằm ở tất cả các vị trí trên đây ngoại trừ đầu 3' của mạch có nghĩa. Theo một số phương án, liên kết phosphorothioat nằm ở ít nhất một trong các vị trí sau:

- vị trí giữa các nucleotit thứ nhất và thứ hai ở đầu 5' của mạch có nghĩa;
- vị trí giữa các nucleotit thứ hai và thứ ba ở đầu 5' của mạch có nghĩa;
- vị trí giữa các nucleotit thứ nhất và thứ hai ở đầu 3' của mạch có nghĩa;
- vị trí giữa các nucleotit thứ hai và thứ ba ở đầu 3' của mạch có nghĩa;
- vị trí giữa các nucleotit thứ nhất và thứ hai ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;
- vị trí giữa các nucleotit thứ hai và thứ ba ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;
- vị trí giữa các nucleotit thứ nhất và thứ hai ở đầu 3' của mạch đối nghĩa; và
- vị trí giữa các nucleotit thứ hai và thứ ba ở đầu 3' của mạch đối nghĩa.

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế là một trong số siPCSKa1-M1S, siPCSKa1-M2S, siPCSKa1-M3S, siPCSKa2-M1S, siPCSKa2-M2S, siPCSKa2-M3S, siPCSKb1-M1S, siPCSKb1-M2S, siPCSKb1-M3S, siPCSKb2-M1S, siPCSKb2-M2S, siPCSKb2-M3S, siPCSKc1-M1S, siPCSKc1-M2S, siPCSKc1-M3S, siPCSKc2-M1S, siPCSKc2-M2S, siPCSKc2-M3S, siPCSKd1-M1S, siPCSKd1-M2S, siPCSKd1-M3S, siPCSKd2-M1S, siPCSKd2-M2S, siPCSKd2-M3S, siPCSKe1-M1S, siPCSKe1-M2S, siPCSKe1-M3S, siPCSKe2-M1S, siPCSKe2-M2S, siPCSKe2-M3S, siPCSKf1-M1S, siPCSKf1-M2S, siPCSKf1-M3S, siPCSKf2-M1S, siPCSKf2-M2S hoặc siPCSKf2-M3S được nêu trong các bảng 1a-1f.

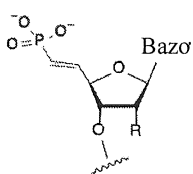
Theo một số phương án, nucleotit ở đầu 5' trong mạch đối nghĩa của siARN là 5'-phosphat nucleotit hoặc nucleotit được cải biến có nhóm tương tự 5'-phosphat.

Các 5'-phosphat nucleotit hoặc các nucleotit được cải biến có nhóm tương tự 5'-phosphat điển hình đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các 5'-phosphat nucleotit có thể có cấu trúc sau:

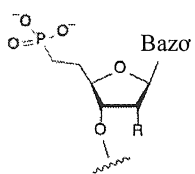


công thức (2).

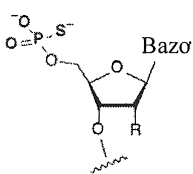
Theo một ví dụ khác, *Anastasia Khvorova and Jonathan K. Watts, The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nature Biotechnology, 2017, 35(3): 238-48* mô tả bốn nucleotit được cải biến có nhóm tương tự 5'-phosphat sau:



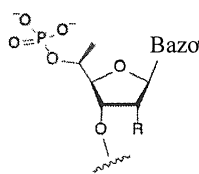
công thức (3)



công thức (4)



công thức (5)



công thức (6)

trong đó R được chọn từ H, OH, metoxy, và F;

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

Theo một số phương án, 5'-phosphat nucleotit là nucleotit có nhóm 5'-phosphat như được thể hiện bởi công thức (2); nucleotit được cải biến có nhóm tương tự 5'-phosphat là nucleotit có cải biến vinylphosphonat (5'-(*E*)-vinylphosphonat, *E*-VP) như được thể hiện bởi công thức (3), hoặc nucleotit được cải biến có nhóm phosphorothioat như được thể hiện bởi công thức (5).

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế là một trong số siPCSKa1-M1P1, siPCSKa1-M2P1, siPCSKa1-M3P1, siPCSKa2-M1P1, siPCSKa2-M2P1, siPCSKa2-M3P1, siPCSKb1-M1P1, siPCSKb1-M2P1, siPCSKb1-M3P1, siPCSKb2-M1P1, siPCSKb2-M2P1, siPCSKb2-M3P1, siPCSKc1-M1P1, siPCSKc1-M2P1, siPCSKc1-M3P1, siPCSKc2-M1P1, siPCSKc2-M2P1, siPCSKc2-M3P1, siPCSKd1-M1P1, siPCSKd1-M2P1, siPCSKd1-M3P1, siPCSKd2-M1P1, siPCSKd2-M2P1, siPCSKd2-M3P1, siPCSKe1-M1P1, siPCSKe1-M2P1, siPCSKe1-M3P1, siPCSKe2-M1P1, siPCSKe2-M2P1, siPCSKe2-M3P1, siPCSKf1-M1P1, siPCSKf1-M2P1, siPCSKf1-M3P1, siPCSKf2-M1P1, siPCSKf2-M2P1, siPCSKf2-M3P1, siPCSKa1-M1SP1, siPCSKa1-M2SP1, siPCSKa1-M3SP1, siPCSKa2-M1SP1, siPCSKa2-M2SP1, siPCSKa2-M3SP1, siPCSKb1-M1SP1, siPCSKb1-M2SP1, siPCSKb1-M3SP1,

siPCSKb2-M1SP1, siPCSKb2-M2SP1, siPCSKb2-M3SP1, siPCSKc1-M1SP1,  
 siPCSKc1-M2SP1, siPCSKc1-M3SP1, siPCSKc2-M1SP1, siPCSKc2-M2SP1,  
 siPCSKc2-M3SP1, siPCSKd1-M1SP1, siPCSKd1-M2SP1, siPCSKd1-M3SP1,  
 siPCSKd2-M1SP1, siPCSKd2-M2SP1, siPCSKd2-M3SP1, siPCSKe1-M1SP1,  
 siPCSKe1-M2SP1, siPCSKe1-M3SP1, siPCSKe2-M1SP1, siPCSKe2-M2SP1,  
 siPCSKe2-M3SP1, siPCSKf1-M1SP1, siPCSKf1-M2SP1, siPCSKf1-M3SP1,  
 siPCSKf2-M1SP1, siPCSKf2-M2SP1 và siPCSKf2-M3SP1 được nêu trong các bảng  
 1a-1f.

siARN thứ bảy

Theo sáng chế, siARN có thể là siARN thứ bảy.

siARN thứ bảy bao gồm mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa, và mỗi nucleotit trong siARN thứ bảy độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến; trong đó mạch có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II ít nhất bổ sung ngược một phần để tạo thành vùng mạch kép; trong đó, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 399 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 400 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'-AGACCUGUUUUGCUUUUGZ<sub>25</sub>-3' (SEQ ID NO: 399);

5'-Z<sub>26</sub>CAAAAGCAAAACAGGUCU-3' (SEQ ID NO: 400),

trong đó, Z<sub>25</sub> là U và Z<sub>26</sub> là A, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z<sub>27</sub> ở vị trí tương ứng với Z<sub>25</sub>, trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z<sub>28</sub> ở vị trí tương ứng với Z<sub>26</sub>, trong đó Z<sub>28</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa.

Theo một số phương án, mạch có nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa chỉ bao gồm trình tự nucleotit II.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 399 khác nhau không quá 1 nucleotit, và/hoặc trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 400 khác nhau không quá 1 nucleotit.



Theo một số phương án, nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 400 bao gồm khác nhau ở vị trí Z<sub>28</sub>, trong đó Z<sub>28</sub> được chọn từ G, U hoặc C. Theo một số phương án, nucleotit khác nhau là khác nhau ở vị trí Z<sub>28</sub>, trong đó Z<sub>28</sub> được chọn từ G, U hoặc C. Theo một số phương án, Z<sub>27</sub> là nucleotit bổ sung với Z<sub>28</sub>.

Theo một số phương án, nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 399 bao gồm nucleotit thứ 9 Z khác nhau được tính từ đầu 5' của trình tự nucleotit I, trong đó Z là dT.

Theo một số phương án, nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 399 bao gồm khác nhau ở vị trí Z<sub>27</sub>, trong đó Z<sub>27</sub> được chọn từ A, G hoặc C.

Theo một số phương án, nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 399 có 2 nucleotit khác nhau, và trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II được bổ sung ngược hoàn toàn với nhau, trong đó 2 nucleotit khác nhau là ở các vị trí Z và Z<sub>27</sub>, và Z là dT và Z<sub>27</sub> được chọn từ A, G hoặc C.

siARN có các nucleotit khác nhau nêu trên có khả năng ức chế ARN đích cao hơn và các siARN bao gồm các nucleotit khác nhau này đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit I là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 401, và trình tự nucleotit II là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 402:

5'-AGACCUGUdTUUGCUUUUGZ<sub>27</sub>-3'(SEQ ID NO: 401);

5'-Z<sub>28</sub>CAAAAGCAAAACAGGUCU-3'(SEQ ID NO: 402),

trong đó dT là thymine deoxynucleotit, Z<sub>28</sub> là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa, Z<sub>27</sub> được chọn từ A, U, G, hoặc C, và Z<sub>28</sub> là nucleotit bổ sung với Z<sub>27</sub>; theo một số phương án, Z<sub>27</sub> là U, và Z<sub>28</sub> là A.

Theo một số phương án, đối với siARN thứ bảy, mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 403, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 404:

5'-AGACCUGUdTUUGCUUUUGZ<sub>27</sub>-3'(SEQ ID NO: 403);

5'-Z<sub>28</sub>CAAAAGCAAAACAGGUCUAG-3'(SEQ ID NO: 404);

Theo cách khác, mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 405, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 406:

5'- CUAGACCUGUdTUUGCUUUUGZ<sub>27</sub> -3' (SEQ ID NO: 405);

5'- Z<sub>28</sub>CAAAAGCAAACAGGUCUAGAA -3' (SEQ ID NO: 406);

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế là siPCSKg3 hoặc siPCSKg4 được nêu trong bảng 1g.

Theo một số phương án, trong các siARN có các nucleotit khác nhau ở các vị trí Z và/hoặc Z<sub>27</sub> nêu trên, ít nhất một vài nucleotit là các nucleotit được cải biến, các nucleotit cải biến là các nucleotit được cải biến có flo hoặc nucleotit được cải biến không có flo, các nucleotit được cải biến có flo nằm trong trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ít nhất ở các vị trí 2, 6, 14, và 16 của trình tự nucleotit II là các nucleotit được cải biến có flo.

Theo một số phương án, siARN theo sáng chế là một trong số siPCSKg3-M4, siPCSKg4-M5, siPCSKg3-M4S, siPCSKg4-M5S, siPCSKg3-M4P1, siPCSKg4-M5P1, siPCSKg3-M4SP1 hoặc siPCSKg4-M5SP1 được nêu trong bảng 1g.

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng các siARN theo sáng chế có độ ổn định trong huyết tương và lysosom được tăng cường đáng kể, trong khi vẫn thể hiện hoạt tính ức chế đối với mRNA đích cao hơn.

Các siARN theo sáng chế có thể được tạo thành bằng các phương pháp sản xuất siARN thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ phương pháp tổng hợp ở pha rắn và phương pháp tổng hợp ở pha lỏng. Đối với phương pháp tổng hợp ở pha rắn có các dịch vụ tùy chỉnh trên thị trường. Nhóm nucleotit cải biến có thể được đưa vào siARN theo sáng chế bằng cách sử dụng monome nucleotit có cải biến tương ứng. Phương pháp sản xuất monome nucleotit có cải biến tương ứng và phương pháp đưa nhóm nucleotit đã cải biến vào siARN cũng đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

#### Dược phẩm

Sáng chế đề xuất dược phẩm, chứa siARN trên đây làm thành phần hoạt tính và chất mang dược dụng.

Chất mang được dụng có thể là chất mang thông thường trong lĩnh vực sử dụng siARN, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều các hạt nano từ tính (như các hạt nano trên cơ sở  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), ống nano cacbon, silic vật liệu mao quản, các hạt nano canxi phosphat, polyetylenimin (PEI), polyamidoamin (PAMAM) dendrime, poly(L-lysin) (PLL), chitosan, 1,2-dioleoyl-3-trimetylammoni-propan (DOTAP), copolyme poly(axit D&L-lactic/glycolic) (PLGA), poly(2-aminoetyl etylen phosphat) (PPEEA), poly(2-dimetylaminoetyl metacrylat) (PDMAEMA), và các dẫn xuất của chúng.

Trong dược phẩm này, lượng siARN và chất mang được dụng không được yêu cầu cụ thể, và có thể là lượng thông thường của từng thành phần. Theo một số phương án, tỷ lệ khối lượng của siARN so với chất mang được dụng là 1: (1-500), và theo một số phương án, tỷ lệ khối lượng này là 1: (1-50).

Theo một số phương án, dược phẩm cũng có thể chứa các tá dược được dụng khác, mà có thể là một hoặc nhiều chế phẩm hoặc hợp chất thông thường trong lĩnh vực này. Ví dụ, các tá dược được dụng khác này có thể bao gồm ít nhất một trong số chất đệm pH, chất bảo vệ và chất điều biến áp suất thẩm thấu.

Chất đệm pH có thể là dung dịch đệm tris(hydroxymetyl) aminometan hydroclorua có độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,5, và/hoặc dung dịch đệm phosphat có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,5, như dung dịch đệm phosphat có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,5.

Chất bảo vệ có thể là ít nhất một trong số inositol, sorbitol, sucroza, trehaloza, mannoza, maltoza, lactoza, và glucoza. Lượng chất bảo vệ có thể nằm trong khoảng từ 0,01% khối lượng đến 30% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của dược phẩm.

Chất điều biến áp suất thẩm thấu có thể là natri clorua và/hoặc kali clorua. Lượng chất điều biến áp suất thẩm thấu làm cho áp suất thẩm thấu của dược phẩm nằm trong khoảng từ 200 đến 700 milliosmol/kg. Tùy thuộc vào áp suất thẩm thấu mong muốn, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng xác định lượng chất điều biến áp suất thẩm thấu.

Theo một số phương án, dược phẩm có thể là dược phẩm dạng lỏng, ví dụ, dung dịch tiêm; hoặc sản phẩm đông khô dùng để tiêm, mà có thể được trộn với tá dược lỏng để tạo thành dược phẩm dạng lỏng khi sử dụng. Dược phẩm dạng lỏng có thể được sử

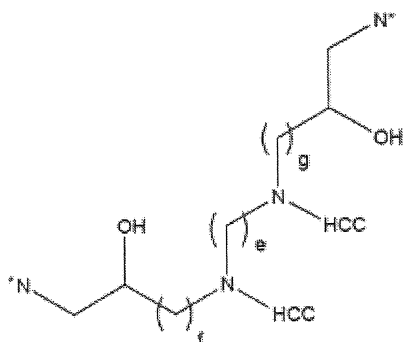


vòng hoặc không vòng; nhóm dị béo mạch thẳng hoặc mạch nhánh, được thể hoặc không được thể, vòng hoặc không vòng; nhóm axyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, được thể hoặc không được thể; nhóm aryl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, được thể hoặc không được thể; và nhóm heteroaryl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, được thể hoặc không được thể;

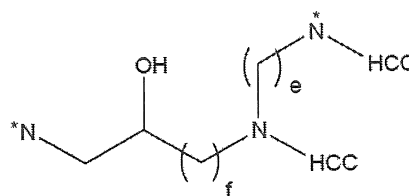
x là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10;

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3, m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 20, p là 0 hoặc 1, trong đó nếu  $m=p=0$ , thì  $R_{102}$  là hydro; và

nếu ít nhất một trong số n và m là 2, thì  $R_{103}$  và nitơ trong công thức (201) tạo thành cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (202) hoặc (203):



công thức (202)

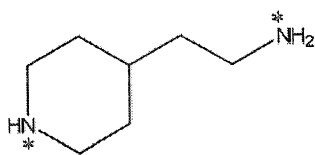


công thức (203);

trong đó g, e hoặc f độc lập với nhau là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6; "HCC" là chuỗi hydrocarbon, và mỗi \*N là một nguyên tử nitơ được thể hiện trong công thức (201).

Theo một số phương án,  $R_{103}$  là polyamin. Theo các phương án khác,  $R_{103}$  là ketal. Theo một số phương án,  $R_{101}$  và  $R_{102}$  trong công thức (201) độc lập với nhau là alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, được thể hoặc không được thể bất kỳ, trong đó alkyl hoặc alkenyl có 3-20 nguyên tử cacbon (như 8 đến 18 nguyên tử cacbon) và 0-4 liên kết đôi (như 0-2 liên kết đôi).

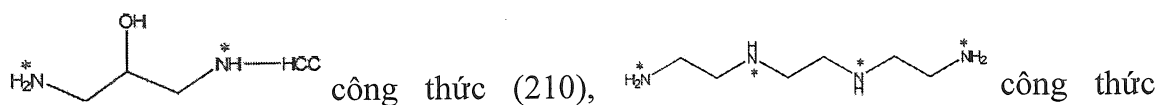
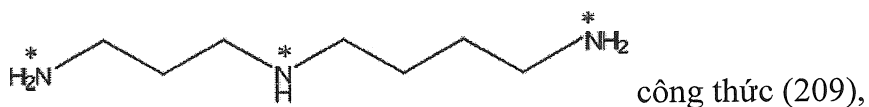
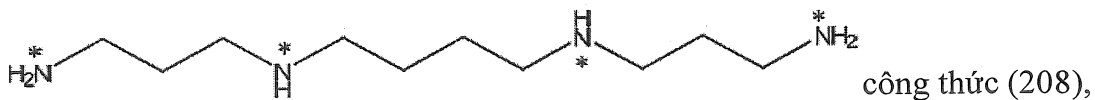
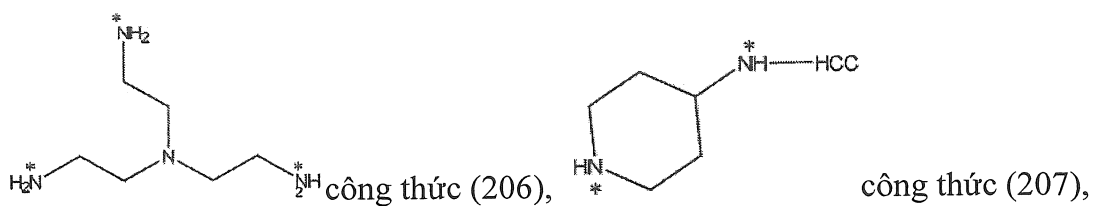
Theo một số phương án, nếu n và m độc lập với nhau là 1 hoặc 3,  $R_{103}$  có công thức bất kỳ trong số các công thức (204)-(213) dưới đây:



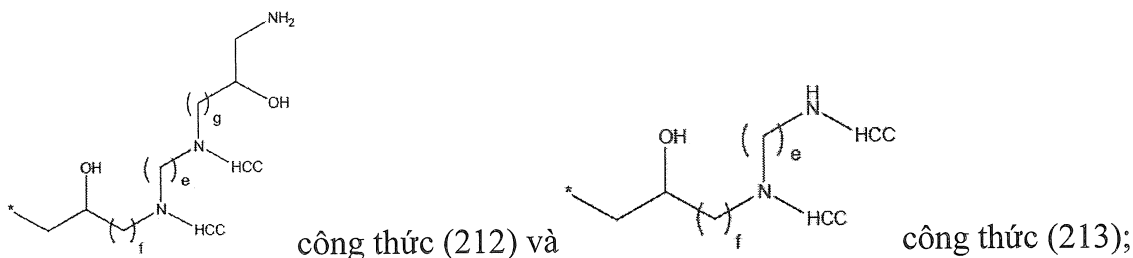
công thức (204),



công thức (205),



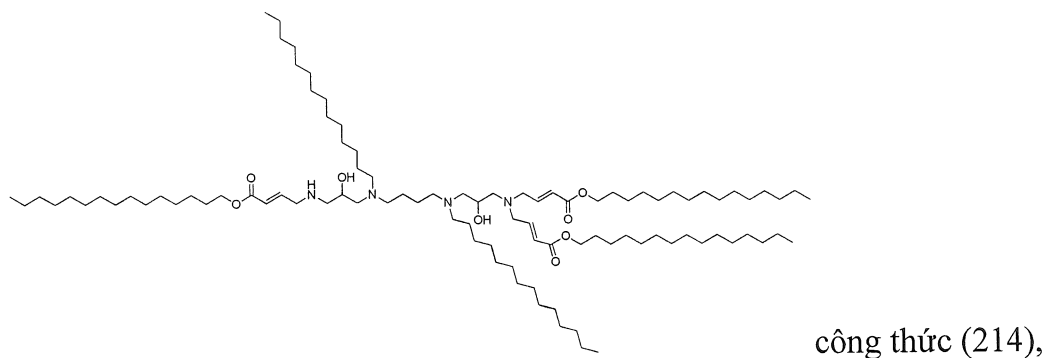
(211),

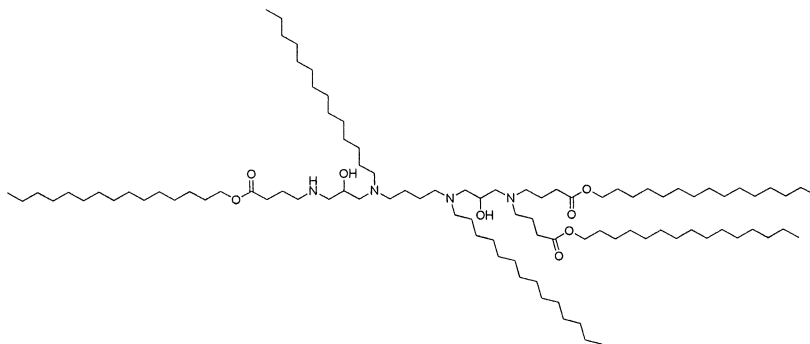


trong đó, trong các công thức (204)-(213), g, e và f độc lập với nhau là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 6, mỗi “HCC” là chuỗi hydrocarbon, và mỗi \* là một điểm liên kết tiềm năng của R<sub>103</sub> với nguyên tử nitơ trong công thức (201), trong đó mỗi H ở vị trí \* bất kỳ có thể được thay thế để liên kết được với nguyên tử nitơ trong công thức (201).

Hợp chất như được thể hiện bởi công thức (201) có thể được điều chế như được mô tả trong công bố đơn Trung Quốc số CN103380113A.

Theo một số phương án, amin hữu cơ là amin hữu cơ như được thể hiện bởi công thức (214) và/hoặc amin hữu cơ như được thể hiện bởi công thức (215):





công thức (215);

Lipit trợ giúp là cholesterol, các chất tương tự cholesterol và/hoặc dẫn xuất cholesterol.

Lipit được PEGyl hóa là 1,2-dipalmitoyl-sn-glyxero-3-phosphatidyletanolamin-N-[metoxy(polyetylen glycol)]-2000.

Theo một số phương án, tỷ lệ mol giữa amin hữu cơ, lipit trợ giúp, và lipit được PEGyl hóa trong dược phẩm là (19,7-80): (19,7-80): (0,3-50), ví dụ, tỷ lệ mol; có thể là (50-70): (20-40): (3-20).

Theo một số phương án, các hạt dược phẩm được tạo thành bởi siARN theo sáng chế và các chất chuyển nhiễm chứa amin nêu trên có đường kính hạt trung bình nằm trong khoảng từ 30 nm đến 200 nm, thông thường nằm trong khoảng từ 40 nm đến 135 nm, và thông thường hơn, đường kính trung bình của hạt liposom nằm trong khoảng từ 50 nm đến 120 nm, từ 50 nm đến 100 nm, từ 60 nm đến 90 nm, hoặc từ 70 nm đến 90 nm; ví dụ, đường kính trung bình của hạt liposom là 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 hoặc 160 nm.

Theo một số phương án, trong dược phẩm được tạo thành bởi siARN theo sáng chế và chất chuyển nhiễm chứa amin nêu trên, tỷ lệ khối lượng (tỷ lệ khối lượng/khối lượng) của siARN so với tổng lượng lipit, ví dụ, các amin hữu cơ, các lipit hỗ trợ và/hoặc các lipit được PEGyl hóa, nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:50, từ 1:1 đến 1:30, từ 1:3 đến 1:20, từ 1:4 đến 1:18, từ 1:5 đến 1:17, từ 1:5 đến 1:15, từ 1:5 đến 1:12, từ 1:6 đến 1:12, hoặc từ 1:6 đến 1:10. ví dụ, tỷ lệ khối lượng của siARN theo sáng chế so với tổng lượng lipit là khoảng 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, hoặc 1:18.

Theo một số phương án, dược phẩm có thể được bán trên thị trường ở dạng mỗi thành phần riêng biệt, và được sử dụng ở dạng dược phẩm dạng lỏng. Theo một số phương án, dược phẩm được tạo thành bởi siARN theo sáng chế và chất mang dược dụng

nêu trên có thể được bào chế bằng các quy trình đã biết khác nhau, ngoại trừ là thay thế siARN hiện nay bằng siARN theo sáng chế. Theo một số phương án, dược phẩm có thể được bào chế theo quy trình sau:

Các amin hữu cơ, lipid trợ giúp và lipid được PEGyl hóa được tạo huyền phù trong rượu ở tỷ lệ mol như được mô tả trên đây và được trộn đồng nhất để thu được dung dịch lỏng; rượu được sử dụng với lượng sao cho dung dịch lipid thu được có mặt với tổng nồng độ khối lượng là từ 2 đến 25 mg/mL (ví dụ, 8 đến 18 mg/mL). Rượu này là rượu được dụng, như rượu mà ở dạng lỏng ở nhiệt độ trong phòng, ví dụ, một hoặc nhiều trong số ethanol, propylen glycol, rượu benzylic, glyxerol, PEG 200, PEG 300, và PEG 400, như ethanol.

siARN theo sáng chế được hòa tan trong dung dịch nước muối được đệm để tạo ra dung dịch nước chứa siARN. Dung dịch nước muối được đệm có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,5 M, như 0,1 đến 0,2 M. Độ pH của dung dịch nước muối được đệm được điều chỉnh đến mức nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,5, như từ 5,0 đến 5,2. Dung dịch nước muối được đệm được sử dụng với lượng sao cho siARN có mặt ở nồng độ dưới 0,6 mg/ml, như từ 0,2 đến 0,4 mg/mL. Dung dịch muối được đệm có thể là một hoặc nhiều dung dịch được chọn từ nhóm bao gồm axetat hòa tan và xitrat hòa tan, như natri axetat và/hoặc kali axetat.

Dung dịch lipid và dung dịch nước chứa siARN được trộn với nhau. Sản phẩm thu được bằng cách trộn được ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 60°C trong ít nhất 2 phút (ví dụ, nằm trong khoảng từ 5 đến 30 phút) để tạo ra dược phẩm dạng lỏng được ủ. Tỷ lệ theo thể tích của dung dịch lipid so với dung dịch nước chứa siARN là 1: (2-5).

Dược phẩm dạng lỏng đã ủ được cô hoặc pha loãng, tinh chế để loại bỏ các tạp chất, và sau đó được vô trùng để thu được dược phẩm theo sáng chế, mà có các thông số hóa lý sau: độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8, tỷ lệ phần trăm bao nang là lớn hơn 80%, cỡ hạt nằm trong khoảng từ 40 đến 200 nm, chỉ số đa phân tán là nhỏ hơn 0,30, và áp suất thẩm thấu là nằm trong khoảng từ 250 đến 400 mOsm/kg. Ví dụ, các thông số hóa lý có thể là như sau: độ pH nằm trong khoảng từ 7,2 đến 7,6, tỷ lệ phần trăm bao nang là lớn hơn 90%, cỡ hạt nằm trong khoảng từ 60 đến 100 nm, chỉ số đa phân tán là dưới 0,20, và áp suất thẩm thấu nằm trong khoảng từ 300 đến 400 mOsm/kg.



Trong đó, bước cô hoặc pha loãng có thể được thực hiện trước, sau hoặc đồng thời với bước loại bỏ các tạp chất. Phương pháp loại bỏ các tạp chất có thể là phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp hiện nay, ví dụ, siêu lọc bằng cột sợi rỗng có kích thước lỗ lọc bằng 100 kDa và PBS ở độ pH 7,4 làm dung dịch trao đổi siêu lọc sử dụng hệ dòng chảy tiếp tuyến. Phương pháp vô trùng có thể là phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp hiện nay, như vô trùng bằng cách lọc trên màng lọc có kích thước lỗ lọc bằng 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### Thế tiếp hợp siARN

Sáng chế đề xuất thế tiếp hợp siARN chứa siARN nêu trên và nhóm tiếp hợp được liên kết với siARN bằng cách tiếp hợp.

Nói chung, nhóm tiếp hợp chứa ít nhất một nhóm hướng đích được dùng và tác nhân liên kết tùy ý. Hơn nữa, siARN, tác nhân liên kết và nhóm hướng đích được liên kết liên tiếp. Theo một số phương án, số nhóm hướng đích là từ 1 đến 6. Theo một số phương án, số nhóm hướng đích là từ 2 đến 4. Phân tử siARN có thể được tiếp hợp cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với nhóm tiếp hợp, ví dụ phân tử siARN có thể được tiếp hợp cộng hóa trị với nhóm tiếp hợp. Vị trí tiếp hợp giữa siARN và nhóm tiếp hợp có thể là ở đầu 3' hoặc đầu 5' của mạch có nghĩa của siARN, hoặc ở đầu 5' của mạch đối nghĩa của siARN, và có thể nằm trong trình tự của siARN. Theo một số phương án, vị trí tiếp hợp giữa siARN và nhóm tiếp hợp là ở đầu 3' của mạch có nghĩa của siARN.

Theo một số phương án, nhóm tiếp hợp có thể được liên kết với nhóm phosphat, 2'-hydroxy hoặc bazơ của nucleotit. Nhóm tiếp hợp cũng có thể được liên kết với nhóm 3'-hydroxy khi các nucleotit được liên kết thông qua liên kết 2'-5'-phosphodiester. Khi nhóm tiếp hợp được liên kết với đầu của siARN, nhóm tiếp hợp thường được liên kết với nhóm phosphat của nucleotit; khi nhóm tiếp hợp được liên kết với nội trình tự của siARN, thì nhóm tiếp hợp này thường được liên kết với vòng riboza hoặc bazơ. Để biết thêm về các cách thức liên kết khác nhau, có thể tham khảo tài liệu: Muthiah Manoharan *et.al.* siRNA conjugates carrying sequentially assembled trivalent N-acetylgalactosamin linked through nucleosides elicit robust gene silencing in vivo in hepatocytes. ACS Chemical biology, 2015, 10(5): 1181-7.

Theo một số phương án, siARN và nhóm tiếp hợp có thể được liên kết với nhau bằng liên kết hóa học dễ bị khử hoặc không bền với axit, và các liên kết hóa học này có

thể bị phân hủy trong môi trường axit của endosom tế bào, nhờ đó tạo ra siARN ở trạng thái tự do. Đối với các cách thức tiếp hợp không dễ bị phân hủy, nhóm tiếp hợp có thể được liên kết với mạch có nghĩa của siARN, nhờ đó làm giảm tối thiểu tác động của việc tiếp hợp đến hoạt tính của siARN.

Theo một số phương án, nhóm hướng đích được dụng có thể là phối tử thông thường trong phạm vi sử dụng siARN, ví dụ, các phối tử khác nhau như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2009082607A2, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, nhóm hướng đích được dụng có thể là một hoặc nhiều nhóm được chọn từ các phối tử được tạo thành bởi các phân tử hướng đích sau hoặc các dẫn xuất của chúng: các phân tử ưa chất béo, như cholesterol, axit mật, vitamin (như vitamin E), phân tử lipid với chiều dài chuỗi khác nhau; polyme, như polyetylen glycol; polypeptit, như peptit xâm nhập tế bào; aptame; kháng thể; chấm lượng tử; sacarit, như lactoza, polylactoza, mannoza, galactoza, N-acetylgalactosamin (GalNAc); folat; hoặc các phối tử thụ thể được biểu hiện trong các tế bào nhu mô gan, như asialoglycoprotein, gốc asialo-đường, lipoprotein (như lipoprotein tỷ trọng cao, lipoprotein tỷ trọng thấp và nhóm tương tự), glucagon, chất dẫn truyền thần kinh (như adrenalin), yếu tố phát triển, transferrin và nhóm tương tự.

Theo một số phương án, mỗi phối tử độc lập được chọn từ phối tử có khả năng gắn kết với thụ thể trên bề mặt tế bào. Theo một số phương án, ít nhất một phối tử là phối tử có khả năng gắn kết với thụ thể trên bề mặt của tế bào gan. Theo một số phương án, ít nhất một phối tử là phối tử có khả năng gắn kết với thụ thể trên bề mặt của tế bào gan của động vật có vú. Theo một số phương án, ít nhất một phối tử là phối tử có khả năng gắn kết với thụ thể trên bề mặt của tế bào gan của người. Theo một số phương án, ít nhất một phối tử là phối tử có khả năng gắn kết với thụ thể asialoglycoprotein (asialoglycoprotein receptor-ASGPR) trên bề mặt của tế bào gan. Các loại thụ thể này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và chúng thường có chức năng gắn kết với thụ thể đặc hiệu trên bề mặt của tế bào đích, nhờ đó phân phối siARN đã liên kết với phối tử vào tế bào đích.

Theo một số phương án, nhóm hướng đích được dụng có thể là phối tử bất kỳ mà gắn kết với các thụ thể asialoglycoprotein (ASGPR) trên bề mặt của các tế bào gan của động vật có vú. Theo một số phương án, mỗi phối tử độc lập là asialoglycoprotein, như

asialoorosomucoit (ASOR) hoặc asialofetuin (ASF). Theo một số phương án, phối tử là sacarit hoặc dẫn xuất của nó.

Theo một số phương án, ít nhất một phối tử là sacarit. Theo một số phương án, mỗi phối tử là sacarit. Theo một số phương án, ít nhất một phối tử là monosacarit, polysacarit, monosacarit được cải biến, polysacarit được cải biến, hoặc dẫn xuất sacarit. Theo một số phương án, ít nhất một phối tử có thể là monosacarit, disacarit hoặc trisacarit. Theo một số phương án, ít nhất một phối tử là sacarit đã cải biến. Theo một số phương án, mỗi phối tử là sacarit đã cải biến. Theo một số phương án, mỗi phối tử độc lập được chọn từ polysacarit, polysacarit đã cải biến, monosacarit, monosacarit đã cải biến, dẫn xuất polysacarit, và dẫn xuất monosacarit. Theo một số phương án, mỗi phối tử hoặc ít nhất một phối tử 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.

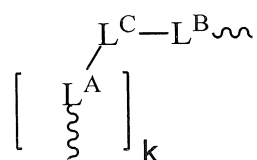
Theo một số phương án, mỗi phối tử có thể độc lập được chọn từ nhóm bao gồm D-mannopyranoza, L-mannopyranoza, D-arabinoza, D-xylofuranoza, L-xylofuranoza, D-glucoza, L-glucoza, D-galactoza, L-galactoza,  $\alpha$ -D-mannofuranoza,  $\beta$ -D-mannofuranoza,  $\alpha$ -D-mannopyranoza,  $\beta$ -D-mannopyranoza,  $\alpha$ -D-glucopyranoza,  $\beta$ -D-glucopyranoza,  $\alpha$ -D-glucofuranoza,  $\beta$ -D-glucofuranoza,  $\alpha$ -D-fructofuranoza,  $\alpha$ -D-fructopyranoza,  $\alpha$ -D-galactopyranoza,  $\beta$ -D-galactopyranoza,  $\alpha$ -D-galactofuranoza,  $\beta$ -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- $\beta$ -D-glucopyranoza, 2-deoxy-2-metyl amino-L-glucopyranoza, 4,6-dideoxy-4-formamido-2,3-di-O-metyl-D-mannopyranoza, 2-deoxy-2-sulfoamino-D-glucopyranoza, axit N-glycolyl- $\alpha$ -neuraminic, 5-thio- $\beta$ -D-glucopyranoza, metyl 2,3,4-tris-O-axetyl-1-thio-6-O-trityl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, 4-thio- $\beta$ -D-galactopyranoza, etyl 3,4,6,7-tetra-O-axetyl-2-deoxy-1,5-dithio- $\alpha$ -D-glucoheptopyranoside,

2,5-anhydro-D-allononitril, riboza, D-riboza, D-4-thioriboza, L-riboza, L-4-thioriboza. Các lựa chọn khác về phối tử có thể được tìm thấy trong, ví dụ, bản mô tả của công bố đơn Trung Quốc số CN105378082A, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, nhóm hướng đích được dùng trong thể tiếp hợp siARN có thể là galactosa hoặc N-axetylgalactosamin, trong đó các phân tử galactosa hoặc N-axetylgalactosamin có thể có hóa trị một, hai, ba hoặc bốn. Cần hiểu rằng các thuật ngữ hóa trị một, hai, ba hoặc bốn được mô tả ở đây lần lượt có nghĩa là tỷ lệ mol của phân tử siARN so với phân tử galactosa hoặc N-axetylgalactosamin trong thể tiếp hợp siARN là 1:1, 1:2, 1:3 hoặc 1:4, trong đó thể tiếp hợp siARN được tạo thành từ phân tử siARN và nhóm tiếp hợp chứa phân tử galactosa hoặc N-axetylgalactosamin làm nhóm hướng đích. Theo một số phương án, nhóm hướng đích được dùng là N-axetylgalactosamin. Theo một số phương án, khi oligonucleotit mạch kép theo sáng chế được tiếp hợp với nhóm tiếp hợp chứa N-axetylgalactosamin, thì phân tử N-axetylgalactosamin có hóa trị ba hoặc hóa trị bốn. Theo một số phương án, khi siARN theo sáng chế được tiếp hợp với nhóm tiếp hợp chứa N-axetylgalactosamin, thì phân tử N-axetylgalactosamin có hóa trị ba.

Nhóm hướng đích có thể được liên kết với phân tử siARN thông qua yếu tố liên kết thích hợp, và yếu tố liên kết thích hợp có thể được lựa chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này tùy theo loại nhóm hướng đích cụ thể. Các loại yếu tố liên kết và các nhóm hướng đích và các cách thức liên kết với siARN có thể được tìm hiểu trong bản mô tả của công bố đơn quốc tế số WO2015006740A2, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, khi nhóm hướng đích là N-axetylgalactosamin, thì yếu tố liên kết thích hợp có thể có cấu trúc sau như được thể hiện bởi công thức (301):

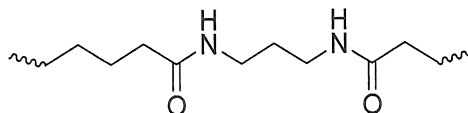


công thức (301)

trong đó,

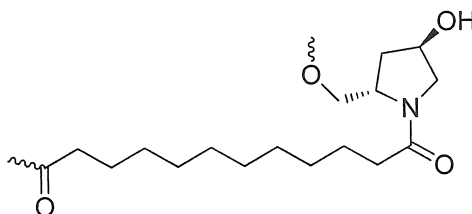
k là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3;

$L^A$  là chuỗi chứa liên kết amit mà có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (302), và hai đầu của mỗi nhóm  $L^A$  lần lượt được liên kết với nhóm hướng đích và gốc  $L^C$  thông qua liên kết ete:



công thức (302);

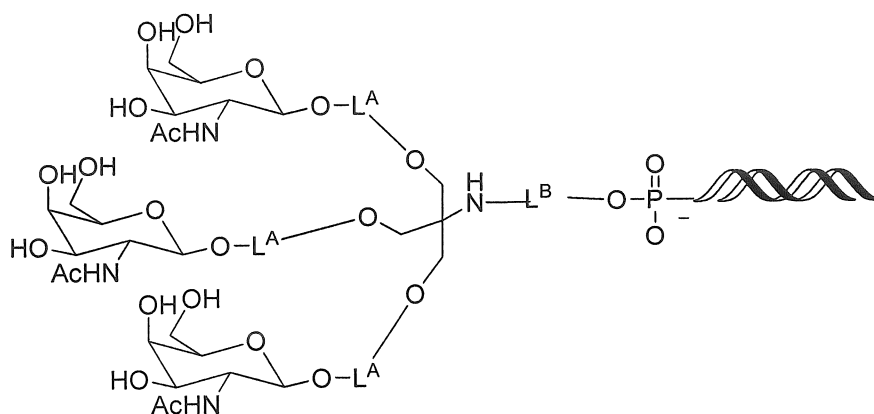
$L^B$  là chuỗi chứa N-axylpyrrolidin mà có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (303), trong đó chuỗi này có nhóm carbonyl ở một đầu và được liên kết với gốc  $L^C$  thông qua liên kết amit, và có nhóm oxy ở đầu còn lại và được liên kết với siARN thông qua liên kết phosphoeste:



công thức (303);

$L^C$  là nhóm liên kết có hóa trị hai đến hóa trị bốn dựa trên hydroxymetyl aminometan, dihydroxymetyl aminometan hoặc trihydroxymetyl aminometan, và  $L^C$  được liên kết với các gốc  $L^A$  thông qua liên kết ete nhờ nguyên tử oxy, và được liên kết với gốc  $L^B$  thông qua liên kết amit nhờ nguyên tử nitơ.

Theo một số phương án, khi  $n=3$  và  $L^C$  là nhóm liên kết hóa trị bốn dựa trên trihydroxymetyl aminometan, thể tiếp hợp siARN được tạo thành bằng cách liên kết các phân tử N-axetylgalactosamin với phân tử siARN thông qua yếu tố liên kết  $-(L^A)_3$ -trihydroxymetyl aminometan- $L^B$  có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (304):

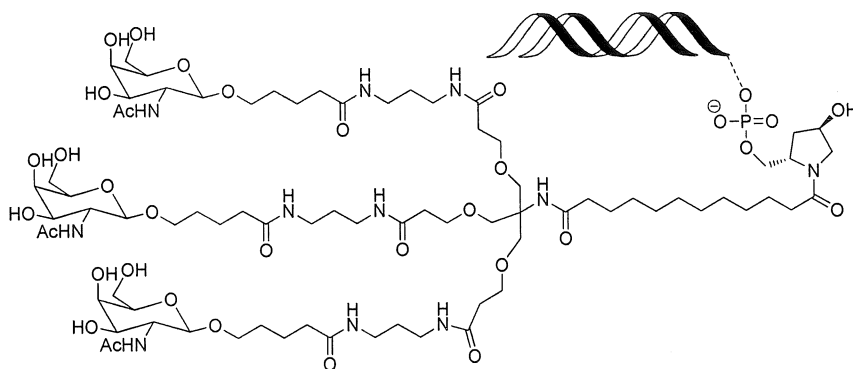


công thức (304),

trong đó cấu trúc xoắn kép là siARN.

Tương tự, vị trí tiếp hợp giữa siARN và nhóm tiếp hợp có thể ở đầu 3' hoặc đầu 5' của mạch có nghĩa của siARN, hoặc ở đầu 5' của mạch đối nghĩa, hoặc trong nội trình tự của siARN.

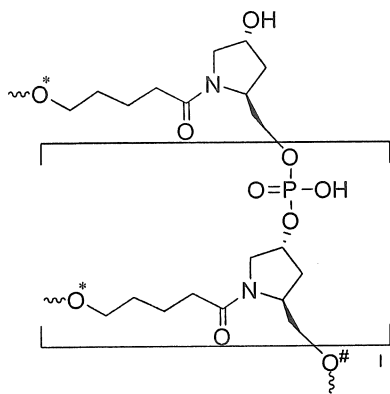
Theo một số phương án, đầu 3' của mạch có nghĩa của siARN theo sáng chế được tiếp hợp cộng hóa trị với ba phân tử N-axetylgalactosamin (GalNAc) thông qua yếu tố liên kết  $-(L^A)_3$ -trihydroxymetyl aminometan- $L^B$ -, để tạo thành thể tiếp hợp siARN trong đó tỷ lệ mol giữa phân tử siARN so với phân tử GalNAc là 1:3 (sau đây được gọi là  $(\text{GalNAc})_3$ -siARN), và thể tiếp hợp này có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (305):



công thức (305),

trong đó cấu trúc xoắn kép là siARN; và yếu tố liên kết được liên kết với đầu 3' của mạch có nghĩa của siARN.

Theo một số phương án, khi nhóm hướng đích là N-axetylgalactosamin, yếu tố liên kết thích hợp có thể có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (306):



công thức (306)

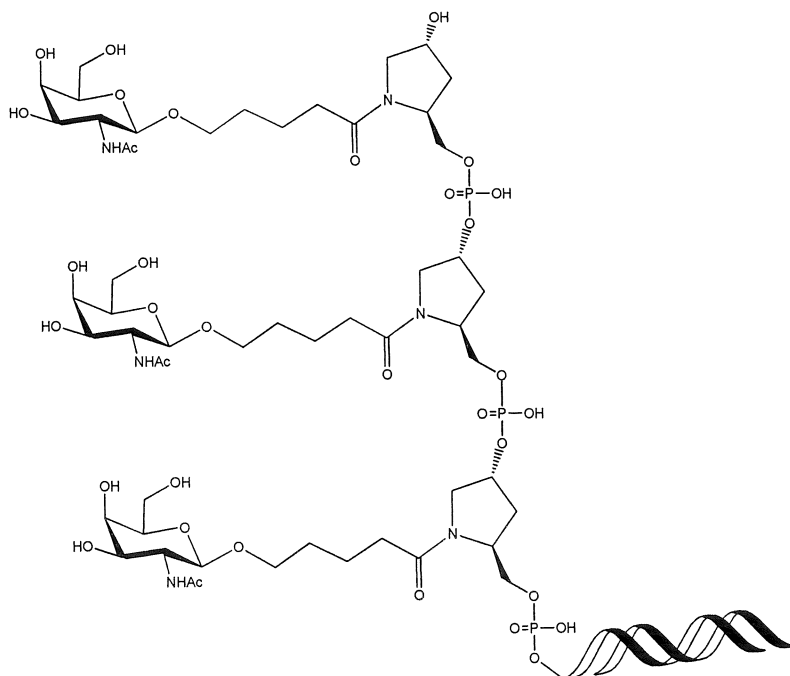
trong đó,

$l$  là một số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 3;

$*$  là vị trí trên yếu tố liên kết được liên kết với nhóm hướng đích thông qua liên kết este; và

$\#$  là vị trí trên yếu tố liên kết được liên kết với siARN thông qua liên kết phosphoeste.

Theo một vài phương án cụ thể, khi  $l=2$ , thể tiếp hợp siARN có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (307):

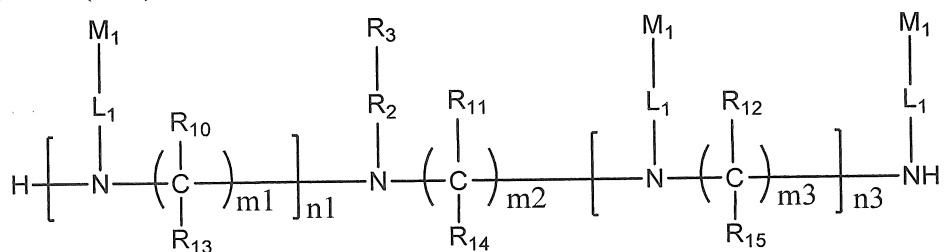


công thức (307),

trong đó, cấu trúc xoắn kép là siARN; và yếu tố liên kết được liên kết với đầu 3' của mạch có nghĩa của siARN.

Thẻ tiếp hợp trên đây có thể được tổng hợp theo phương pháp được mô tả trong giải pháp kỹ thuật đã biết. Ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO2015006740 A2 mô tả chi tiết các phương pháp sản xuất các thẻ tiếp hợp khác nhau. Thẻ tiếp hợp siARN theo sáng chế có thể thu được bằng các phương pháp đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO2014025805A1 mô tả phương pháp sản xuất thẻ tiếp hợp có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (305). Rajeev *et al.*, ChemBioChem 2015, 16, 903-908 mô tả phương pháp sản xuất thẻ tiếp hợp có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (307).

Theo một số phương án, thẻ tiếp hợp siARN có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (308):



công thức (308),

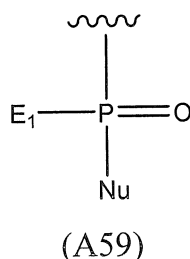
trong đó,

$n_1$  là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3, và  $n_3$  là một số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4;

mỗi  $m_1$ ,  $m_2$ , hoặc  $m_3$  độc lập với nhau là một số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 10;

$R_{10}$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{12}$ ,  $R_{13}$ ,  $R_{14}$ , hoặc  $R_{15}$  độc lập với nhau là H, hoặc được chọn từ nhóm bao gồm  $C_1$ - $C_{10}$  alkyl,  $C_1$ - $C_{10}$  haloalkyl, và  $C_1$ - $C_{10}$  alkoxy,

$R_3$  là nhóm có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (A59):



trong đó  $E_1$  là OH, SH hoặc  $BH_2$ ; và Nu là siARN theo sáng chế;

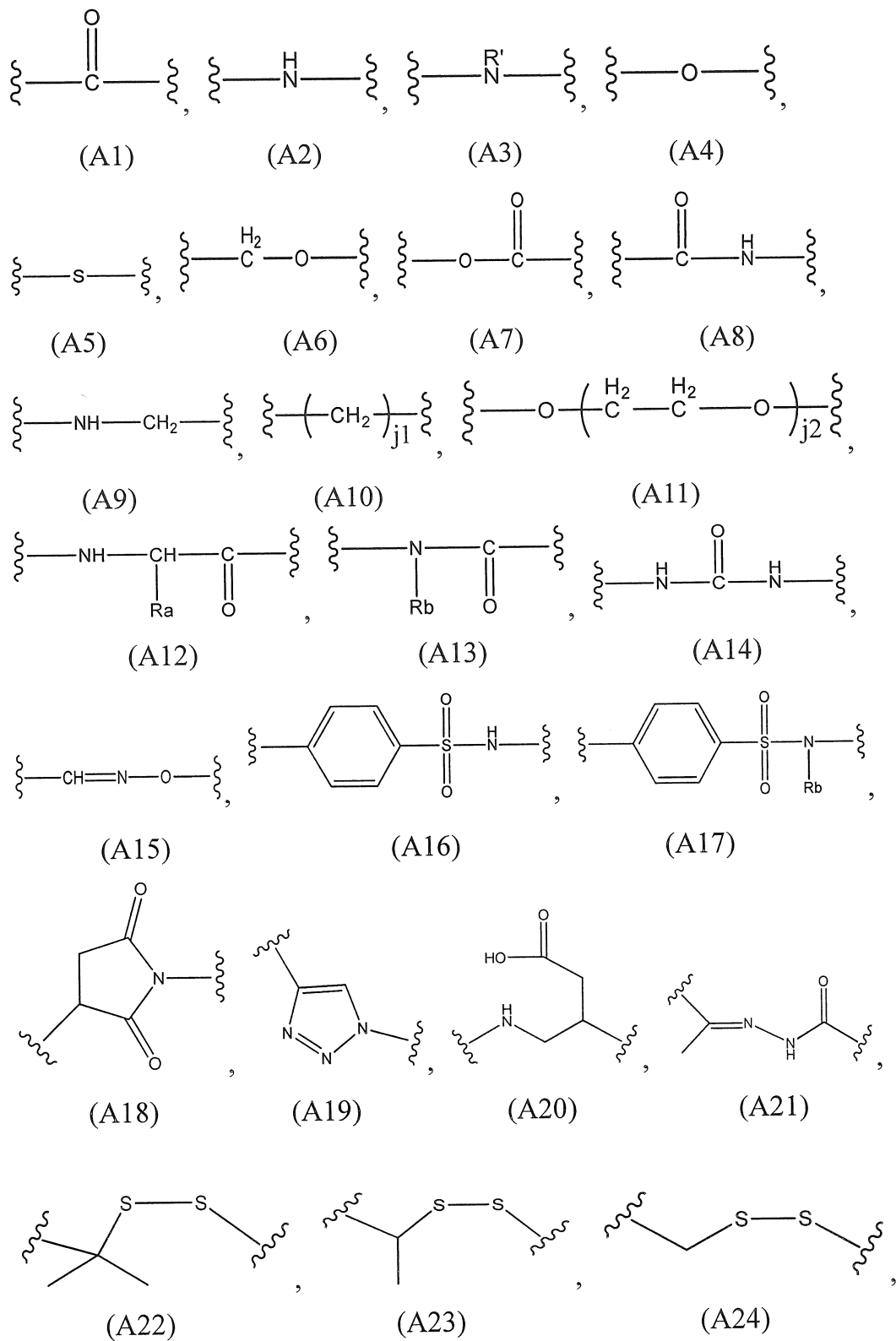
$R_2$  là alkylen mạch thẳng có chiều dài gồm từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tùy ý được thay thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ

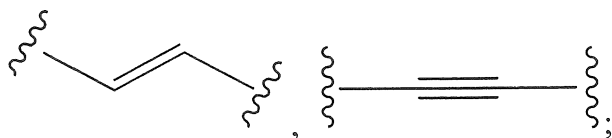


được chọn từ nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, S(O)<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alkenylen, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alkynylen, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> arylen, C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub> heteroxycylen, và C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> heteroarylen, và trong đó R<sub>2</sub> tùy ý có một hoặc nhiều nhóm thế bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> aryl, C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> heteroaryl, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> haloalkyl, -OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, -OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkylphenyl, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl-OH, -OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> haloalkyl, -SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, -SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkylphenyl, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl-SH, -SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl-NH<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkylphenyl), NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkylphenyl), xyano, nitro, -CO<sub>2</sub>H, -C(O)OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, -CON(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -CONH<sub>2</sub>, -NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkylphenyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> haloalkyl, -OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -SO<sub>2</sub>(phenyl), -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> haloalkyl), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -SO<sub>2</sub>NH(phenyl), -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -NHSO<sub>2</sub>(phenyl), và -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> haloalkyl);

mỗi L<sub>1</sub> độc lập là alkylen mạch thẳng có chiều dài gồm từ 1 đến 70 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tùy ý được thay thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, S(O)<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alkenylen, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alkynylen, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> arylen, C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub> heteroxycylen, và C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> heteroarylen, và trong đó L<sub>1</sub> tùy ý có một hoặc nhiều nhóm thế bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> aryl, C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> heteroaryl, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> haloalkyl, -OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, -OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkylphenyl, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl-OH, -OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> haloalkyl, -SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, -SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkylphenyl, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl-SH, -SC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl-NH<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkylphenyl), NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkylphenyl), xyano, nitro, -CO<sub>2</sub>H, -C(O)OC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, -CON(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -CONH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -CONH<sub>2</sub>, -NHC(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl)C(O)(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkylphenyl, -C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> haloalkyl, -OC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl, -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -SO<sub>2</sub>(phenyl), -SO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> haloalkyl), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -SO<sub>2</sub>NH(phenyl), -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl), -NHSO<sub>2</sub>(phenyl), và -NHSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> haloalkyl).

Theo một số phương án,  $L_1$  có thể được chọn từ nhóm bao gồm các nhóm gồm các công thức (A1)-(A26) và tổ hợp bất kỳ của chúng, trong đó các cấu trúc và các định nghĩa của các công thức A1-A26 là như sau:





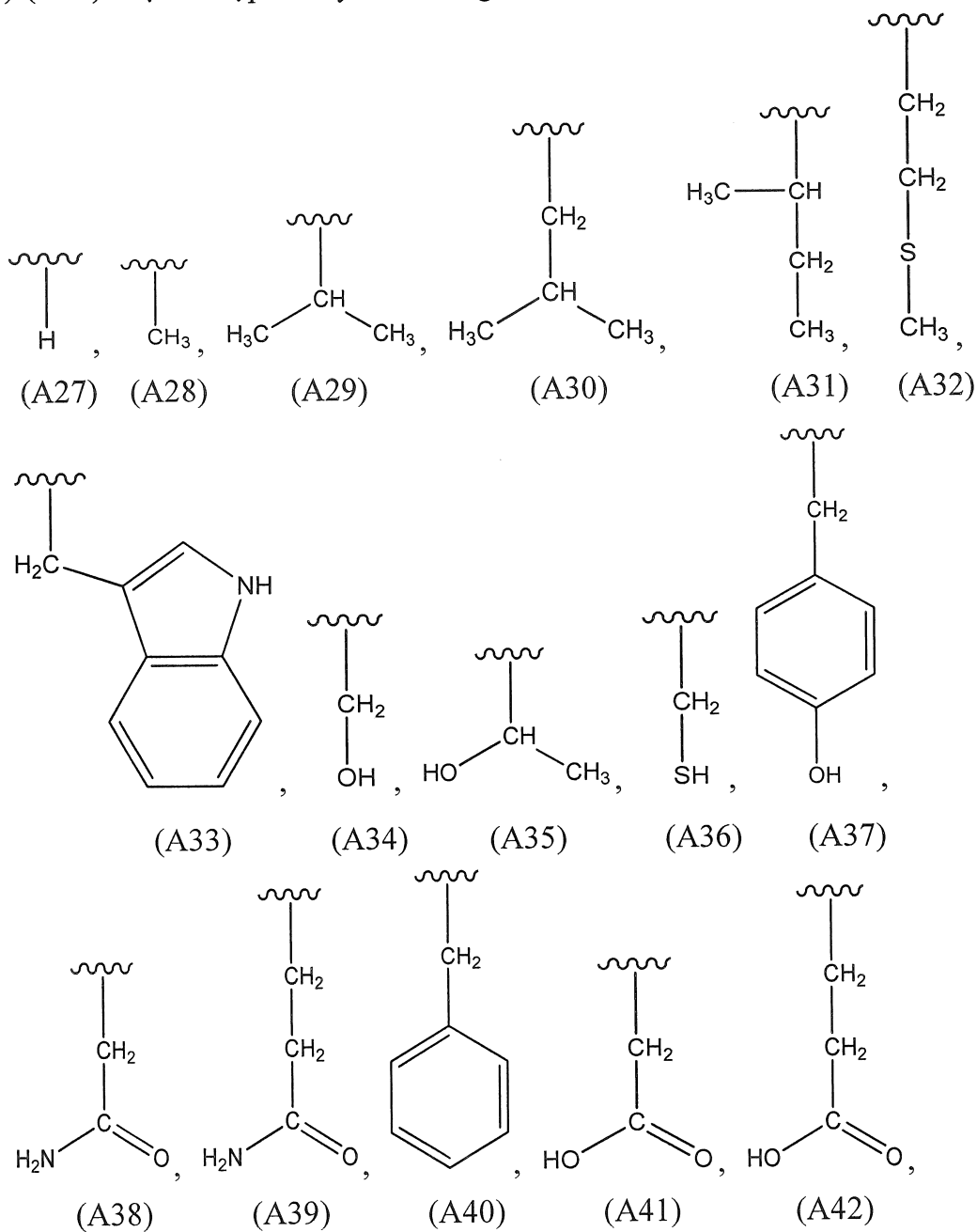
(A25)

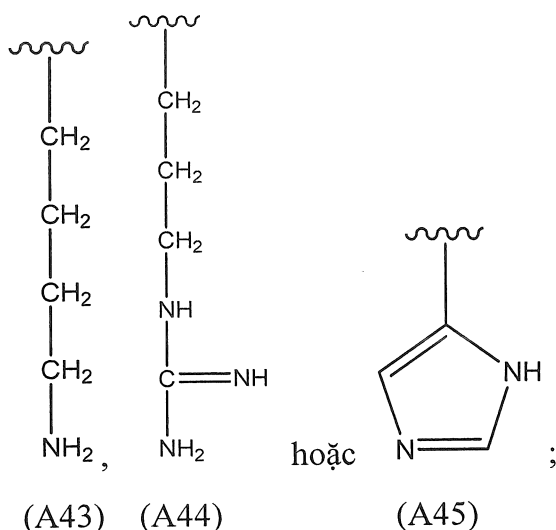
(A26)

trong đó mỗi j1 độc lập là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20; mỗi j2 độc lập là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20;

mỗi R' độc lập là C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl;

mỗi Ra độc lập được chọn từ nhóm bao gồm các nhóm gồm các công thức (A27)-(A45) hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng:





mỗi Rb độc lập là  $\text{C}_1\text{-C}_{10}$  alkyl; và

~~~~~ là vị trí trong đó nhóm được liên kết cộng hóa trị.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng, mặc dù thuận tiện là L_1 được xác định là alkyl mạch thẳng, song nhóm này cũng có thể không phải là nhóm mạch thẳng hoặc được đặt tên khác, như amin hoặc alkenyl được tạo ra bằng cách thay thế và/hoặc thế nêu trên. Theo mục đích của sáng chế, chiều dài của L_1 là số nguyên tử trong chuỗi liên kết hai điểm gắn kết. Theo mục đích này, vòng thu được bằng cách thay thế nguyên tử cacbon trong alkylen mạch thẳng, như heteroxycylen hoặc heteroarylen, được tính là một nguyên tử.

M_1 là nhóm hướng đích, trong đó các định nghĩa và lựa chọn là giống như các định nghĩa và lựa chọn của các nhóm hướng đích nêu trên. Theo một số phương án, mỗi M_1 độc lập là nhóm được chọn từ các phối tử mà có ái lực với thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt của các tế bào gan của động vật có vú.

Khi M_1 là phối tử mà có ái lực với thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt tế bào gan của động vật có vú, theo một số phương án, n_1 có thể là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3, và n_3 có thể là một số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4 để đảm bảo rằng số nhóm hướng đích M_1 trong thể tiếp hợp ít nhất là 2. Theo một số phương án, $n_1 + n_3 \geq 2$, để số nhóm hướng đích M_1 ít nhất là 3, nhờ đó làm cho nhóm hướng đích M_1 dễ gắn kết hơn với thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt của các tế bào gan, nhờ đó dễ nhập bào thể tiếp hợp vào các tế bào. Các thử nghiệm đã chỉ ra rằng khi số phối tử M_1 lớn hơn 3, mức độ dễ dàng gắn kết giữa phối tử M_1 và thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt của tế bào gan không được tăng lên đáng kể. Do đó, theo các khía cạnh khác như mức độ

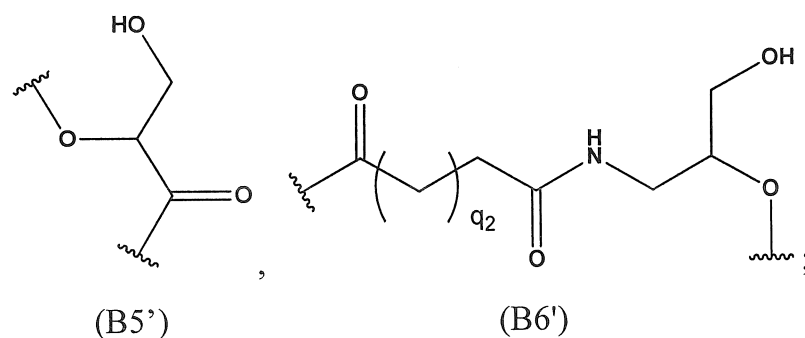
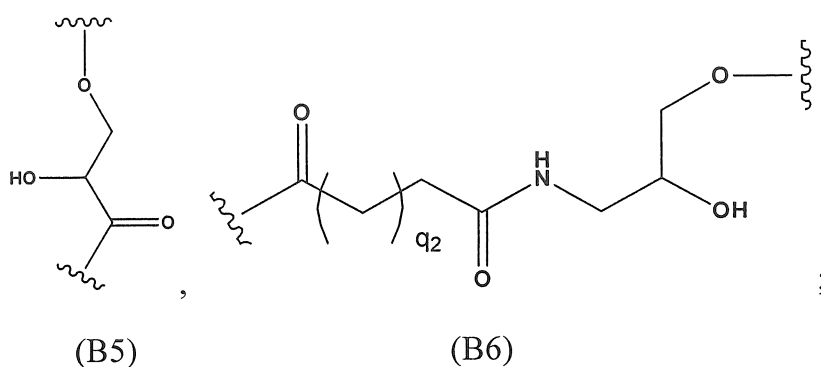
tiện lợi tổng hợp, chi phí cấu trúc/quy trình và hiệu quả phân phối, theo một số phương án, n_1 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 2, n_3 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 1, và $n_1+n_3=2-3$.

Theo một số phương án, khi mỗi m_1 , m_2 , hoặc m_3 độc lập với nhau là một số nguyên được chọn từ 2 đến 10, các vị trí không gian giữa nhiều phối tử M_1 có thể thích hợp để gắn kết giữa các phối tử M_1 và thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt của các tế bào gan. Để tạo ra thể tiếp hợp theo sáng chế có cấu trúc đơn giản hơn, dễ tổng hợp hơn và/hoặc có chi phí ít hơn, theo một số phương án, mỗi m_1 , m_2 hoặc m_3 độc lập với nhau là một số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5; theo một số phương án, $m_1 = m_2 = m_3$.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng khi R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{14} , hoặc R_{15} độc lập với nhau là một nhóm được chọn từ H, C_1 - C_{10} alkyl, C_1 - C_{10} haloalkyl, và C_1 - C_{10} alkoxy, thì chúng sẽ không làm thay đổi các đặc tính của thể tiếp hợp siARN theo sáng chế và đều đạt được mục đích của sáng chế. Theo một số phương án, R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{14} , hoặc R_{15} độc lập với nhau được chọn từ H, methyl hoặc ethyl. Theo một số phương án, R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{14} , và R_{15} là H.

R_3 là nhóm có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (A59), trong đó E_1 là OH, SH hoặc BH_2 , và xét đến khả năng dễ có các nguyên liệu ban đầu, theo một số phương án, E_1 là OH hoặc SH.

R_2 được chọn để đạt được liên kết giữa nhóm như được thể hiện bởi công thức (A59) và nguyên tử N trên khung có nito. Trong phạm vi sáng chế, thuật ngữ “khung có nito” được dùng để chỉ cấu trúc chuỗi trong đó nguyên tử N được liên kết cộng hóa trị với nguyên tử cacbon mà gắn kết với R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{14} , và R_{15} . Do đó, R_2 có thể là nhóm liên kết bất kỳ có khả năng liên kết nhóm như được thể hiện bởi công thức (A59) với nguyên tử N trên khung có nito bằng các biện pháp thích hợp. Theo một số phương án, trong trường hợp thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308) được sản xuất bằng quy trình tổng hợp trên pha rắn, thì nhóm R_2 cần phải có cả vị trí liên kết với nguyên tử N trên khung có nito và vị trí liên kết với nguyên tử P trong R_3 . Theo một số phương án, ở R_2 , vị trí liên kết với nguyên tử N trên khung có nito tạo thành liên kết amit với nguyên tử N, và vị trí liên kết với nguyên tử P trong R_3 tạo thành liên kết phosphoeste với nguyên tử P. Theo một số phương án, R_2 có thể là B5, B6, B5', hoặc B6':



trong đó $\sim$ là vị trí mà nhóm được liên kết thông qua liên kết cộng hóa trị;
 q_2 là một số nguyên nằm trong khoảng 1-10; theo một số phương án, q_2 là một số nguyên nằm trong khoảng 1-5.

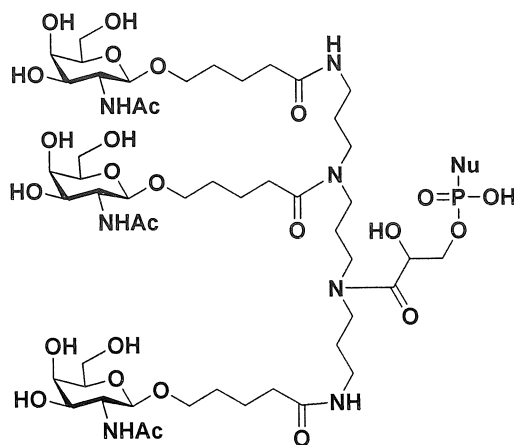
L_1 được sử dụng để liên kết nhóm hướng đích M_1 với nguyên tử N trên khung có nitơ, nhờ đó đem lại chức năng hướng đích vào gan cho thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308). Theo một số phương án, L_1 được chọn từ các tổ hợp liên kết của một hoặc nhiều trong số các công thức (A1)-(A26). Theo một số phương án, L_1 được chọn từ các tổ hợp liên kết của một hoặc nhiều trong số các công thức (A1), (A4), (A5), (A6), (A8), (A10), (A11), và (A13). Theo một số phương án, L_1 được chọn từ các tổ hợp liên kết gồm ít nhất hai trong số các công thức (A1), (A4), (A8), (A10), và (A11). Theo một số phương án, L_1 được chọn từ các tổ hợp liên kết gồm ít nhất hai trong số các công thức (A1), (A8) và (A10).

Theo một số phương án, L_1 có thể có chiều dài gồm 3 đến 25, 3 đến 20, 4 đến 15 hoặc 5 đến 12 nguyên tử. Theo một số phương án, L_1 có chiều dài gồm 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, hoặc 60 nguyên tử.

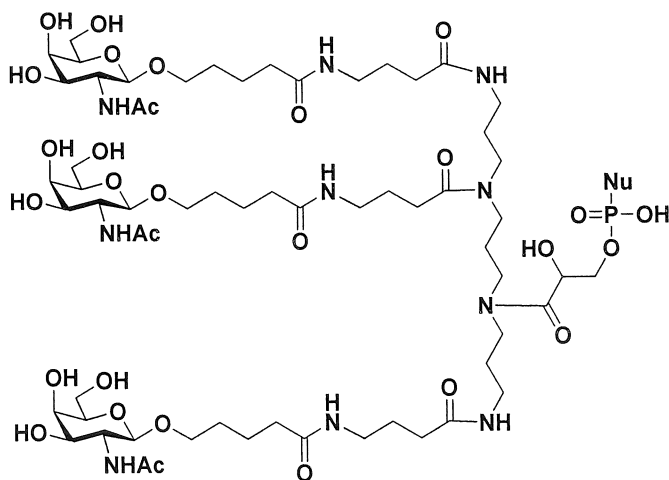
Theo một số phương án, j_1 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 10, và theo một số phương án, j_1 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 3 đến 5. Theo một số phương án, j_2 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 10, và theo một số phương án,

j_2 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 3 đến 5. R' là C_1 - C_4 alkyl, và theo một số phương án, R' là một trong số các nhóm methyl, ethyl và isopropyl. R_a là một trong số các công thức (A27), (A28), (A29), (A30), và (A31), và theo một số phương án, R_a là công thức (A27) hoặc (A28). R_b là C_1 - C_5 alkyl, và theo một số phương án, là một trong số các nhóm methyl, ethyl, isopropyl, và butyl. Theo một số phương án, j_1 , j_2 , R' , R_a , và R_b trong các công thức (A1)-(A26) lần lượt được chọn để đạt được sự liên kết giữa các nhóm hướng đích M_1 và nguyên tử N trên khung có nitơ, và để tạo ra vị trí không gian giữa các nhóm hướng đích M_1 thích hợp cho việc gắn kết giữa các nhóm hướng đích M_1 và thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt của tế bào gan.

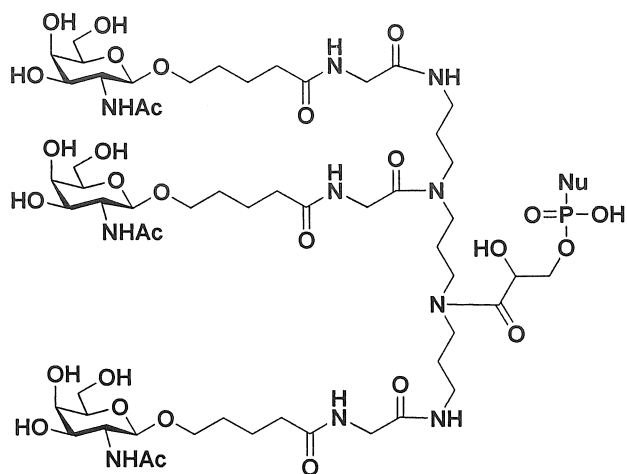
Theo một số phương án, thể tiếp hợp siARN có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (403), (404), (405), (406), (407), (408), (409), (410), (411), (412), (413), (414), (415), (416), (417), (418), (419), (420), (421) hoặc (422):



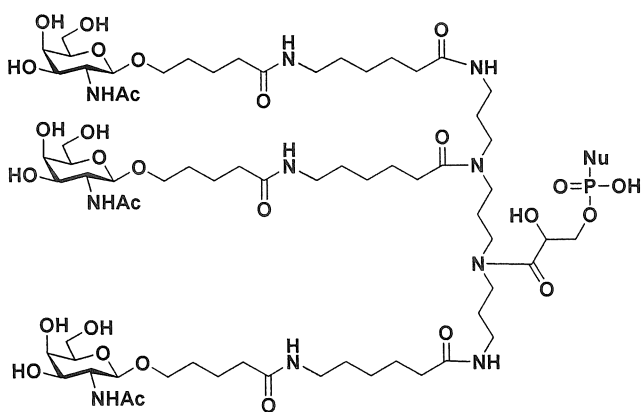
công thức (403)



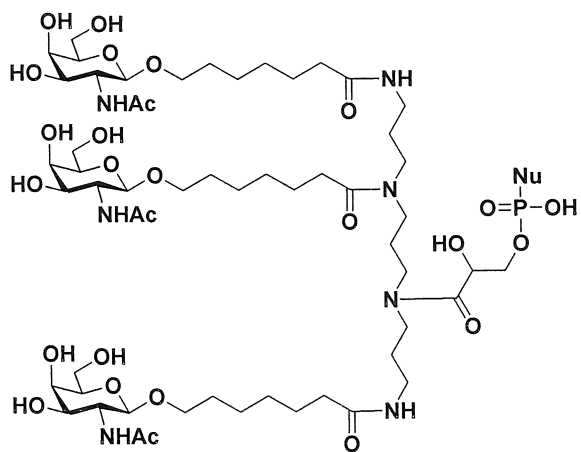
công thức (404)



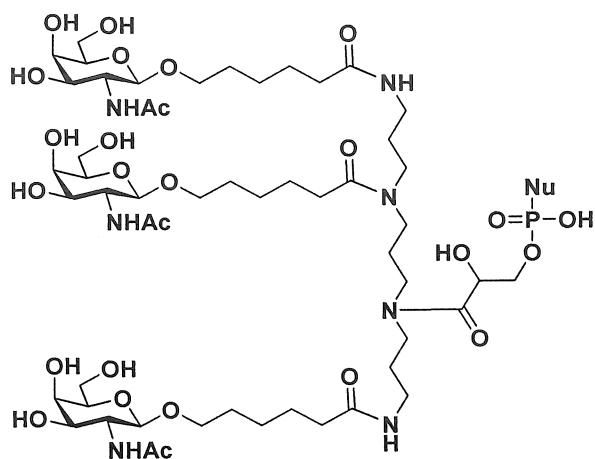
công thức (405)



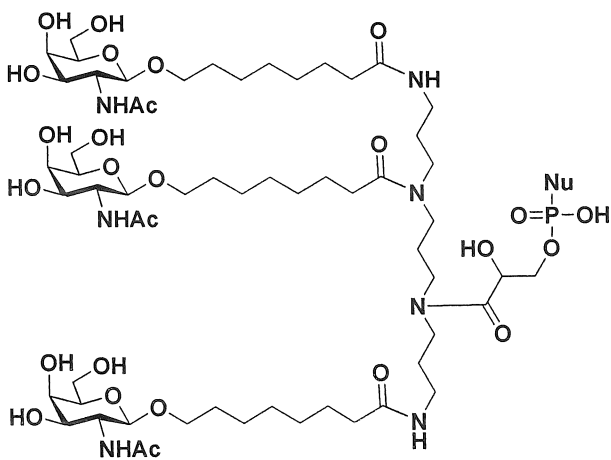
công thức (406)



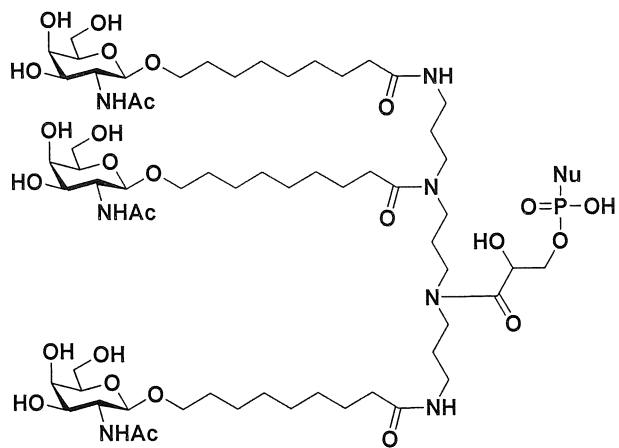
công thức (407)



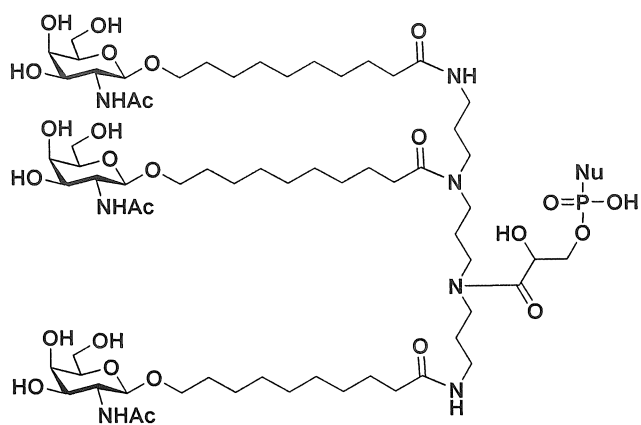
công thức (408)



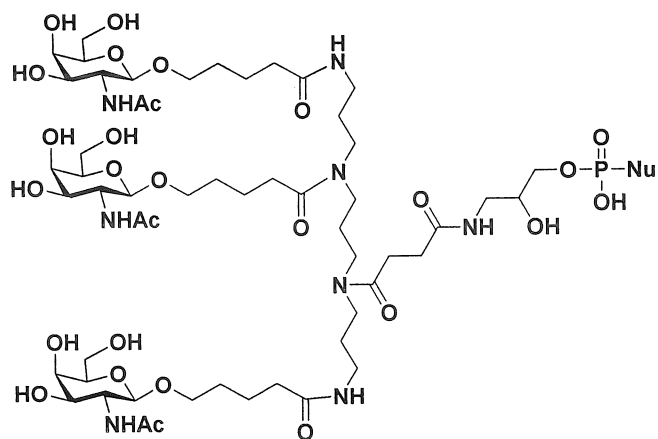
công thức (409)



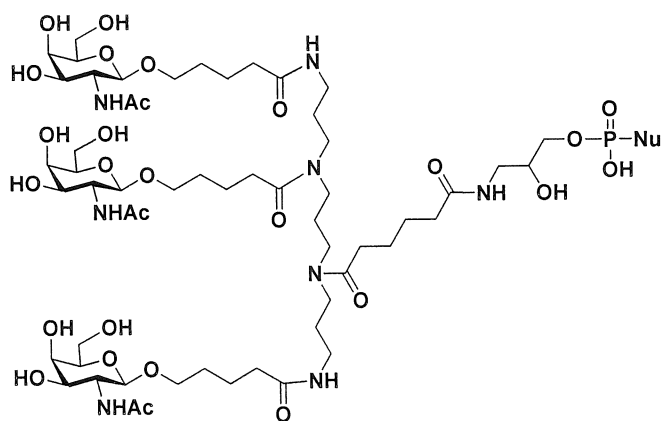
công thức (410)



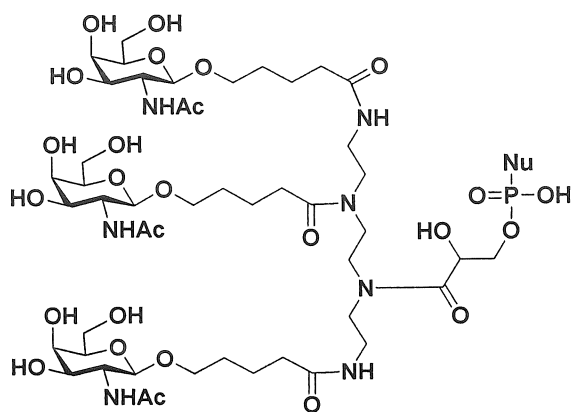
công thức (411)



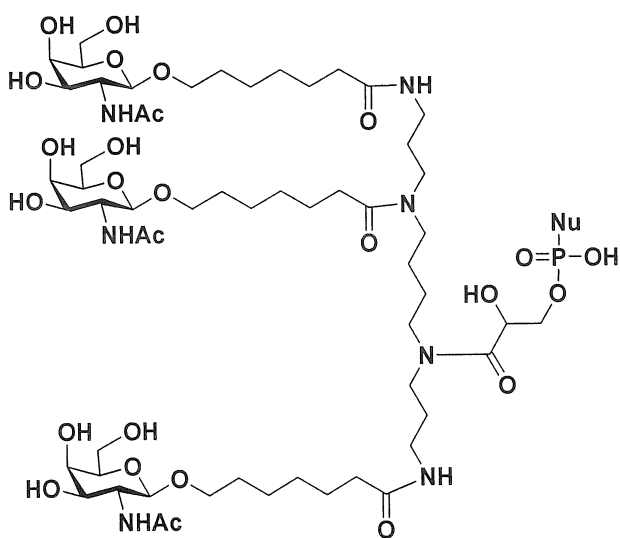
công thức (412)



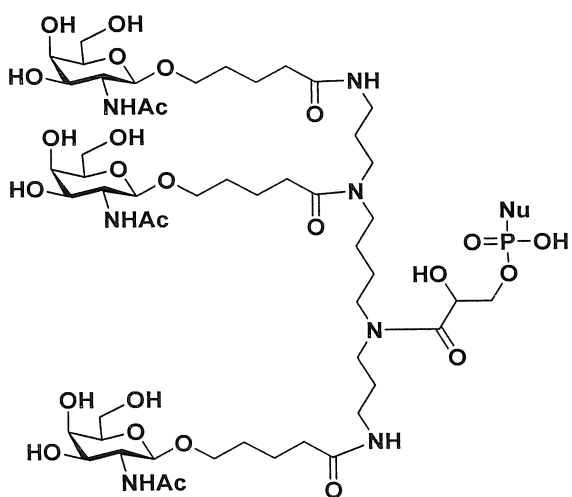
công thức (413)



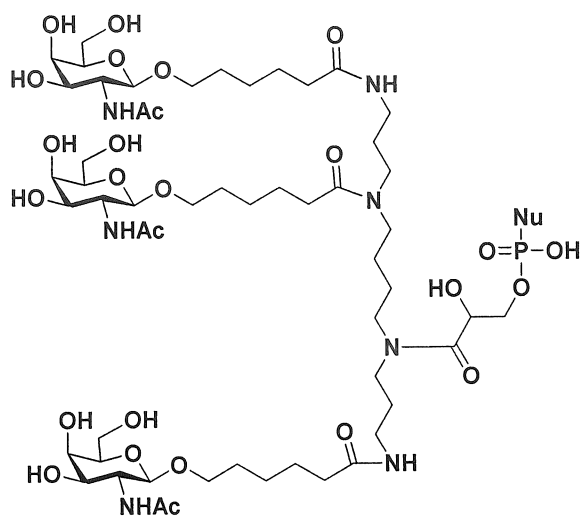
công thức (414)



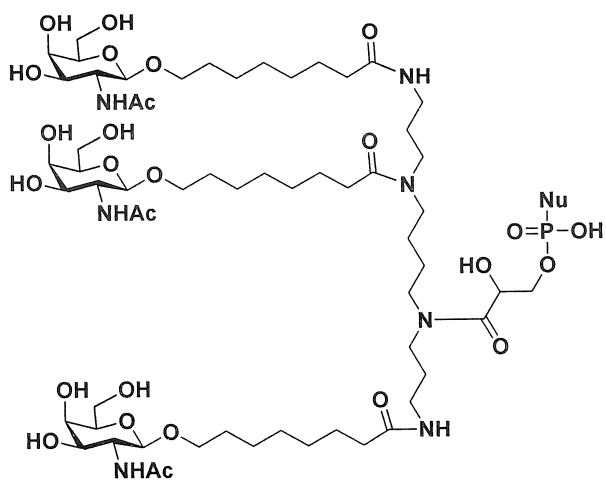
công thức (415)



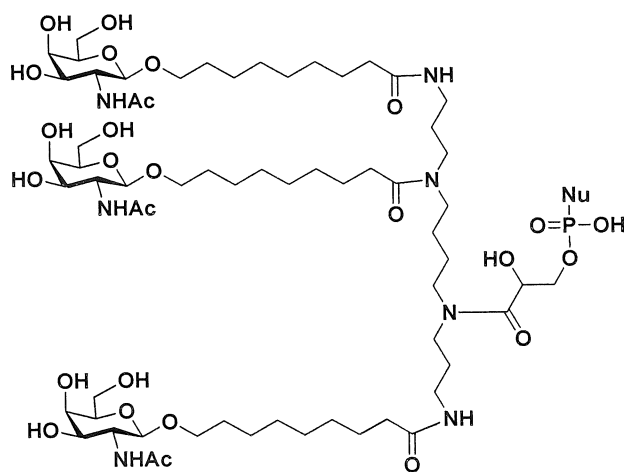
công thức (416)



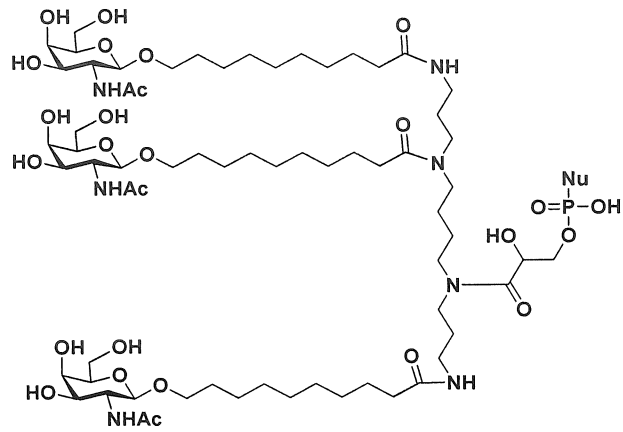
công thức (417)



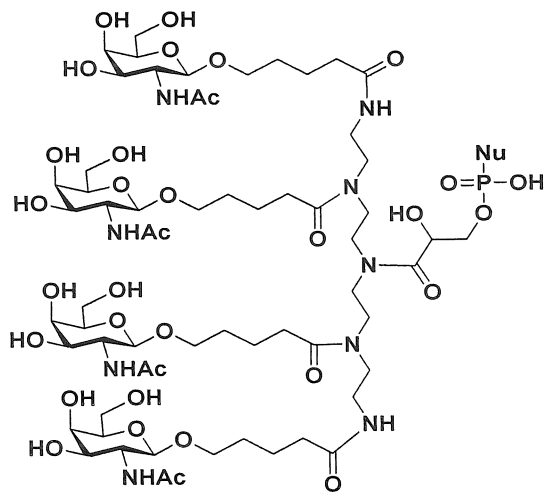
công thức (418)



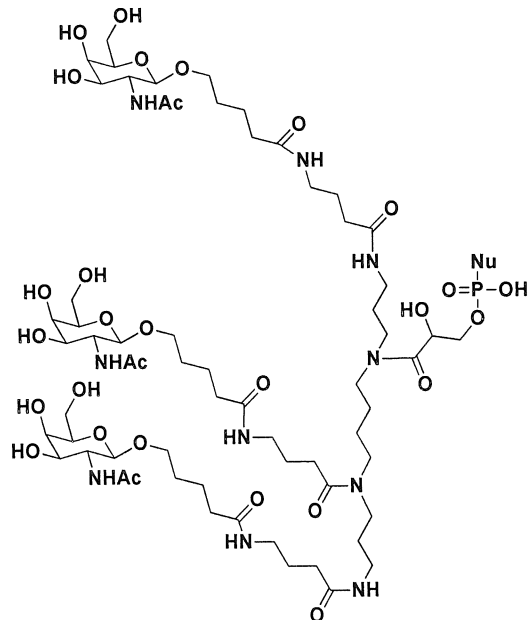
công thức (419)



công thức (420)



công thức (421)



công thức (422).

Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức (A59) có thể được liên kết với vị trí thích hợp bất kỳ trong trình tự siARN. Ví dụ, nguyên tử P trong công thức (A59)

có thể được liên kết với nucleotit bất kỳ trong mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức (A59) được liên kết với nucleotit bất kỳ trong mạch có nghĩa của siARN. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức (A59) có thể được liên kết với vùng tận cùng của mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của siARN. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức (A59) được liên kết với vùng tận cùng của mạch có nghĩa của siARN. Vùng tận cùng này được dùng để chỉ 4 nucleotit đầu tiên được tính từ một đầu của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức (A59) được liên kết với một trong hai đầu của mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của siARN. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức (A59) được liên kết với đầu 3' của mạch có nghĩa của siARN. Trong trường hợp mà nguyên tử P trong công thức (A59) được liên kết với vị trí trên đây của mạch có nghĩa của siARN, sau khi đi vào tế bào, thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308) có thể giải phóng mạch đối nghĩa riêng biệt của siARN trong quá trình tháo xoắn, nhờ đó phong bế quá trình dịch mã của mARN PCSK9 thành protein và ức chế sự biểu hiện của gen PCSK9.

Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức (A59) có thể được liên kết với vị trí thích hợp bất kỳ của nucleotit trong siARN, ví dụ, vị trí 5', vị trí 2', vị trí 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 siARN bằng cách tạo thành liên kết phosphodiester. Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức (A59) được liên kết với nguyên tử oxy được tạo thành bằng cách khử hydro 3'-hydroxy của nucleotit ở đầu 3' của mạch có nghĩa trong siARN (trong trường hợp này, nguyên tử P trong công thức (A59) cũng có thể được coi là nguyên tử P trong nhóm phosphat của siARN), hoặc nguyên tử P trong công thức (A59) được liên kết với nucleotit bằng cách thay thế nguyên tử hydro trong nhóm 2'-hydroxy của nucleotit của mạch có nghĩa trong siARN, hoặc nguyên tử P trong công thức (A59) được liên kết với nucleotit bằng cách thay thế nguyên tử hydro trong nhóm 5'-hydroxy của nucleotit ở đầu 5' của mạch có nghĩa trong siARN.

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có độ ổn định trong huyết tương tốt hơn đáng kể và tác dụng ngoài đích thấp, và có tính chọn lọc làm câm tương đối cao đối với mARN PCSK9, và còn thể hiện tác dụng ức chế trên lipit máu cao hơn. Theo một số phương án, siARN theo sáng chế có thể là một

trong số các siARN được thể hiện trong các bảng 1a-1g. Các thể tiếp hợp chứa các siARN này thể hiện hoạt tính làm câm đối với mARN PCSK9 cao hơn.

Bảng 1a Các trình tự của các siARN thứ nhất theo sáng chế

| siARN NO. | SEQ ID NO: | Hướng trình tự 5'-3' |
|---------------|------------|--|
| siPCSKa 1 | 9 | AAGCAAGCAGACAUUUAUC |
| | 10 | GAUAAAUGUCUGCUUGCUUGG |
| siPCSKa 2 | 11 | CCAAGCAAGCAGACAUUUAUC |
| | 12 | GAUAAAUGUCUGCUUGCUUGGGU |
| siPCSKa 1-M1 | 13 | AmAmGmCmAmAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 14 | GmAfUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmGmGm |
| siPCSKa 1-M2 | 15 | AmAmGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 16 | GmAfUmAmAmAfUmGfUfCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmGmGm |
| siPCSKa 1-M3 | 17 | AmAmGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 18 | GmAfUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmGmGm |
| siPCSKa 2-M1 | 19 | CmCmAmAmGmCmAmAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 20 | GmAfUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmGmGmGmUm |
| siPCSKa 2-M2 | 21 | CmCmAmAmGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 22 | GmAfUmAmAmAfUmGfUfCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmGmGmGmUm |
| siPCSKa 2-M3 | 23 | CmCmAmAmGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 24 | GmAfUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmGmGmGmUm |
| siPCSKa 1-M1S | 25 | AmsAmsGmCmAmAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 26 | GmsAfsUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmsGmsGm |
| siPCSKa 1-M2S | 27 | AmsAmsGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 28 | GmsAfsUmAmAmAfUmGfUfCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmsGmsGm |
| siPCSKa 1-M3S | 29 | AmsAmsGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 30 | GmsAfsUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmsGmsGm |
| siPCSKa 2-M1S | 31 | CmsCmsAmAmGmCmAmAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 32 | GmsAfsUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmsGmsGm |

| | | |
|--------------------|----|--|
| | | mGmGmsGmsUm |
| siPCSKa
2-M2S | 33 | CmsCmsAmAmGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAm
UmCm |
| | 34 | GmsAfsUmAmAmAfUmGfUfCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmG
mGmsGmsUm |
| siPCSKa
2-M3S | 35 | CmsCmsAmAmGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAm
UmCm |
| | 36 | GmsAfsUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmU
mGmGmsGmsUm |
| siPCSKa
1-M1P1 | 37 | AmAmGmCmAmAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 38 | P1GmAfUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmU
mGmGm |
| siPCSKa
1-M2P1 | 39 | AmAmGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 40 | P1GmAfUmAmAmAfUmGfUfCmUmGmCmUfUmGfCmUmUm
GmGm |
| siPCSKa
1-M3P1 | 41 | AmAmGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 42 | P1GmAfUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmU
mGmGm |
| siPCSKa
2-M1P1 | 43 | CmCmAmAmGmCmAmAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAm
UmCm |
| | 44 | P1GmAfUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmU
mGmGmGmUm |
| siPCSKa
2-M2P1 | 45 | CmCmAmAmGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmU
mCm |
| | 46 | P1GmAfUmAmAmAfUmGfUfCmUmGmCmUfUmGfCmUmUm
GmGmGmUm |
| siPCSKa
2-M3P1 | 47 | CmCmAmAmGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmU
mCm |
| | 48 | P1GmAfUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmU
mGmGmGmUm |
| siPCSKa
1-M1SP1 | 49 | AmsAmsGmCmAmAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmC
m |
| | 50 | P1GmsAfsUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUm
UmsGmsGm |
| siPCSKa
1-M2SP1 | 51 | AmsAmsGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 52 | P1GmsAfsUmAmAmAfUmGfUfCmUmGmCmUfUmGfCmUmU
msGmsGm |
| siPCSKa
1-M3SP1 | 53 | AmsAmsGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 54 | P1GmsAfsUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUm
UmsGmsGm |
| siPCSKa
2-M1SP1 | 55 | CmsCmsAmAmGmCmAmAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmA
mUmCm |
| | 56 | P1GmsAfsUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUm
UmGmGmsGmsUm |
| siPCSKa | 57 | CmsCmsAmAmGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAm |

| | | |
|--------------------|----|--|
| 2-M2SP1 | | UmCm |
| | 58 | P1GmsAfsUmAmAmAfUmGfUfCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmGmGmsGmsUm |
| siPCSKa
2-M3SP1 | 59 | CmsCmsAmAmGmCmAfAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm |
| | 60 | P1GmsAfsUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmGmGmsGmsUm |

Bảng 1b Các trình tự của các siARN thứ hai theo sáng chế

| siARN NO. | SEQ ID NO: | Hướng trình tự 5'-3' |
|---------------|------------|--|
| siPCSKb 1 | 69 | UUUGUAGCAUUUUUAUUA |
| | 70 | UUAAUAAAAAUGCUACAAAAC |
| siPCSKb 2 | 71 | GUUUUGUAGCAUUUUUAUUA |
| | 72 | UUAAUAAAAAUGCUACAAAACCC |
| siPCSKb 1-M1 | 73 | UmUmUmGmUmAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 74 | UmUfAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCm |
| siPCSKb 1-M2 | 75 | UmUmUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 76 | UmUfAmAmUmAfAmAfAfAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCm |
| siPCSKb 1-M3 | 77 | UmUmUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 78 | UmUfAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCm |
| siPCSKb 2-M1 | 79 | GmUmUmUmUmGmUmAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 80 | UmUfAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCmCmCm |
| siPCSKb 2-M2 | 81 | GmUmUmUmUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 82 | UmUfAmAmUmAfAmAfAfAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCmCmCm |
| siPCSKb 2-M3 | 83 | GmUmUmUmUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 84 | UmUfAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCmCmCm |
| siPCSKb 1-M1S | 85 | UmsUmsUmGmUmAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 86 | UmsUfsAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmsAmsCm |
| siPCSKb 1-M2S | 87 | UmsUmsUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 88 | UmsUfsAmAmUmAfAmAfAfAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmsAmsCm |
| siPCSKb | 89 | UmsUmsUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |

| | | |
|--------------------|-----|--|
| 1-M3S | | m |
| | 90 | UmsUfsAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmsAmsCm |
| siPCSKb
2-M1S | 91 | GmsUmsUmUmUmGmUmAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 92 | UmsUfsAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCmsCmsCm |
| siPCSKb
2-M2S | 93 | GmsUmsUmUmUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 94 | UmsUfsAmAmUmAfAmAfAfAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCmsCmsCm |
| siPCSKb
2-M3S | 95 | GmsUmsUmUmUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 96 | UmsUfsAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCmsCmsCm |
| siPCSKb
1-M1P1 | 97 | UmUmUmGmUmAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 98 | P1UmUfAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCm |
| siPCSKb
1-M2P1 | 99 | UmUmUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 100 | P1UmUfAmAmUmAfAmAfAfAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCm |
| siPCSKb
1-M3P1 | 101 | UmUmUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 102 | P1UmUfAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCm |
| siPCSKb
2-M1P1 | 103 | GmUmUmUmUmGmUmAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 104 | P1UmUfAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCmCmCm |
| siPCSKb
2-M2P1 | 105 | GmUmUmUmUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 106 | P1UmUfAmAmUmAfAmAfAfAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCmCmCm |
| siPCSKb
2-M3P1 | 107 | GmUmUmUmUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 108 | P1UmUfAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCmCmCm |
| siPCSKb
1-M1SP1 | 109 | UmsUmsUmGmUmAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 110 | P1UmsUfsAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmsAmsCm |
| siPCSKb
1-M2SP1 | 111 | UmsUmsUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 112 | P1UmsUfsAmAmUmAfAmAfAfAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmsAmsCm |
| siPCSKb | 113 | UmsUmsUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |

| | | |
|--------------------|-----|--|
| 1-M3SP1 | | m |
| | 114 | P1UmsUfsAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmsAmsCm |
| siPCSKb
2-M1SP1 | 115 | GmsUmsUmUmUmGmUmAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 116 | P1UmsUfsAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCmsCmsCm |
| siPCSKb
2-M2SP1 | 117 | GmsUmsUmUmUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 118 | P1UmsUfsAmAmUmAfAmAfAfAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCmsCmsCm |
| siPCSKb
2-M3SP1 | 119 | GmsUmsUmUmUmGmUfAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm |
| | 120 | P1UmsUfsAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAmCmsCmsCm |

Bảng 1c Các trình tự của các siARN thứ ba theo sáng chế

| siARN NO. | SEQ ID NO: | Hướng trình tự 5'-3' |
|-----------------|------------|--|
| siPCSKc
1 | 129 | GCCUGGAGUUUAUUCGGAA |
| | 130 | UUCCGAAUAAACUCCAGGCCU |
| siPCSKc
2 | 131 | AGGCCUGGAGUUUAUUCGGAA |
| | 132 | UUCCGAAUAAACUCCAGGCCUAU |
| siPCSKc
1-M1 | 133 | GmCmCmUmGmGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAmAmUmUfCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUm |
| | 134 | UmUfCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUm |
| siPCSKc
1-M2 | 135 | GmCmCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAmAmUmUfCmCmGmAfAmUfAfAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUm |
| | 136 | UmUfCmCmGmAfAmUfAfAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUm |
| siPCSKc
1-M3 | 137 | GmCmCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAmAmUmUfCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUm |
| | 138 | UmUfCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUm |
| siPCSKc
2-M1 | 139 | AmGmGmCmCmUmGmGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAmAmUmUfCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmAmUm |
| | 140 | UmUfCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmAmUm |
| siPCSKc
2-M2 | 141 | AmGmGmCmCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAfAmUmUfCmCmGmAfAmUfAfAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmAmUm |
| | 142 | UmUfCmCmGmAfAmUfAfAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmAmUm |
| siPCSKc
2-M3 | 143 | AmGmGmCmCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAfAmUmUfCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmAmUm |
| | 144 | UmUfCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmAmUm |
| siPCSKc | 145 | GmsCmsCmUmGmGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAfAmUmUfCmCmGmAfAmUfAfAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmAmUm |

| | | |
|-------------------|-----|--|
| 1-M1S | | m |
| | 146 | UmsUfsCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmsCmsUm |
| siPCSKc
1-M2S | 147 | GmsCmsCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 148 | UmsUfsCmCmGmAfAmUfAfAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmsCmsUm |
| siPCSKc
1-M3S | 149 | GmsCmsCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 150 | UmsUfsCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmsCmsUm |
| siPCSKc
2-M1S | 151 | AmsGmsGmCmCmUmGmGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 152 | UmsUfsCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmsAmsUm |
| siPCSKc
2-M2S | 153 | AmsGmsGmCmCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 154 | UmsUfsCmCmGmAfAmUfAfAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmsAmsUm |
| siPCSKc
2-M3S | 155 | AmsGmsGmCmCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 156 | UmsUfsCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmsAmsUm |
| siPCSKc
1-M1P1 | 157 | GmCmCmUmGmGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 158 | P1UmUfCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUm |
| siPCSKc
1-M2P1 | 159 | GmCmCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 160 | P1UmUfCmCmGmAfAmUfAfAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUm |
| siPCSKc
1-M3P1 | 161 | GmCmCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 162 | P1UmUfCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUm |
| siPCSKc
2-M1P1 | 163 | AmGmGmCmCmUmGmGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 164 | P1UmUfCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmAmUm |
| siPCSKc
2-M2P1 | 165 | AmGmGmCmCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 166 | P1UmUfCmCmGmAfAmUfAfAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmAmUm |
| siPCSKc
2-M3P1 | 167 | AmGmGmCmCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 168 | P1UmUfCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmAmUm |
| siPCSKc | 169 | GmsCmsCmUmGmGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |

| | | |
|--------------------|-----|--|
| 1-M1SP1 | | m |
| | 170 | P1UmsUfsCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmsCmsUm |
| siPCSKc
1-M2SP1 | 171 | GmsCmsCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 172 | P1UmsUfsCmCmGmAfAmUfAfAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmsCmsUm |
| siPCSKc
1-M3SP1 | 173 | GmsCmsCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 174 | P1UmsUfsCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmsCmsUm |
| siPCSKc
2-M1SP1 | 175 | AmsGmsGmCmCmUmGmGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 176 | P1UmsUfsCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmsAmsUm |
| siPCSKc
2-M2SP1 | 177 | AmsGmsGmCmCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 178 | P1UmsUfsCmCmGmAfAmUfAfAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmsAmsUm |
| siPCSKc
2-M3SP1 | 179 | AmsGmsGmCmCmUmGfGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAma |
| | 180 | P1UmsUfsCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmCmUmsAmsUm |

Bảng 1d Các trình tự của các siARN thứ tư theo sáng chế

| siARN NO. | SEQ ID NO: | Hướng trình tự 5'-3' |
|--------------|------------|--|
| siPCSKd 1 | 189 | CUGUUUUGCUUUUGUAACU |
| | 190 | AGUUACAAAAGCAAAACAGGU |
| siPCSKd 2 | 191 | ACCUGUUUUGCUUUUGUAACU |
| | 192 | AGUUACAAAAGCAAAACAGGUCU |
| siPCSKd 1-M1 | 193 | CmUmGmUmUmUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 194 | AmGfUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUm |
| siPCSKd 1-M2 | 195 | CmUmGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 196 | AmGfUmUmAmCfAmAfAfAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUm |
| siPCSKd 1-M3 | 197 | CmUmGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 198 | AmGfUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUm |
| siPCSKd 2-M1 | 199 | AmCmCmUmGmUmUmUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 200 | AmGfUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUmCmUm |
| siPCSKd | 201 | AmCmCmUmGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |

| | | |
|-------------------|-----|--|
| 2-M2 | | mUm |
| | 202 | AmGfUmUmAmCfAmAfAfAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUmCmUm |
| siPCSKd
2-M3 | 203 | AmCmCmUmGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 204 | AmGfUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUmCmUm |
| siPCSKd
1-M1S | 205 | CmsUmsGmUmUmUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 206 | AmsGfsUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmsGmsUm |
| siPCSKd
1-M2S | 207 | CmsUmsGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 208 | AmsGfsUmUmAmCfAmAfAfAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmsGmsUm |
| siPCSKd
1-M3S | 209 | CmsUmsGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 210 | AmsGfsUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmsGmsUm |
| siPCSKd
2-M1S | 211 | AmsCmsCmUmGmUmUmUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 212 | AmsGfsUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUmsCmsUm |
| siPCSKd
2-M2S | 213 | AmsCmsCmUmGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 214 | AmsGfsUmUmAmCfAmAfAfAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUmsCmsUm |
| siPCSKd
2-M3S | 215 | AmsCmsCmUmGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 216 | AmsGfsUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUmsCmsUm |
| siPCSKd
1-M1P1 | 217 | CmUmGmUmUmUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 218 | P1AmGfUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUm |
| siPCSKd
1-M2P1 | 219 | CmUmGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 220 | P1AmGfUmUmAmCfAmAfAfAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUm |
| siPCSKd
1-M3P1 | 221 | CmUmGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 222 | P1AmGfUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUm |
| siPCSKd
2-M1P1 | 223 | AmCmCmUmGmUmUmUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 224 | P1AmGfUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUmCmUm |
| siPCSKd | 225 | AmCmCmUmGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |

| | | |
|--------------------|-----|--|
| 2-M2P1 | | mUm |
| | 226 | P1AmGfUmUmAmCfAmAfAfAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUmCmUm |
| siPCSKd
2-M3P1 | 227 | AmCmCmUmGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 228 | P1AmGfUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUmCmUm |
| siPCSKd
1-M1SP1 | 229 | CmsUmsGmUmUmUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 230 | P1AmsGfsUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmsGmsUm |
| siPCSKd
1-M2SP1 | 231 | CmsUmsGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 232 | P1AmsGfsUmUmAmCfAmAfAfAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmsGmsUm |
| siPCSKd
1-M3SP1 | 233 | CmsUmsGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 234 | P1AmsGfsUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmsGmsUm |
| siPCSKd
2-M1SP1 | 235 | AmsCmsCmUmGmUmUmUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 236 | P1AmsGfsUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUmsCmsUm |
| siPCSKd
2-M2SP1 | 237 | AmsCmsCmUmGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 238 | P1AmsGfsUmUmAmCfAmAfAfAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUmsCmsUm |
| siPCSKd
2-M3SP1 | 239 | AmsCmsCmUmGmUmUfUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm |
| | 240 | P1AmsGfsUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmGmUmsCmsUm |

Bảng 1e Các trình tự của các siARN thứ năm theo sáng chế

| siARN NO. | SEQ ID NO: | Hướng trình tự 5'-3' |
|--------------|------------|--|
| siPCSKe 1 | 249 | GGUUUUGUAGCAUUUUUAU |
| | 250 | AUAAAAAUGCUACAAAACCCA |
| siPCSKe 2 | 251 | UGGGUUUUGUAGCAUUUUUAU |
| | 252 | AUAAAAAUGCUACAAAACCCAGA |
| siPCSKe 1-M1 | 253 | GmGmUmUmUmUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmUmAmUm |
| | 254 | AmUfAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCmCmCmAm |
| siPCSKe 1-M2 | 255 | GmGmUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmUmAmUm |
| | 256 | AmUfAmAmAmAfAmUfGfCmUmAmCmAfAmAfAmCmCmCmAm |

| | | |
|-------------------|-----|--|
| siPCSKe
1-M3 | 257 | GmGmUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmAmUm |
| | 258 | AmUfAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCmCmC
mAm |
| siPCSKe
2-M1 | 259 | UmGmGmGmUmUmUmUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmUm |
| | 260 | AmUfAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCmCmC
mAmGmAm |
| siPCSKe
2-M2 | 261 | UmGmGmGmUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmUm |
| | 262 | AmUfAmAmAmAfAmUfGfCmUmAmCmAfAmAfAmCmCmC
AmGmAm |
| siPCSKe
2-M3 | 263 | UmGmGmGmUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmUm |
| | 264 | AmUfAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCmCmC
mAmGmAm |
| siPCSKe
1-M1S | 265 | GmsGmsUmUmUmUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmAmU
m |
| | 266 | AmsUfsAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCmCm
sCmsAm |
| siPCSKe
1-M2S | 267 | GmsGmsUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmAmU
m |
| | 268 | AmsUfsAmAmAmAfAmUfGfCmUmAmCmAfAmAfAmCmCms
CmsAm |
| siPCSKe
1-M3S | 269 | GmsGmsUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmAmU
m |
| | 270 | AmsUfsAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCmCm
sCmsAm |
| siPCSKe
2-M1S | 271 | UmsGmsGmGmUmUmUmUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmU
mAmUm |
| | 272 | AmsUfsAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCmCm
CmAmsGmsAm |
| siPCSKe
2-M2S | 273 | UmsGmsGmGmUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmU
mAmUm |
| | 274 | AmsUfsAmAmAmAfAmUfGfCmUmAmCmAfAmAfAmCmCmC
mAmsGmsAm |
| siPCSKe
2-M3S | 275 | UmsGmsGmGmUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmU
mAmUm |
| | 276 | AmsUfsAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCmCm
CmAmsGmsAm |
| siPCSKe
1-M1P1 | 277 | GmGmUmUmUmUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmAmUm |
| | 278 | P1AmUfAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCmC
mCmAm |
| siPCSKe
1-M2P1 | 279 | GmGmUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmAmUm |
| | 280 | P1AmUfAmAmAmAfAmUfGfCmUmAmCmAfAmAfAmCmCm
CmAm |

| | | |
|--------------------|-----|--|
| siPCSKe
1-M3P1 | 281 | GmGmUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmUmAmUm |
| | 282 | P1AmUfAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCmC
mCmAm |
| siPCSKe
2-M1P1 | 283 | UmGmGmGmUmUmUmUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmUm
AmUm |
| | 284 | P1AmUfAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCmC
mCmAmGmAm |
| siPCSKe
2-M2P1 | 285 | UmGmGmGmUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmUm
AmUm |
| | 286 | P1AmUfAmAmAmAfAmUfGfCmUmAmCmAfAmAfAmCmCm
CmAmGmAm |
| siPCSKe
2-M3P1 | 287 | UmGmGmGmUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmUm
AmUm |
| | 288 | P1AmUfAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCmC
mCmAmGmAm |
| siPCSKe
1-M1SP1 | 289 | GmsGmsUmUmUmUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmUmAmU
m |
| | 290 | P1AmsUfsAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCm
CmsCmsAm |
| siPCSKe
1-M2SP1 | 291 | GmsGmsUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmUmAmU
m |
| | 292 | P1AmsUfsAmAmAmAfAmUfGfCmUmAmCmAfAmAfAmCmC
msCmsAm |
| siPCSKe
1-M3SP1 | 293 | GmsGmsUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmUmAmU
m |
| | 294 | P1AmsUfsAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCm
CmsCmsAm |
| siPCSKe
2-M1SP1 | 295 | UmsGmsGmGmUmUmUmUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmU
mAmUm |
| | 296 | P1AmsUfsAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCm
CmCmAmsGmsAm |
| siPCSKe
2-M2SP1 | 297 | UmsGmsGmGmUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmU
mAmUm |
| | 298 | P1AmsUfsAmAmAmAfAmUfGfCmUmAmCmAfAmAfAmCmC
mCmAmsGmsAm |
| siPCSKe
2-M3SP1 | 299 | UmsGmsGmGmUmUmUfUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmU
mAmUm |
| | 300 | P1AmsUfsAmAmAmAfAmUmGmCmUmAmCmAfAmAfAmCm
CmCmAmsGmsAm |

Bảng 1f Các trình tự của siARN thứ sáu theo sáng chế

| siARN
NO. | SEQ
ID
NO: | Hướng trình tự 5'-3' |
|--------------|------------------|------------------------|
| siPCSKf
1 | 309 | GUGACUUUUUAAAAUAAAA |
| | 310 | UUUUUUUUUUAAAAAGUCACCA |

| | | |
|------------------|-----|--|
| siPCSKf
2 | 311 | UGGUGACUUUUUAAAAUAAAA |
| | 312 | UUUUUAUUUUAAAAAGUCACCAUA |
| siPCSKf
1-M1 | 313 | GmUmGmAmCmUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmAmAmA
m |
| | 314 | UmUfUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmAmC
mCmAm |
| siPCSKf
1-M2 | 315 | GmUmGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmAmAmA
m |
| | 316 | UmUfUmUmAmUfUmUfUfAmAmAmAmAfGmUfCmAmCmC
mAm |
| siPCSKf
1-M3 | 317 | GmUmGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmAmAmA
m |
| | 318 | UmUfUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmAmC
mCmAm |
| siPCSKf
2-M1 | 319 | UmGmGmUmGmAmCmUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmA
mAmAm |
| | 320 | UmUfUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmAmC
mCmAmUmAm |
| siPCSKf
2-M2 | 321 | UmGmGmUmGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmA
mAmAm |
| | 322 | UmUfUmUmAmUfUmUfUfAmAmAmAmAfGmUfCmAmCmC
mAmUmAm |
| siPCSKf
2-M3 | 323 | UmGmGmUmGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmA
mAmAm |
| | 324 | UmUfUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmAmC
mCmAmUmAm |
| siPCSKf
1-M1S | 325 | GmsUmsGmAmCmUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmAmAm
Am |
| | 326 | UmsUfsUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmAm
CmsCmsAm |
| siPCSKf
1-M2S | 327 | GmsUmsGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmAmAm
Am |
| | 328 | UmsUfsUmUmAmUfUmUfUfAmAmAmAmAfGmUfCmAmCm
sCmsAm |
| siPCSKf
1-M3S | 329 | GmsUmsGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmAmAm
Am |
| | 330 | UmsUfsUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmAm
CmsCmsAm |
| siPCSKf
2-M1S | 331 | UmsGmsGmUmGmAmCmUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAm
AmAmAm |
| | 332 | UmsUfsUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmAm
CmCmAmsUmsAm |
| siPCSKf
2-M2S | 333 | UmsGmsGmUmGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAm
AmAmAm |
| | 334 | UmsUfsUmUmAmUfUmUfUfAmAmAmAmAfGmUfCmAmCm |

| | | |
|--------------------|-----|--|
| | | CmAmsUmsAm |
| siPCSKf
2-M3S | 335 | UmsGmsGmUmGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAm
AmAmAm |
| | 336 | UmsUfsUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmAm
CmCmAmsUmsAm |
| siPCSKf
1-M1P1 | 337 | GmUmGmAmCmUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmAmAmA
m |
| | 338 | P1UmUfUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmAm
CmCmAm |
| siPCSKf
1-M2P1 | 339 | GmUmGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmAmAmA
m |
| | 340 | P1UmUfUmUmAmUfUmUfUfAmAmAmAmAfGmUfCmAmC
mCmAm |
| siPCSKf
1-M3P1 | 341 | GmUmGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmAmAmA
m |
| | 342 | P1UmUfUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmAm
CmCmAm |
| siPCSKf
2-M1P1 | 343 | UmGmGmUmGmAmCmUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmA
mAmAm |
| | 344 | P1UmUfUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmAm
CmCmAmUmAm |
| siPCSKf
2-M2P1 | 345 | UmGmGmUmGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmA
mAmAm |
| | 346 | P1UmUfUmUmAmUfUmUfUfAmAmAmAmAfGmUfCmAmC
mCmAmUmAm |
| siPCSKf
2-M3P1 | 347 | UmGmGmUmGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmA
mAmAm |
| | 348 | P1UmUfUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmAm
CmCmAmUmAm |
| siPCSKf
1-M1SP1 | 349 | GmsUmsGmAmCmUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmAmAm
Am |
| | 350 | P1UmsUfsUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmA
mCmsCmsAm |
| siPCSKf
1-M2SP1 | 351 | GmsUmsGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmAmAm
Am |
| | 352 | P1UmsUfsUmUmAmUfUmUfUfAmAmAmAmAfGmUfCmAm
CmsCmsAm |
| siPCSKf
1-M3SP1 | 353 | GmsUmsGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAmAmAm
Am |
| | 354 | P1UmsUfsUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmA
mCmsCmsAm |
| siPCSKf
2-M1SP1 | 355 | UmsGmsGmUmGmAmCmUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAm
AmAmAm |
| | 356 | P1UmsUfsUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmA
mCmCmAmsUmsAm |

| | | |
|--------------------|-----|--|
| siPCSKf
2-M2SP1 | 357 | UmsGmsGmUmGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAm
AmAmAm |
| | 358 | P1UmsUfsUmUmAmUfUmUfUfAmAmAmAmAfGmUfCmAm
CmCmAmsUmsAm |
| siPCSKf
2-M3SP1 | 359 | UmsGmsGmUmGmAmCfUmUfUfUfUmAmAmAmAmUmAm
AmAmAm |
| | 360 | P1UmsUfsUmUmAmUfUmUmUmAmAmAmAmAfGmUfCmA
mCmCmAmsUmsAm |

Bảng 1g Các trình tự của siARN thứ bảy theo sáng chế

| siARN
NO. | SEQ
ID
NO: | Hướng trình tự 5'-3' |
|--------------------|------------------|--|
| siPCSKg
3 | 407 | AGACCUGUdTUUGCUUUUGU |
| | 408 | ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG |
| siPCSKg
4 | 409 | CUAGACCUGUdTUUGCUUUUGU |
| | 410 | ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA |
| siPCSKg
3-M4 | 411 | AmGmAmCmCfUmGfUmdTUmUmGmCmUmUmUmUmGmU
m |
| | 412 | AmCfAmAfAfAfGmCfAmAfAmAmCmAfGmGfUmCfUmAmG
m |
| siPCSKg
4-M5 | 413 | CmUmAmGmAmCmCfUmGfUmdTUmUmGmCmUmUmUmU
mGmUm |
| | 414 | AmCfAmAfAfAfGmCfAmAfAmAmCmAfGmGfUmCfUmAmG
mAmAm |
| siPCSKg
3-M4S | 415 | AmsGmsAmCmCfUmGfUmdTUmUmGmCmUmUmUmUmGm
Um |
| | 416 | AmsCfsAmAfAfAfGmCfAmAfAmAmCmAfGmGfUmCfUmsA
msGm |
| siPCSKg
4-M5S | 417 | CmsUmsAmGmAmCmCfUmGfUmdTUmUmGmCmUmUmUm
UmGmUm |
| | 418 | AmsCfsAmAfAfAfGmCfAmAfAmAmCmAfGmGfUmCfUmAm
GmsAmsAm |
| siPCSKg
3-M4P1 | 419 | AmGmAmCmCfUmGfUmdTUmUmGmCmUmUmUmUmGmU
m |
| | 420 | P1AmCfAmAfAfAfGmCfAmAfAmAmCmAfGmGfUmCfUmA
mGm |
| siPCSKg
4-M5P1 | 421 | CmUmAmGmAmCmCfUmGfUmdTUmUmGmCmUmUmUmU
mGmUm |
| | 422 | P1AmCfAmAfAfAfGmCfAmAfAmAmCmAfGmGfUmCfUmA
mGmAmAm |
| siPCSKg
3-M4SP1 | 423 | AmsGmsAmCmCfUmGfUmdTUmUmGmCmUmUmUmUmGm
Um |
| | 424 | P1AmsCfsAmAfAfAfGmCfAmAfAmAmCmAfGmGfUmCfUms
AmsGm |
| siPCSKg | 425 | CmsUmsAmGmAmCmCfUmGfUmdTUmUmGmCmUmUmUm |

| | | |
|---------|-----|--|
| 4-M5SP1 | | UmGmUm |
| | 426 | P1AmsCfsAmAfAfAfGmCfAmAfAmAmCmAfGmGfUmCfUm
AmGmsAmsAm |

Trong siARN hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế, mỗi cặp nucleotit liền kề được liên kết thông qua liên kết phosphodiester hoặc liên kết phosphorothioate diester. Nguyên tử lưu huỳnh hoặc oxy không làm cầu nối trong liên kết phosphodiester hoặc liên kết phosphorothioate diester mang điện tích âm, và có thể có mặt ở dạng hydroxy hoặc sulfhydryl. Hơn nữa, nguyên tử hydro trong hydroxy hoặc sulfhydryl có thể được thế một phần hoặc hoàn toàn bằng cation. Cation có thể là cation bất kỳ, như cation kim loại, cation amoni NH_4^+ hoặc cation amoni hữu cơ. Để làm tăng độ ổn định, theo một phương án, cation là một hoặc nhiều cation được chọn từ cation kim loại kiềm, cation amoni được tạo thành bởi amin bậc ba và cation amin bậc bốn. Ion kim loại kiềm có thể là K^+ và/hoặc Na^+ , và cation được tạo thành bởi amin bậc ba có thể là cation amoni được tạo thành bởi triethylamin và/hoặc cation amoni được tạo thành bởi N,N-diisopropyletylamin. Do đó, siARN và thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có thể ít nhất một phần có mặt ở dạng muối. Theo một phương án, nguyên tử lưu huỳnh hoặc oxy không làm cầu nối trong liên kết phosphodiester hoặc liên kết phosphorothioate diester ít nhất một phần liên kết với ion natri, và do đó siARN và thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có mặt hoặc có mặt một phần ở dạng muối natri.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rõ rằng nhóm nucleotit đã cải biến có thể được đưa vào siARN theo sáng chế nhờ monome nucleosit với cải biến tương ứng. Các phương pháp sản xuất monome nucleosit có cải biến tương ứng và phương pháp đưa nucleotit đã cải biến vào siARN cũng đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Toàn bộ các monome nucleosit đã cải biến có thể sẵn có trên thị trường hoặc được sản xuất bằng các phương pháp đã biết.

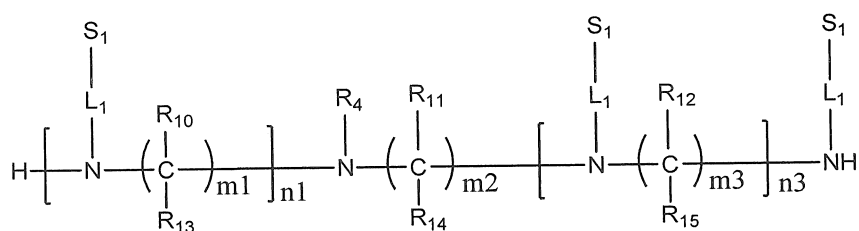
Sản xuất thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308)

Thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308) có thể được sản xuất bằng các con đường tổng hợp thích hợp bất kỳ.

Theo một số phương án, thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308) có thể được sản xuất bằng phương pháp sau, bao gồm: liên kết liên tiếp các monome nucleosit theo hướng 3' đến 5' theo loại và trình tự nucleotit trong mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN tương ứng, trong điều kiện tổng hợp ở pha rắn sử dụng

phosphoramidit, trong đó bước liên kết mỗi monome nucleosit bao gồm phản ứng bốn bước gồm khử bảo vệ, liên kết, tạo mũ và oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa; phân lập mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN, và gắn mỗi; trong đó siARN là siARN nêu trên theo sáng chế.

Ngoài ra, phương pháp này còn bao gồm: cho hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) tiếp xúc với monome nucleosit hoặc trình tự nucleotit gắn kết với giá thể pha rắn trong điều kiện phản ứng liên kết và khi có mặt chất liên kết, nhờ đó liên kết hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) với trình tự nucleotit thông qua phản ứng liên kết. Sau đây, hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) cũng được dùng để chỉ là phân tử tiếp hợp.



công thức (321)

trong đó,

R_4 là nhóm có khả năng liên kết với siARN được ký hiệu là Nu trong hợp chất như được thể hiện bởi công thức (308). Theo một số phương án, R_4 là nhóm có khả năng liên kết với siARN được ký hiệu là Nu thông qua liên kết cộng hóa trị. Theo một số phương án, R_4 là nhóm chứa nhóm chức mà có thể được tiếp hợp với siARN được ký hiệu là Nu thông qua liên kết phosphodiester nhờ phản ứng;

mỗi S_1 độc lập là nhóm được tạo thành bằng cách thay thế toàn bộ các hydroxyl có hoạt tính trong M_1 bằng nhóm YCOO- , trong đó mỗi Y độc lập là một nhóm được chọn từ nhóm bao gồm methyl, triflometyl, diflometyl, monoflometyl, triclometyl, diclometyl, monoclometyl, etyl, n-propyl, isopropyl, phenyl, halophenyl, và alkylphenyl; theo một số phương án, Y là methyl.

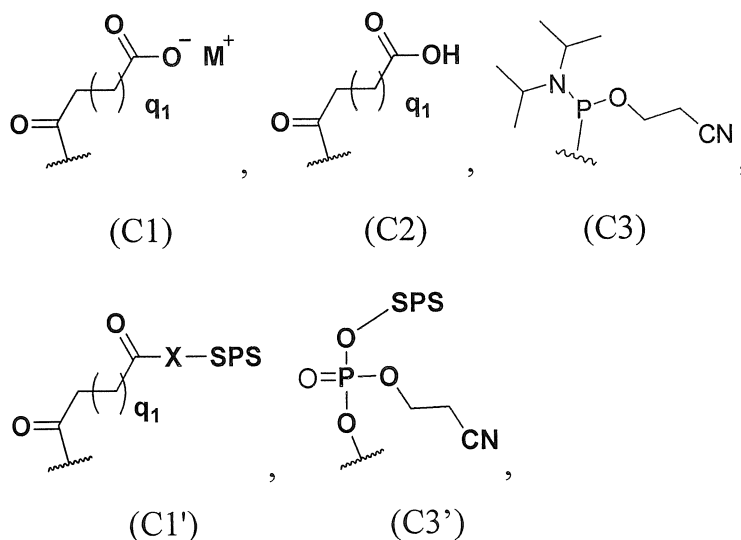
Các định nghĩa và lựa chọn $n1$, $n3$, $m1$, $m2$, $m3$, R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{14} , R_{15} , L_1 , và M_1 lần lượt được mô tả trên đây.

R_4 được chọn để đạt được sự liên kết với nguyên tử N trên khung có nitơ và tạo ra vị trí phản ứng thích hợp để tổng hợp thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công

thức (308). Theo một số phương án, R_4 bao gồm nhóm liên kết R_2 hoặc nhóm liên kết R_2 được bảo vệ, và nhóm chức mà có thể phản ứng với siARN để tạo thành cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (A59).

Theo một số phương án, R_4 bao gồm nhóm chức thứ nhất mà có thể phản ứng với nhóm trên siARN được ký hiệu bởi Nu hoặc monome nucleosit để tạo thành este phosphit, và nhóm chức thứ hai mà có thể phản ứng với nhóm hydroxy hoặc nhóm amino để tạo thành liên kết cộng hóa trị, hoặc bao gồm giá thể pha rắn được liên kết bằng liên kết cộng hóa trị. Theo một số phương án, nhóm chức thứ nhất là phosphoramidit, hydroxy hoặc hydroxy 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 thể pha rắn được liên kết với phần còn lại của phân tử thông qua liên kết cộng hóa trị mà được tạo thành nhờ nhóm hydroxy hoặc nhóm amino. Theo một số phương án, giá thể pha rắn được liên kết thông qua liên kết phosphoeste, liên kết este carboxyl hoặc liên kết amit. Theo một số phương án, giá thể pha rắn là nhựa.

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



trong đó q_1 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, X là O hoặc NH, M^+ là cation, R_k là nhóm bảo vệ hydroxy, SPS là giá thể pha rắn, và $\sim$ là vị trí mà nhóm được gắn kết cộng hóa trị.

Theo một số phương án, nhóm chức thứ nhất bao gồm nhóm phosphoramidit, như nhóm được thể hiện bởi công thức (C3). Nhóm phosphoramidit có thể tạo thành este phosphit với hydroxy ở vị trí bất kỳ trên nucleotit (như 2'-hydroxy hoặc 3'-hydroxy) bằng phản ứng liên kết, và este phosphit có thể tạo thành liên kết phosphodiester hoặc liên kết este phosphorothioat như được thể hiện bởi công thức (A59) thông qua phản ứng oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa, để tiếp hợp phân tử tiếp hợp với siARN. Theo sáng chế, ngay cả khi nhóm chức thứ hai không tồn tại, thì hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) có thể vẫn tiếp hợp với nucleotit, trong khi không làm ảnh hưởng đến việc tạo ra thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308). Trong các trường hợp này, sau khi tạo ra mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của siARN bằng phương pháp như tổng hợp ở pha rắn sử dụng phosphoramidit, hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) được phản ứng với hydroxy trên nucleotit ở đầu tận cùng của trình tự nucleotit, và liên kết phosphodiester hoặc liên kết phosphorothioat được tạo thành trong quá trình oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa sau đó, nhờ đó tiếp hợp hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) với siARN.

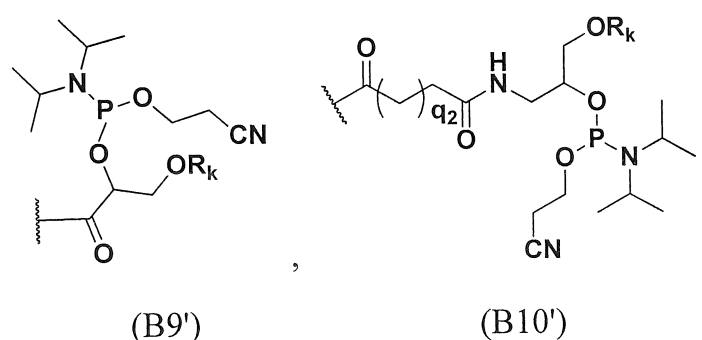
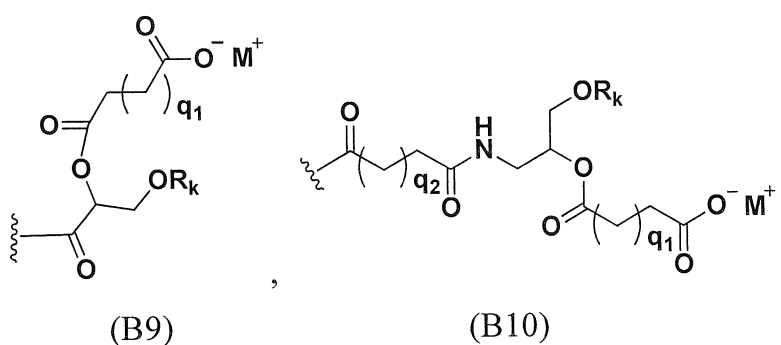
Theo một số phương án, nhóm chức thứ nhất bao gồm hydroxy được bảo vệ. Theo một số phương án, nhóm chức thứ hai bao gồm nhóm mà có thể phản ứng với giá thể pha rắn để tạo ra phân tử tiếp hợp chứa giá thể pha rắn. Theo một số phương án, nhóm chức thứ hai bao gồm carboxyl, muối carboxylat hoặc phosphoramidit, như nhóm chức như được thể hiện bởi công thức (C1), (C2) hoặc (C3). Nếu nhóm chức thứ hai bao gồm carboxyl hoặc muối carboxylat, thì hợp chất có công thức (321) có thể phản ứng với hydroxy hoặc nhóm amino trên giá thể pha rắn (như nhựa) thông qua phản ứng este hóa hoặc amit hóa, để tạo thành phân tử tiếp hợp chứa giá thể pha rắn được liên kết thông qua liên kết este carboxylat. Nếu nhóm chức thứ hai bao gồm nhóm chức phosphoramidit, thì hợp chất có công thức (321) có thể liên kết với nhóm hydroxy trên giá thể pha rắn phổ biến (như nhựa), và tạo thành phân tử tiếp hợp chứa giá thể pha rắn được liên kết thông qua liên kết phosphodiester bằng phản ứng oxy hóa. Tiếp theo, bắt đầu từ sản phẩm trên đây được liên kết với giá thể pha rắn, các monome nucleosit được liên kết liên tiếp thông qua phương pháp tổng hợp trên pha rắn sử dụng phosphoramidit, để thu được mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của siARN được liên kết với nhóm tiếp hợp. Trong quy trình tổng hợp ở pha rắn sử dụng phosphoramidit, nhóm chức thứ nhất được khử bảo vệ, và

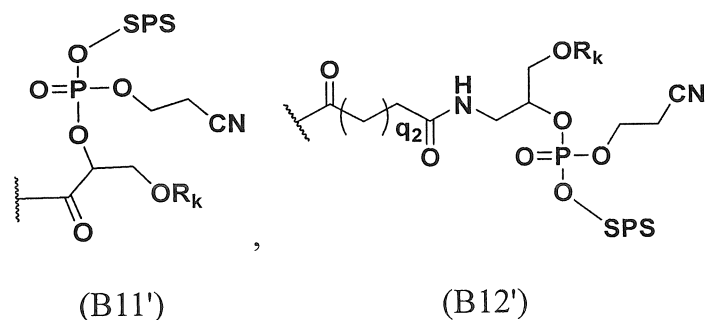
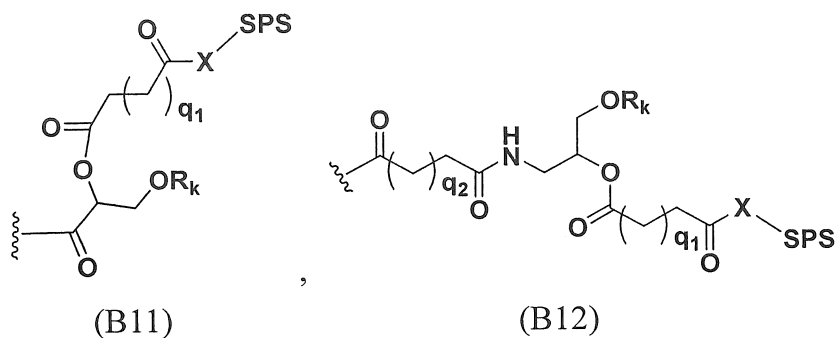
sau đó được liên kết với nhóm phosphoramidit trên monome nucleosit trong điều kiện phản ứng liên kết.

Theo một số phương án, nhóm chức thứ nhất bao gồm hydroxy hoặc nhóm hydroxy được bảo vệ; nhóm chức thứ hai bao gồm giá thể pha rắn được liên kết thông qua liên kết este carboxylat, liên kết amit, hoặc liên kết phosphoeste, như được thể hiện bởi công thức (C1') hoặc (C3'). Trong trường hợp này, bắt đầu từ hợp chất có công thức (321) thay cho giá thể pha rắn, các monome nucleosit được liên kết tuần tự thông qua phương pháp tổng hợp ở pha rắn sử dụng phosphoramidit, để thu được mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN được liên kết với nhóm tiếp hợp.

Theo một số phương án, carboxylat có thể được thể hiện dưới dạng COO^-M^+ , trong đó M^+ là cation như cation được chọn từ cation kim loại, cation amoni NH_4^+ và cation amoni hữu cơ. Theo một phương án, cation kim loại có thể là cation kim loại kiềm, như K^+ hoặc Na^+ . Để làm tăng độ hòa tan và tạo điều kiện thuận lợi cho phản ứng, theo một số phương án, cation amoni hữu cơ là cation amoni được tạo thành bởi amin bậc ba hoặc cation amoni bậc bốn, như cation amoni được tạo thành bởi triethylamin hoặc cation amoni được tạo thành bởi N,N-diisopropyletylamin. Theo một số phương án, carboxylat là triethylamin carboxylat hoặc N,N-diisopropyletylamin carboxylat.

Theo một số phương án, R_4 bao gồm cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (B9), (B10), (B9'), (B10'), (B11), (B12), (B11'), hoặc B(12'):





trong đó q_1 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 4, q_2 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10, X là O hoặc NH, M^+ là cation, R_k là nhóm bảo vệ hydroxy, SPS là giá thể pha rắn, và $\sim$ là vị trí nơi mà nhóm được liên kết cộng hóa trị. Theo một số phương án, q_1 là 1 hoặc 2. Theo một số phương án, q_2 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 5. Theo một số phương án, R_4 bao gồm cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (B9) hoặc (B10). Theo một số phương án, R_4 bao gồm cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (B11) hoặc (B12).

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

Định nghĩa L_1 là như được mô tả trên đây.

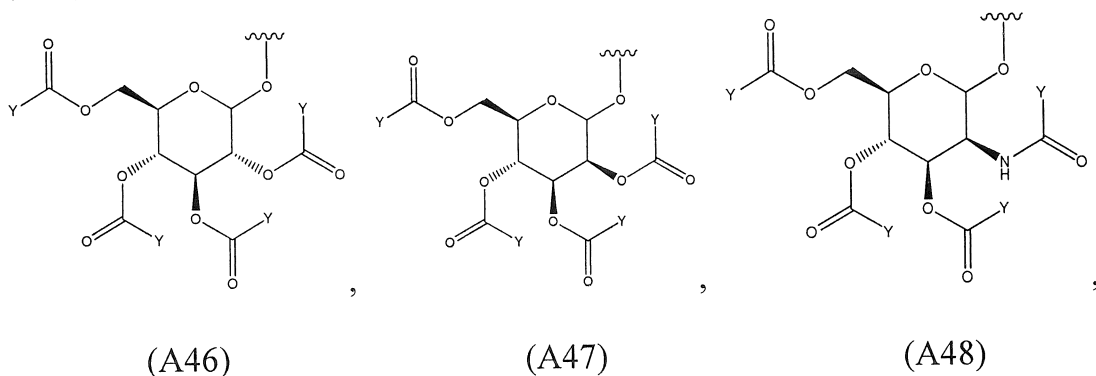
Theo một số phương án, L_1 được sử dụng để liên kết nhóm hướng đích M_1 với nguyên tử N trên khung có nitơ, nhờ đó đem lại chức năng hướng vào gan cho thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308). Theo một số phương án, L_1 bao gồm công thức bất kỳ trong số các công thức (A1)-(A26), và tổ hợp bất kỳ của chúng.

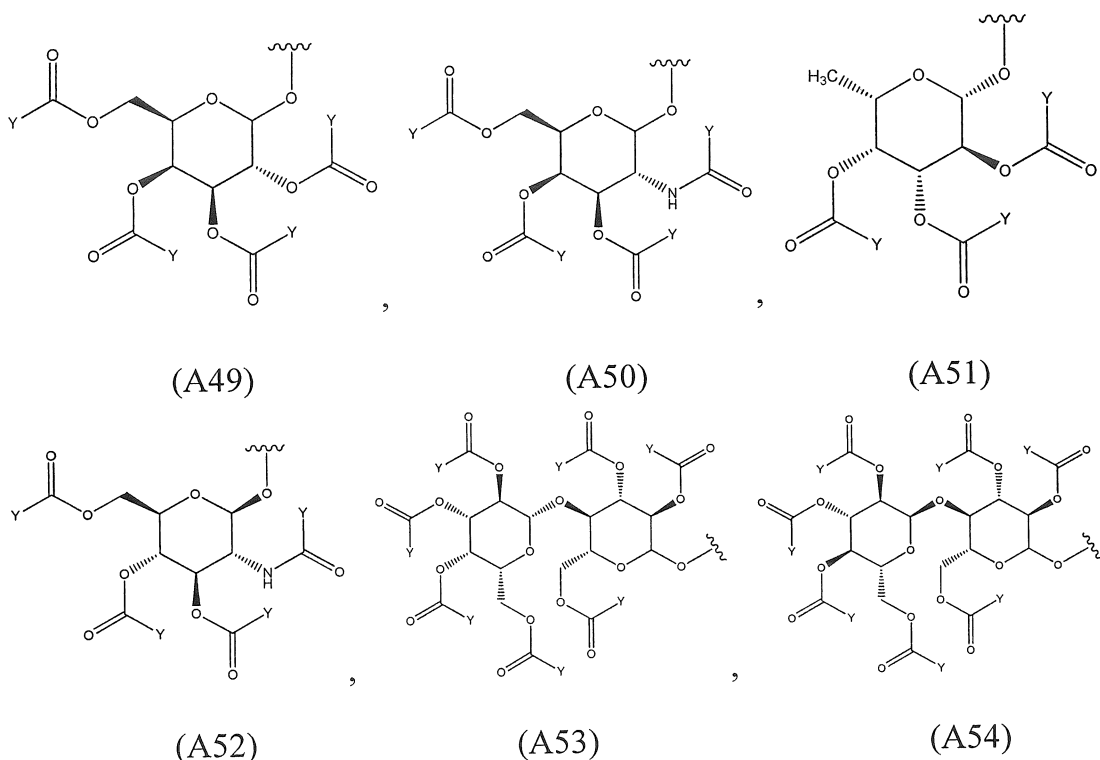
Theo phần mô tả trên đây, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng hiểu rằng so với phương pháp tổng hợp ở pha rắn sử dụng phosphoramidit đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308) trong đó phân tử tiếp hợp được liên kết với vị trí có thể có bất kỳ của trình tự

nucleotit có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhóm chức thứ nhất trên đây và nhóm chức thứ hai tùy ý. Ví dụ, phân tử tiếp hợp được liên kết với vùng tận cùng của trình tự nucleotit, hoặc với đầu tận cùng của trình tự nucleotit. Tương ứng, trừ khi được quy định theo cách khác, trong phần mô tả tiếp theo về quy trình sản xuất thể tiếp hợp và/hoặc phân tử tiếp hợp, khi đề cập đến các phản ứng như “khử bảo vệ”, “liên kết”, “tạo mũ”, “oxy hóa”, “luu huỳnh hóa”, cần hiểu rằng các điều kiện phản ứng và các chất tham gia vào phương pháp tổng hợp ở pha rắn sử dụng phosphoramidit đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng có thể áp dụng được cho các phản ứng này. Các điều kiện và các chất phản ứng được lấy làm ví dụ sẽ được mô tả chi tiết dưới đây.

Theo một số phương án, mỗi S_1 độc lập là M_1 . Theo một số phương án, mỗi S_1 độc lập là nhóm được tạo thành bằng cách bảo vệ ít nhất một nhóm hydroxyl có hoạt tính ở nhóm M_1 bằng nhóm bảo vệ hydroxyl. Theo một số phương án, mỗi S_1 độc lập là nhóm được tạo thành bằng cách bảo vệ tất cả các nhóm hydroxyl có hoạt tính hiện có trong nhóm M_1 bằng các nhóm bảo vệ hydroxyl. Theo một số phương án, nhóm bảo vệ hydroxyl bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để bảo vệ nhóm hydroxyl có hoạt tính trong nhóm M_1 . Theo một số phương án, hydroxy được bảo vệ được thể hiện dưới dạng 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, mà tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều nhóm 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 công thức (A46)-(A54):





Theo một số phương án, S_1 là A49 hoặc A50.

Theo một số phương án, mỗi Y độc lập được chọn từ methyl, triflometyl, diflometyl, monoflometyl, triclometyl, diclometyl, monoclometyl, etyl, n-propyl, isopropyl, phenyl, halophenyl, và alkylphenyl. Theo một số phương án, Y là methyl.

Như nêu trên, phương pháp sản xuất thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308) còn bao gồm các bước sau: tổng hợp mạch còn lại của siARN (ví dụ, khi mạch có nghĩa của siARN được liên kết với nhóm tiếp hợp được tổng hợp trong bước trên đây, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp mạch đối nghĩa của siARN theo phương pháp tổng hợp ở pha rắn, và ngược lại), phân lập mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa, và bắt cặp môi. Cụ thể là, trong bước phân lập, giá thể pha rắn được liên kết với trình tự nucleotit và/hoặc phân tử tiếp hợp được phân cắt, và nhóm bảo vệ cần thiết được loại bỏ (trong trường hợp này, mỗi nhóm S_1 trong hợp chất có công thức (321) được chuyển hóa thành nhóm hướng đích M_1 tương ứng), để tạo ra mạch có nghĩa (hoặc mạch đối nghĩa) của siARN được liên kết với nhóm tiếp hợp và mạch đối nghĩa (hoặc mạch có nghĩa) tương ứng. Mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa được bắt cặp môi để tạo thành cấu trúc ARN mạch kép, nhờ đó tạo ra thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308).

Theo một số phương án, phương pháp sản xuất thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308) bao gồm các bước sau: cho hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) tiếp xúc với monome nucleosit thứ nhất ở đầu 3' của mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa trong điều kiện phản ứng liên kết khi có mặt chất liên kết, nhờ đó liên kết hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) với nucleotit thứ nhất trong trình tự; sau đó liên kết các monome nucleosit theo hướng 3' đến 5' để tổng hợp mạch có nghĩa hoặc đối nghĩa của siARN theo loại và trình tự của các nucleotit trong mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa mong muốn trong điều kiện để tổng hợp ở pha rắn sử dụng phosphoramidit, trong đó hợp chất công thức (321) là hợp chất trong đó R₄ bao gồm nhóm chức thứ nhất và nhóm chức thứ hai, trong đó nhóm chức thứ nhất bao gồm hydroxyl được bảo vệ và nhóm chức thứ hai có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (C1') hoặc (C3'), và hợp chất có công thức (321) được khử bảo vệ trước khi được liên kết với monome nucleosit thứ nhất; và việc liên kết của mỗi monome nucleosit bao gồm phản ứng bốn bước gồm khử bảo vệ, liên kết, tạo mũ và oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa; do đó tạo ra mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của axit nucleic được liên kết với nhóm tiếp hợp; sau đó liên kết các monome nucleosit theo hướng 3' đến 5' để tổng hợp mạch đối nghĩa hoặc mạch có nghĩa của axit nucleic theo loại và trình tự của các nucleotit trong mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa trong điều kiện tổng hợp ở pha rắn sử dụng phosphoramidit; trong đó việc liên kết của mỗi monome nucleosit bao gồm phản ứng bốn bước gồm khử bảo vệ, liên kết, tạo mũ và oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa; loại bỏ nhóm bảo vệ và phân cắt giá thể pha rắn; phân lập và tinh chế mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa; và bắt cặp môi.

Theo một số phương án, phương pháp sản xuất thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308) bao gồm các bước sau: theo loại và trình tự của các nucleotit trong mạch có nghĩa và đối nghĩa của siARN mạch kép, liên kết tuần tự các monome nucleosit theo hướng 3' đến 5' để tổng hợp mạch đối nghĩa và mạch có nghĩa; trong đó việc liên kết của mỗi monome nucleosit bao gồm phản ứng bốn bước gồm khử bảo vệ, liên kết, tạo mũ và oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa, để thu được mạch có nghĩa được liên kết với giá thể pha rắn và mạch đối nghĩa được liên kết với giá thể pha rắn; cho hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) tiếp xúc với mạch có nghĩa được liên kết với giá thể pha rắn hoặc mạch đối nghĩa được liên kết với giá thể pha rắn trong điều kiện phản ứng

liên kết khi có mặt chất liên kết, nhờ đó liên kết hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) với mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa; trong đó hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) là hợp chất trong đó R_4 bao gồm nhóm chức thứ nhất mà là nhóm phosphoramidit; loại nhóm bảo vệ và phân cắt giá thể pha rắn; lần lượt phân lập và tinh chế mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của siARN; và bắt cặp môi, trong đó mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của siARN được liên kết với nhóm tiếp hợp.

Theo một số phương án, nguyên tử P trong công thức (A59) được liên kết với đầu 3' của mạch có nghĩa của siARN, và phương pháp sản xuất thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308) bao gồm:

(1) loại nhóm bảo vệ hydroxyl P_k trong hợp chất có công thức (321), trong đó hợp chất có công thức (321) là hợp chất trong đó R_4 bao gồm nhóm chức thứ nhất chứa nhóm hydroxyl được bảo vệ OR_k , và nhóm chức thứ hai có cấu trúc như được thể hiện bởi các công thức (C1') hoặc (C3'); cho sản phẩm đã khử bảo vệ tiếp xúc với monome nucleosit để thu được monome nucleosit được liên kết với giá thể pha rắn thông qua phân tử tiếp hợp trong điều kiện phản ứng liên kết khi có mặt chất liên kết;

(2) bắt đầu từ monome nucleosit đã liên kết với giá thể pha rắn thông qua phân tử tiếp hợp, tổng hợp mạch có nghĩa của siARN theo hướng 3' đến 5' bằng phương pháp tổng hợp pha rắn sử dụng phosphoramidit;

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

(4) phân lập mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN và bắt cặp môi chúng để tạo ra thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308).

Trong đó, ở bước (1), phương pháp loại nhóm bảo vệ R_k trong hợp chất có công thức (321) nêu trên bao gồm cho hợp chất có công thức (321) tiếp xúc với chất khử bảo vệ trong điều kiện khử bảo vệ. Điều kiện khử bảo vệ bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 50°C, và theo một số phương án, nhiệt độ này nằm trong khoảng từ 15 đến 35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 30 đến 300 giây, và theo một số phương án, thời gian này nằm trong khoảng từ 50 đến 150 giây. Chất khử bảo vệ có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ axit trifloaxetic, axit tricloaxetic, axit dicloaxetic, và axit monocloaxetic, và theo một số phương án, chất khử bảo vệ này là axit dicloaxetic. Tỷ lệ mol của chất khử bảo vệ so với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) là nằm

trong khoảng từ 10:1 đến 1000:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 50:1 đến 500:1.

Điều kiện phản ứng liên kết và chất liên kết có thể là điều kiện phản ứng và chất liên kết bất kỳ thích hợp để thực hiện phản ứng liên kết nêu trên. Theo một số phương án, điều kiện và chất liên kết giống như điều kiện và chất liên kết dùng trong phản ứng liên kết trong phương pháp tổng hợp ở pha rắn có thể được sử dụng.

Theo một số phương án, điều kiện phản ứng liên kết bao gồm nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0 đến 50°C, và theo một số phương án, nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 15 đến 35°C. Tỷ lệ mol của hợp chất có công thức (321) so với monome nucleosit là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:50, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 1:2 đến 1:5. Tỷ lệ mol của hợp chất có công thức (321) so với chất liên kết có thể nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:50, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 1:3 đến 1:10. Thời gian phản ứng là từ 200 đến 3.000 giây, và theo một số phương án, thời gian này nằm trong khoảng từ 500 đến 1.500 giây. Chất liên kết là một hoặc nhiều chất được chọn từ 1H-tetrazol, 5-ethylthio-1H-tetrazol và 5-benzylthio-1H-tetrazol, và theo một số phương án, chất này là 5-ethylthio-1H-tetrazol. Phản ứng liên kết có thể được thực hiện trong dung môi hữu cơ. Dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều dung môi được chọn từ axetonitril khan, DMF khan và diclometan khan, và theo một số phương án, dung môi này là axetonitril. Đối với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321), lượng dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 3 đến 50 L/mol, và theo một số phương án, lượng này nằm trong khoảng từ 5 đến 20 L/mol.

Trong bước (2), bắt đầu từ monome nucleosit được liên kết với giá thể pha rắn thông qua phân tử tiếp hợp được điều chế trong các bước nêu trên, mạch có nghĩa SS của thể tiếp hợp siARN được tổng hợp theo hướng 3' đến 5' bằng phương pháp tổng hợp pha rắn sử dụng phosphoramidit. Trong trường hợp này, phân tử tiếp hợp được liên kết với đầu 3' của mạch có nghĩa thu được.

Các điều kiện khác của phương pháp tổng hợp pha rắn trong các bước (2) và (3), bao gồm điều kiện khử bảo vệ monome nucleosit, loại và lượng chất khử bảo vệ, điều kiện phản ứng liên kết, loại và lượng chất liên kết, điều kiện phản ứng tạo mũ, loại và lượng chất tạo mũ, điều kiện phản ứng oxy hóa, loại và lượng chất oxy hóa, điều kiện

phản ứng lưu huỳnh hóa, và loại và lượng chất lưu huỳnh hóa, chấp nhận các chất, lượng và điều kiện thông thường khác nhau trong lĩnh vực kỹ thuật này.

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

Điều kiện khử bảo vệ monome nucleosit bao gồm nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0 đến 50°C, và theo một số phương án, nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 15 đến 35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 30 đến 300 giây, và theo một số phương án, thời gian này nằm trong khoảng từ 50 đến 150 giây. Chất khử bảo vệ có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ axit trifloaxetic, axit tricloaxetic, axit dicloaxetic, và axit monocloaxetic, và theo một số phương án, chất này là axit dicloaxetic. Tỷ lệ mol của chất khử bảo vệ so với nhóm bảo vệ 4,4'-dimetoxyltrityl trên giá thể pha rắn là nằm trong khoảng từ 2:1 đến 100:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 3:1 đến 50:1.

Điều kiện phản ứng liên kết bao gồm nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0 đến 50°C, và theo một số phương án, nằm trong khoảng từ 15 đến 35°C. Tỷ lệ mol của trình tự axit nucleic được liên kết giá thể pha rắn so với monome nucleosit là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:50, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 1:5 đến 1:15. Tỷ lệ mol của trình tự axit nucleic được liên kết với giá thể pha rắn so với chất liên kết là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:100, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 1:50 đến 1:80. Việc chọn lựa thời gian phản ứng và chất liên kết là giống như trên đây.

Điều kiện phản ứng tạo mũ bao gồm nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0 đến 50°C, và theo một số phương án, nhiệt độ này nằm trong khoảng từ 15 đến 35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 5 đến 500 giây, và theo một số phương án, thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 10 đến 100 giây. Việc lựa chọn chất tạo mũ là giống như được mô tả trên đây. Tỷ lệ mol của tổng lượng chất tạo mũ so với trình tự axit nucleic được liên kết với giá thể pha rắn là nằm trong khoảng từ 1:100 đến 100:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 1:10 đến 10:1. Trong trường hợp mà chất tạo mũ sử dụng axetic anhydrit và N-metylimidazol với lượng tương đương mol, thì tỷ lệ mol của axetic anhydrit, N-metylimidazol, và trình tự axit nucleic được liên kết với giá thể

pha rắn có thể nằm trong khoảng từ 1:1:10 đến 10:10:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 1:1:2 đến 2:2:1.

Điều kiện phản ứng oxy hóa bao gồm nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0 đến 50°C, và theo một số phương án, nhiệt độ này nằm trong khoảng từ 15 đến 35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 1 đến 100 giây, và theo một số phương án, thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 5 đến 50 giây. Theo một số phương án, chất oxy hóa là iot (theo một số phương án đề xuất ở dạng nước iot). Tỷ lệ mol của chất oxy hóa so với trình tự axit nucleic được liên kết với giá thể pha rắn trong bước liên kết có thể nằm trong khoảng từ 1:1 đến 100:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này 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 trong đó tỷ lệ của tetrahydrofuran:nước:pyridin là 3:1:1-1:1:3. Điều kiện phản ứng lưu huỳnh hóa bao gồm nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0 đến 50°C, và theo một số phương án, nhiệt độ này nằm trong khoảng từ 15 đến 35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 50 đến 2.000 giây, và theo một số phương án, thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 100 đến 1.000 giây. Theo một số phương án, chất lưu huỳnh hóa là xanthan hydrit. Tỷ lệ mol của chất lưu huỳnh hóa so với trình tự axit nucleic được liên kết với giá thể pha rắn trong bước liên kết là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1.000:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 10:1 đến 500:1. Theo một số phương án, phản ứng lưu huỳnh hóa được thực hiện trong dung môi hỗn hợp trong đó tỷ lệ của axetonitril:pyridin là nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1.

Phương pháp này còn bao gồm phân lập mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN sau khi liên kết tất cả các monome nucleosit và trước khi bắt cặp môi. Phương pháp phân lập là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và thường bao gồm phân cắt trình tự nucleotit đã tổng hợp khỏi giá thể pha rắn, loại nhóm bảo vệ trên các bazơ, các nhóm phosphat và phối tử, tinh chế và khử muối.

Các phương pháp phân cắt và khử bảo vệ thông thường để tổng hợp siARN có thể được sử dụng để phân cắt trình tự nucleotit đã tổng hợp khỏi giá thể pha rắn, và loại bỏ các nhóm bảo vệ trên các bazơ, các nhóm phosphat và phối tử. Ví dụ, trình tự nucleotit thu được được liên kết với giá thể pha rắn được cho tiếp xúc với dung dịch nước amoniac đậm đặc; trong quá trình khử bảo vệ, nhóm bảo vệ YCOO- trong các nhóm A46-A54 được chuyển hóa thành nhóm hydroxyl, và do đó các nhóm S₁ được chuyển hóa thành

các nhóm M_1 tương ứng, tạo ra thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308); trong đó dung dịch nước amoniac đậm đặc có thể là dung dịch nước amoniac có nồng độ nằm trong khoảng từ 25 đến 30% khối lượng. Đối với trình tự siARN đích, lượng dung dịch nước amoniac đậm đặc có thể nằm trong khoảng từ 0,2 ml/ μ mol đến 0,8 ml/ μ mol.

Nếu có ít nhất một nhóm bảo vệ 2'-TBDMS trên trình tự nucleotit được tổng hợp, thì phương pháp này còn bao gồm cho trình tự nucleotit đã loại khỏi giá thể pha rắn tiếp xúc với triethylamin trihydroflorua để loại bỏ nhóm bảo vệ 2'-TBDMS. Theo sáng chế, nucleotit tương ứng trong trình tự siARN đích thu được có 2'-hydroxy tự do. Đối với trình tự siARN đích, lượng triethylamin trihydroflorua tinh khiết là 0,4 ml/ μ mol-1,0 ml/ μ mol. Vì thế, thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308) có thể được tạo ra.

Các phương pháp tinh chế và khử muối là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, phương pháp tinh chế axit nucleic có thể được tiến hành bằng cách sử dụng cột tinh chế sắc ký ion điều chế với dung dịch giải hấp gradien là NaBr hoặc NaCl; sau khi thu gom và kết hợp sản phẩm, có thể tiến hành loại muối bằng cách sử dụng cột tinh chế sắc ký pha đảo.

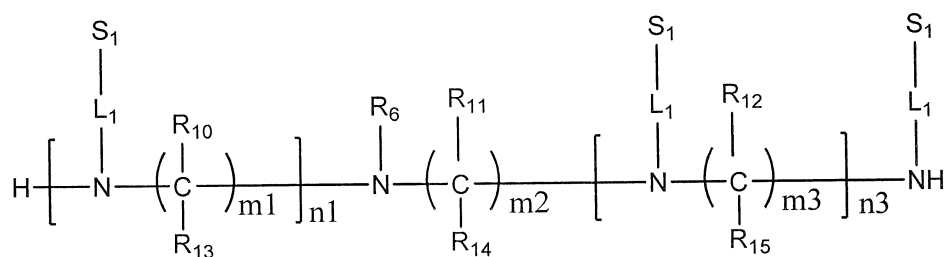
Trong thể tiếp hợp siARN thu được như được thể hiện bởi công thức (308), nguyên tử oxy hoặc lưu huỳnh không làm cầu nối trong liên kết phosphodiester hoặc liên kết phosphorothioat diester giữa các nucleotit hầu như liên kết với ion natri, và thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308) hầu như có mặt ở dạng muối natri. Các phương pháp trao đổi ion đã biết rõ có thể được sử dụng, trong đó ion natri có thể được thay thế bằng ion hydro và/hoặc cation khác, nhờ đó tạo ra các dạng khác của các thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308). Các cation là như được mô tả trên đây.

Trong suốt quá trình tổng hợp, độ tinh khiết và khối lượng phân tử của trình tự axit nucleic có thể được xác định ở thời điểm bất kỳ, để kiểm soát tốt hơn chất lượng tổng hợp. Các phương pháp xác định như vậy là đã biết rõ đối với 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 khối lượng phân tử có thể được xác định bằng phép đo phổ khối-sắc ký lỏng (liquid chromatography-mass spectrometry-LC-MS).

Các phương pháp bất cập môi là cũng đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, mạch có nghĩa (mạch SS) và mạch đối nghĩa (mạch AS) đã tổng hợp có thể đơn giản là được trộn với nước để tiêm ở tỷ lệ tương đương mol, được gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70 đến 95°C, và sau đó được làm nguội đến nhiệt độ trong phòng để tạo thành cấu trúc mạch kép thông qua liên kết hydro. Do đó, thể tiếp hợp siARN như được thể hiện bởi công thức (308) có thể được tạo ra.

Sau khi thu được thể tiếp hợp, theo một số phương án, thể tiếp hợp siARN được tổng hợp như được thể hiện bởi công thức (308) cũng có thể được xác định đặc điểm bằng các biện pháp như xác định khối lượng phân tử sử dụng các phương pháp như đo phổ khối-sắc ký lỏng, để khẳng định rằng thể tiếp hợp siARN được tổng hợp là thể tiếp hợp siARN được thiết kế quan tâm như được thể hiện bởi công thức (308), và trình tự của siARN được tổng hợp là trình tự của trình tự siARN mong muốn, ví dụ, một trong số các trình tự được nêu trong các bảng 1a-1g.

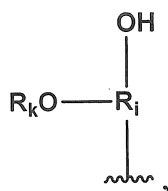
Hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) có thể được tạo ra bằng phương pháp điều chế sau, bao gồm: cho hợp chất như được thể hiện bởi công thức (313) tiếp xúc với anhydrit vòng trong dung môi hữu cơ trong điều kiện phản ứng este hóa khi có mặt bazơ và chất xúc tác este hóa; phân lập hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) nhờ trao đổi ion:



công thức (313)

trong đó các định nghĩa và các lựa chọn đối với $n1$, $n3$, $m1$, $m2$, $m3$, R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{14} , R_{15} , L_1 , and S_1 lần lượt được mô tả trên đây;

R_6 là nhóm để tạo ra R_4 của công thức (321); theo một số phương án, R_6 có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (A61):



(A61)

trong đó R_i là nhóm bất kỳ có khả năng liên kết với nguyên tử N trên khung có nito, liên kết với R_kO và liên kết với nhóm hydroxy tự do; R_k là nhóm bảo vệ hydroxy. Trong trường hợp này, hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) được tạo ra, trong đó R_4 bao gồm nhóm chức thứ nhất mà bao gồm nhóm bảo vệ hydroxy và nhóm chức thứ hai mà bao gồm cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (C1) hoặc (C2).

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

Theo một số phương án, dung môi hữu cơ bao gồm một hoặc nhiều 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, dung môi ete là dietyl ete và/hoặc metyl tertbutyl ete, và dung môi haloalkan là một hoặc nhiều trong số diclometan, triclometan và 1,2-dicloetan. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là diclometan. Đối với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (313), lượng dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 3 đến 50 L/mol, và theo một số phương án, lượng này nằm trong khoảng từ 5 đến 20 L/mol.

Theo một số phương án, anhydrit vòng là một trong số succinic anhydrit, glutaric anhydrit, adipic anhydrit hoặc pimelic anhydrit, và theo một số phương án, anhydrit vòng là succinic anhydrit. Tỷ lệ mol của anhydrit vòng so với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (313) là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 10:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này 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 phản ứng este hóa, như 4-dimetylaminopyridin. Tỷ lệ mol của chất xúc tác so với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (313) là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 10:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 2:1 đến 5:1.

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

Trao đổi ion đóng vai trò là chuyển hóa hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) thành dạng axit carboxylic hoặc muối carboxylic mong muốn và phương pháp trao đổi ion là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phân tử tiếp hợp có cation M^+ có thể được tạo ra bằng cách sử dụng dung dịch trao đổi ion và điều kiện trao đổi ion thích hợp, mà không được đề cập ở đây. Theo một số phương án, phản ứng trao đổi ion được tiến hành bằng cách sử dụng dung dịch trietylamin phosphat, và nồng độ của dung dịch trietylamin phosphat là 0,2-0,8 M. Theo một số phương án, nồng độ của dung dịch trietylamin phosphat là 0,4 đến 0,6 M, và đối với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (313), lượng của dung dịch trietylamin phosphat là 3-6 L/mol, và theo các phương án khác, lượng này nằm trong khoảng từ 4 đến 5 L/mol.

Hợp chất có công thức (321) có thể được phân tách khỏi hỗn hợp phản ứng bằng cách sử dụng các phương pháp phân tách thích hợp bất kỳ. Theo một số phương án, hợp chất có công thức (321) có thể được phân tách bằng cách loại dung môi nhờ làm bay hơi sau đó tiến hành sắc ký. Ví dụ, hai điều kiện sắc ký sau có thể được sử dụng để phân tách: (1) tinh chế bằng silicagel ở pha thường: Chất độn silicagel có kích cỡ 200-300 mesh, dung dịch rửa giải gradien là 1% khối lượng trietylamin trong diclometan:metanol = 100:18 - 100:20; hoặc (2) tinh chế ở pha đảo: chất độn pha đảo C18 và C8, dung dịch rửa giải gradien gồm 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 là hợp chất có công thức (321), mà có thể được sử dụng trực tiếp trong các phản ứng tiếp theo.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế hợp chất có công thức (321) còn bao gồm các bước: cho sản phẩm thu được bằng phản ứng trao đổi ion trên đây tiếp xúc thêm với giá thể pha rắn có các nhóm amino hoặc hydroxy trong dung môi hữu cơ trong điều kiện phản ứng ngưng tụ khi có mặt chất ngưng tụ, chất xúc tác ngưng tụ và amin bậc

ba. Trong trường hợp này, hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) được tạo ra, trong đó R₄ bao gồm nhóm chức thứ nhất mà bao gồm nhóm bảo vệ hydroxy và nhóm chức thứ hai mà bao gồm cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (C1').

Giá thể pha rắn là một trong số các giá thể được sử dụng trong phương pháp tổng hợp ở pha rắn siARN, một số giá thể này là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, giá thể pha rắn có thể được chọn từ các giá thể pha rắn chứa (các) nhóm chức hydroxy hoặc amino có hoạt tính, và theo một số phương án, giá thể này là nhựa chứa nhóm amino hoặc hydroxy. Theo một số phương án, nhựa chứa nhóm amino hoặc hydroxy có các thông số sau: cỡ hạt nằm trong khoảng từ 100-400 mesh, và tải lượng amino hoặc hydroxy bề mặt nằm trong khoảng từ 0,2 đến 0,5 mmol/g. Tỷ lệ của hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) so với giá thể pha rắn là nằm trong khoảng từ 10 đến 400 μmol hợp chất/g giá thể pha rắn. Theo một số phương án, tỷ lệ của hợp chất có công thức (321) so với giá thể pha rắn là nằm trong khoảng từ 50 $\mu\text{mol/g}$ đến 200 $\mu\text{mol/g}$.

Dung môi hữu cơ có thể là dung môi hoặc hỗn hợp dung môi thích hợp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều 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; dung môi ete là dietyl ete và/hoặc metyl tertbutyl ete; dung môi haloalkan là một hoặc nhiều trong số diclometan, triclometan và 1,2-dicloetan. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là axetonitril. Đối với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321), lượng dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 20 đến 200 L/mol, và theo một số phương án, lượng này nằm trong khoảng từ 50 đến 100 L/mol.

Theo một số phương án, chất ngưng tụ có thể là benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino phosphoni hexaflophosphat (PyBop), 3-dietoxyphosphoryl-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT) và/hoặc O-benzotriazol-tetrametyluronium hexaflophosphat. Theo một số phương án, chất ngưng tụ này là O-benzotriazol-tetrametyluronium hexaflophosphat. Tỷ lệ mol của chất ngưng tụ so với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 20:1, và theo các phương án khác, tỷ lệ này 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, amin bậc ba này là N,N-diisopropyletylamin. Tỷ lệ mol của amin bậc ba so với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 20:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 1:1 đến 5:1.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế hợp chất có công thức (321) còn bao gồm bước: cho sản phẩm ngưng tụ thu được tiếp xúc với chất tạo mũ và chất xúc tác axyl hóa trong dung môi hữu cơ trong điều kiện phản ứng tạo mũ, và phân tách hợp chất có công thức (321). Phản ứng tạo mũ được sử dụng để loại bỏ nhóm chức có hoạt tính mà không phản ứng hoàn toàn, để tránh tạo ra các phản ứng phụ không cần thiết trong các phản ứng tiếp theo. Điều kiện phản ứng tạo mũ bao gồm nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0 đến 50°C, và theo một số phương án, nhiệt độ này nằm trong khoảng từ 15 đến 35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 1 đến 10 giờ, và theo một số phương án, thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 3 đến 6 giờ. Chất tạo mũ có thể là chất tạo mũ bất kỳ được sử dụng để tổng hợp siARN ở pha rắn, mà đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một số phương án, chất tạo mũ bao gồm chất tạo mũ 1 (cap1) và chất tạo mũ 2 (cap2). Cap1 là N-metylimidazol, và theo một số phương án, cap1 được đề cập đến dưới dạng dung dịch hỗn hợp gồm N-metylimidazol trong pyridin/axetonitril, trong đó tỷ lệ thể tích của pyridin so với axetonitril là nằm trong khoảng từ 1:10 đến 1:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 1:3 đến 1:1. Theo một số phương án, tỷ lệ của tổng thể tích của pyridin và axetonitril so với thể tích của N-metylimidazol là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 10:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 3:1 đến 7:1. Cap2 là axetic anhydrit, và theo một số phương án, cap2 được đề cập đến dưới dạng dung dịch chứa axetic anhydrit trong axetonitril, trong đó tỷ lệ thể tích của axetic anhydrit so với axetonitril là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:10, và theo các phương án khác tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 1:2 đến 1:6.

Theo một số phương án, tỷ lệ thể tích của dung dịch hỗn hợp gồm N-metylimidazol trong pyridin/axetonitril với khối lượng của hợp chất có công thức (321) là nằm trong khoảng từ 5 ml/g đến 50 ml/g, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 15 ml/g đến 30 ml/g. Tỷ lệ thể tích của dung dịch gồm axetic

anhydrit trong axetonitril so với khối lượng của hợp chất có công thức (321) là nằm trong khoảng từ 0,5 ml/g đến 10 ml/g, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 1 ml/g đến 5 ml/g.

Theo một số phương án, chất tạo mũ bao gồm axetic anhydrit và N-metylimidazol với lượng tương đương mol. Dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều 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. Đối với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321), lượng dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 10 đến 50 L/mol, và theo một số phương án, lượng này nằm trong khoảng từ 5 đến 30 L/mol.

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 cho phản ứng ngưng tụ este hóa hoặc phản ứng ngưng tụ amit hóa, như các hợp chất kiềm dị vòng. Theo một số phương án, chất xúc tác axyl hóa là 4-dimetylaminopyridin. Tỷ lệ khối lượng của chất xúc tác so với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) có thể nằm trong khoảng từ 0,001:1 đến 1:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 0,01:1 đến 0,1:1.

Theo một số phương án, hợp chất có công thức (321) có thể được phân tách khỏi hỗn hợp phản ứng bằng các phương pháp phân tách thích hợp bất kỳ. Theo một số phương án, hợp chất có công thức (321) có thể thu được bằng cách rửa kỹ bằng dung môi hữu cơ và lọc để loại bỏ các chất phản ứng không phản ứng, chất tạo mũ dư và các tạp chất khác, trong đó dung môi hữu cơ được chọn từ axetonitril, diclometan và metanol. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là axetonitril.

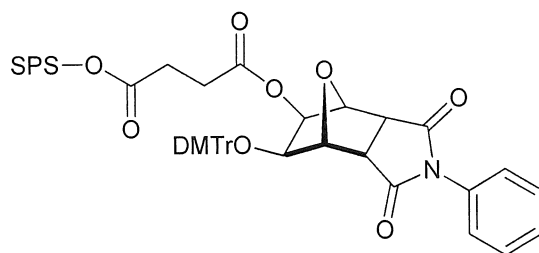
Theo một số phương án, phương pháp sản xuất phân tử tiếp hợp như được thể hiện bởi công thức (321) bao gồm cho hợp chất như được thể hiện bởi công thức (313) tiếp xúc với phosphorodiamidit trong dung môi hữu cơ trong điều kiện phản ứng liên kết khi có mặt chất liên kết, và phân tách hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321). Trong trường hợp này, hợp chất như được thể hiện bởi công thức (321) được tạo ra, trong đó R_4 bao gồm nhóm chức thứ nhất chứa nhóm bảo vệ hydroxy và nhóm chức thứ hai chứa cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (C3).

Theo một số phương án, điều kiện phản ứng liên kết bao gồm: nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0 đến 50°C, như 15-35°C; tỷ lệ mol của hợp chất có công thức (313)

so với phosphorodiamidit nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:50, như 1:5 đến 1:15; tỷ lệ mol của hợp chất có công thức (313) so với chất liên kết nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:100, như 1:50 đến 1:80; và thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 200 đến 3.000 giây, như 500-1.500 giây. Phosphorodiamidit có thể là, ví dụ, bis(diisopropylamino)(2-xyanoetoxy)phosphin, mà có thể là sẵn có trên thị trường hoặc được tổng hợp theo các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chất liên kết là một hoặc nhiều chất được chọn từ 1H-tetrazol, 5-ethylthio-1H-tetrazol và 5-benzylthio-1H-tetrazol, như 5-ethylthio-1H-tetrazol. Phản ứng liên kết có thể được thực hiện trong dung môi hữu cơ. Dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều dung môi được chọn từ axetonitril khan, DMF khan và diclometan khan, như axetonitril khan. Đối với hợp chất có công thức (313), lượng dung môi hữu cơ là nằm trong khoảng từ 3 đến 50 L/mol, như từ 5 đến 20 L/mol. Bằng phản ứng liên kết, nhóm hydroxy trong hợp chất có công thức (313) phản ứng với phosphorodiamidit để tạo thành nhóm phosphoramidit. Theo một số phương án, dung môi có thể được loại trực tiếp để thu được sản phẩm thô là hợp chất có công thức (321), mà có thể được sử dụng trực tiếp trong các phản ứng tiếp theo.

Theo một số phương án, phương pháp điều chế hợp chất có công thức (321) còn bao gồm các bước sau: cho sản phẩm đã phân tách tiếp xúc thêm với giá thể pha rắn có các nhóm hydroxy trong dung môi hữu cơ trong điều kiện phản ứng liên kết khi có mặt chất liên kết, sau đó tiến hành phản ứng tạo mũ, oxy hóa và phân tách để thu được hợp chất có công thức (321), trong đó R₄ chứa nhóm chức thứ nhất bao gồm nhóm bảo vệ hydroxy và nhóm chức thứ hai chứa cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (C3').

Theo một số phương án, giá thể pha rắn là giá thể rắn đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này để tổng hợp axit nucleic ở pha rắn, như, giá thể pha rắn thông thường sẵn có trên thị trường đã khử bảo vệ (NittoPhase®HL UnyLinker™ 300 Oligonucleotit Synthesis Support, Kinovate Life Sciences, như được thể hiện bởi công thức (B80)):



(B80).

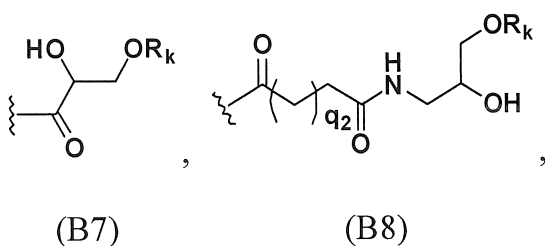
Phản ứng khử bảo vệ là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, điều kiện khử bảo vệ bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 50°C, như từ 15 đến 35°C, thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 30 đến 300 giây, như từ 50 đến 150 giây. Chất khử bảo vệ có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm axit trifloaxetic, axit tricloaxetic, axit dicloaxetic, và axit monocloaxetic. Theo một số phương án, chất khử bảo vệ là axit dicloaxetic. Tỷ lệ mol của chất khử bảo vệ so với nhóm bảo vệ-DMTr (4,4'-dimetoxytityl) trên giá thể pha rắn là nằm trong khoảng từ 2:1 đến 100:1, như từ 3:1 đến 50:1. Nhờ phản ứng khử bảo vệ này mà thu được các nhóm hydroxy phản ứng tự do trên bề mặt của giá thể pha rắn, để tạo điều kiện thuận lợi cho phản ứng liên kết tiếp theo.

Điều kiện phản ứng liên kết và chất liên kết có thể được chọn lọc như trên. Nhờ phản ứng liên kết, các nhóm hydroxy tự do được tạo thành trong phản ứng khử bảo vệ sẽ phản ứng với các nhóm phosphoramidit, để tạo thành liên kết phosphit este.

Theo một số phương án, điều kiện phản ứng tạo mũ bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 50°C, như từ 15 đến 35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 5 đến 500 giây, như từ 10 đến 100 giây. Phản ứng tạo mũ được tiến hành khi có mặt chất tạo mũ. Việc lựa chọn và lượng chất tạo mũ là như được mô tả trên đây.

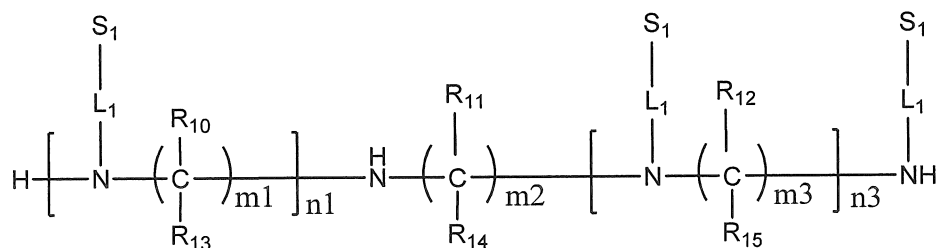
Điều kiện phản ứng oxy hóa bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 50°C, như từ 15 đến 35°C, và thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 1 đến 100 giây, như từ 5 đến 50 giây. Chất oxy hóa có thể là, ví dụ, iot (theo một số phương án, chất oxy hóa được đề cập ở dạng nước iot). Tỷ lệ mol của chất oxy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

Theo một số phương án, R₆ là một trong số các nhóm có công thức (B7) hoặc (B8):

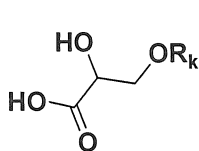


trong đó các định nghĩa của q_2 và R_k là như được mô tả trên đây.

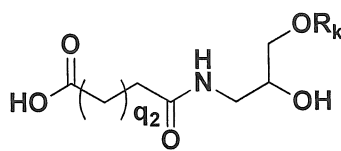
Trong trường hợp này, hợp chất như được thể hiện bởi công thức (313) có thể được tạo ra bằng phương pháp điều chế sau, bao gồm: cho hợp chất như được thể hiện bởi công thức (314) tiếp xúc với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (A-1) hoặc (A-2) trong dung môi hữu cơ trong điều kiện phản ứng amit hóa khi có mặt chất ngưng tụ để thực hiện phản ứng amit hóa và amin bậc ba, sau đó phân tách:



công thức (314)



(A-1)



(A-2)

trong đó các định nghĩa và các lựa chọn của n_1 , n_3 , m_1 , m_2 , m_3 , 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 trên đây.

Điều kiện phản ứng amit hóa bao gồm nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 0 đến 100°C và thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 1 đến 48 giờ. Theo một số phương án, điều kiện phản ứng amit hóa bao gồm nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 10 đến 40°C và thời gian phản ứng nằm trong khoảng từ 2 đến 16 giờ.

Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều 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 dung môi trong số metanol, etanol và propanol, và theo một số phương án, dung môi rượu này 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 dung môi trong số diclometan, triclometan và 1,2-dicloetan. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là diclometan. Đối với hợp chất như được thể hiện bởi công thức

(314), lượng dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 3 đến 50 L/mol, và theo một số phương án, lượng này nằm trong khoảng từ 3 đến 20 L/mol.

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

Theo một số phương án, amin bậc ba là triethylamin hoặc N,N-diisopropyletylamin, và theo một số phương án, amin bậc ba này là N,N-diisopropyletylamin. Tỷ lệ mol của amin bậc ba so với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (314) là nằm trong khoảng từ 3:1 đến 20:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 5:1 đến 10:1.

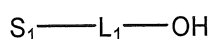
Các hợp chất có công thức (A-1) và (A-2) có thể được điều chế bằng các phương pháp thích hợp bất kỳ. Ví dụ, khi R_k là nhóm DMTr, hợp chất có công thức (A-1) có thể được điều chế bằng cách cho canxi glyxerat phản ứng với DMTrCl. Tương tự, hợp chất có công thức (A-2) có thể được điều chế bằng cách đầu tiên cho 3-amino-1,2-propanediol tiếp xúc với anhydrit vòng và sau đó cho phản ứng với DMTrCl, trong đó anhydrit vòng có thể có 4-13 nguyên tử cacbon, và theo một số phương án, có 4-8 nguyên tử cacbon. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng hiểu rằng các lựa chọn các anhydrit vòng khác nhau tương ứng với các giá trị khác nhau của q_2 trong hợp chất có công thức (A-2). Ví dụ, khi anhydrit vòng là succinic anhydrit, thì $q_2=1$; khi anhydrit vòng là glutaric anhydrit, thì $q_2=2$, và v.v..

Theo một vài phương án, hợp chất có công thức (313) cũng có thể được điều chế bằng cách cho hợp chất như được thể hiện bởi công thức (314) phản ứng liên tiếp với anhydrit vòng, 3-amino-1,2-propanediol và DMTrCl. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng hiểu rằng các thay đổi này sẽ không làm ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của hợp chất có công thức (313), và các thay đổi này dễ dàng được

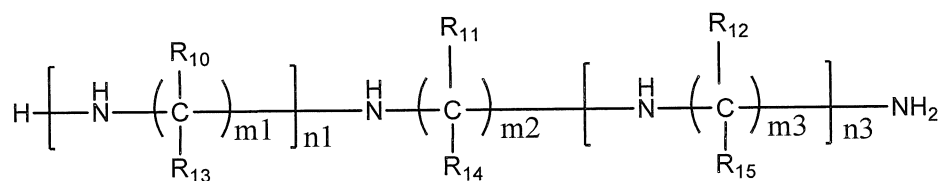
nhận thấy bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này trên cơ sở các phương pháp nêu trên.

Tương tự, hợp chất có công thức (313) có thể được phân tách khỏi hỗn hợp phản ứng bằng các phương pháp phân tách thích hợp bất kỳ. Theo một số phương án, hợp chất có công thức (313) có thể được phân tách bằng cách loại dung môi bằng cách làm bay hơi sau đó tiến hành sắc ký. Ví dụ, các điều kiện sắc ký sau có thể được sử dụng để phân tách: (1) tinh chế bằng silicagel ở pha thường: chất độn silicagel có kích thước 200-300 mesh, với dung dịch rửa giải gradien là ete dầu mỏ: etyl axetat: diclometan: N,N-dimetylformamit = 1:1:1:0.5 - 1:1:1:0.6; và (2) tinh chế ở pha đảo: các chất độn pha đảo C18 và C8, với dung dịch rửa giải gradien là metanol: axetonitril = 0,1:1 - 1:0,1. Theo một số phương án, dung môi có thể được loại trực tiếp để thu được sản phẩm thô là hợp chất có công thức (313), mà có thể được sử dụng trực tiếp trong các phản ứng tiếp theo.

Theo một số phương án, hợp chất như được thể hiện bởi công thức (314) có thể được tạo ra bằng phương pháp điều chế sau, bao gồm: cho hợp chất như được thể hiện bởi công thức (320) tiếp xúc với hợp chất như được thể hiện bởi công thức hoặc (316) trong dung môi hữu cơ trong điều kiện phản ứng ngưng tụ khi có mặt chất ngưng tụ để thực hiện phản ứng amit hóa và amin bậc ba, sau đó phân tách:



công thức (316)



công thức (320)

trong đó các định nghĩa và các lựa chọn của $n1$, $n3$, $m1$, $m2$, $m3$, R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{14} , và R_{15} là lần lượt như được mô tả trên đây.

Hợp chất có công thức (316) có thể là, như, các hợp chất được mô tả trong tài liệu J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 16958-16961. Theo cách khác, các 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 vài hợp chất có công thức (316) có thể

được điều chế theo phương pháp được bộc lộ trong ví dụ 1 của patent Mỹ số US8106022B2, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

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

Xét đến cấu trúc của sản phẩm mong muốn là hợp chất of công thức (314), tỷ lệ mol của hợp chất như được thể hiện bởi công thức (316) so với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (320) nên được xác định dựa trên tổng của n_1 và n_3 trong công thức (320). Theo một số phương án, ví dụ, khi $n_1 + n_3 = 3$, để đảm bảo phản ứng hoàn toàn mà không có lượng dư bất kỳ, tỷ lệ mol của hợp chất như được thể hiện bởi công thức (316) so với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (320) có thể nằm trong khoảng từ 3:1 đến 3,5:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này có thể nằm trong khoảng từ 3,01:1 đến 3,15:1.

Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là một hoặc nhiều 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 dung môi trong số diclometan, triclometan và 1,2-dicloetan. Theo một số phương án, dung môi hữu cơ là diclometan. Đối với hợp chất có công thức (320), lượng dung môi hữu cơ có thể nằm trong khoảng từ 3 đến 50 L/mol, và theo một số phương án, lượng này có thể nằm trong khoảng từ 5 đến 20 L/mol.

Theo một số phương án, chất ngưng tụ dùng cho phản ứng amit hóa là benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoni hexaflophosphat, 3-dietoxyphosphoryloxy-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT), O-benzotriazol-tetrametyluronium hexaflophosphat, 4-(4,6-dimetoxytriazin-2-yl)-4-metylmorpholin hydroclorua, hoặc 1-hydroxybenzotriazol, và theo các phương án khác chất này là hỗn hợp gồm benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoni hexaflophosphat và 1-hydroxybenzotriazol, trong đó benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoni hexaflophosphat và

1-hydroxybenzotriazol được sử dụng với lượng tương đương mol. Tỷ lệ mol của tổng lượng chất ngưng tụ dùng cho phản ứng amit hóa so với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (316) là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 3:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 1,05:1 đến 1,5:1.

Amin bậc ba có thể là N-metylmorpholin, trietylamin hoặc N,N-diisopropyletylamin, và theo một số phương án, amin bậc ba này là N-metylmorpholin. Tỷ lệ mol của amin bậc ba so với hợp chất như được thể hiện bởi công thức (316) có thể nằm trong khoảng từ 2:1 đến 10:1, và theo một số phương án, tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 2:1 đến 5:1.

Tương tự, hợp chất như được thể hiện bởi công thức (314) có thể được phân tách khỏi hỗn hợp phản ứng bằng các phương pháp phân tách thích hợp bất kỳ. Theo một số phương án, hợp chất như được thể hiện bởi công thức (314) có thể được phân tách bằng cách loại dung môi bằng cách làm bay hơi sau đó tiến hành sắc ký, ví dụ, sử dụng hai điều kiện sắc ký sau để phân tách: (1) tinh chế bằng silicagel ở pha thường: chất độn silicagel có kích thước 200-300 mesh, với dung dịch rửa giải gradien là diclometan: metanol = 100:5 - 100:7; và (2) tinh chế ở pha đảo: các chất độn ở pha đảo C₁₈ và C₈, với dung dịch rửa giải gradien là metanol: axetonitril = 0,1:1 - 1:0,1. Theo một số phương án, dung môi có thể được loại trực tiếp để thu được sản phẩm thô là hợp chất có công thức (314), mà có thể được sử dụng trực tiếp trong các phản ứng tiếp theo.

Hợp chất có công thức (320) có thể sẵn có trên thị trường, hoặc được điều chế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng các phương pháp đã biết. Ví dụ, trong trường hợp mà $m_1=m_2=m_3=3$, $n_1=1$, $n_3=2$, và mỗi nhóm trong số R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃, R₁₄, và R₁₅ là H, thì hợp chất có công thức (320) có thể sẵn có trên thị trường từ Alfa Aesar Inc.

Thể tiếp hợp siARN theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với các tá dược được dụng khác, mà có thể là một hoặc nhiều công thức hoặc hợp chất thông thường khác nhau trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để biết thêm chi tiết, xem phần mô tả trên đây về được phẩm theo sáng chế.

Sử dụng siARN, được phẩm và thể tiếp hợp theo sáng chế

Theo một số phương án, sáng chế mô tả việc sử dụng siARN, và/hoặc dược phẩm, và/hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh lý do sự biểu hiện bất thường của gen PCSK9 gây ra.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp phòng ngừa và/hoặc điều trị các bệnh hoặc tình trạng bệnh lý do sự biểu hiện bất thường của gen PCSK9 gây ra, bao gồm cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu của siARN, và/hoặc dược phẩm, và/hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế.

Mục đích của việc phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý do sự biểu hiện bất thường của gen PCSK9 gây ra có thể đạt được thông qua cơ chế của ARN can thiệp bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng thành phần có hoạt tính siARN theo sáng chế. Do đó, siARN và/hoặc dược phẩm và/hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có thể được sử dụng để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý do sự biểu hiện bất thường của gen PCSK9 gây ra, hoặc để sản xuất thuốc để phòng ngừa và/hoặc điều trị tình trạng bệnh lý do sự biểu hiện bất thường của gen PCSK9 gây ra.

Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh lý do sự biểu hiện bất thường của gen PCSK9 gây ra được dùng để chỉ bệnh tăng lipit máu, và các bệnh tim mạch thu được bao gồm chứng xơ vữa động mạch, bệnh tim mạch vành và bệnh tăng huyết áp.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “việc sử dụng/sử dụng” được dùng để chỉ việc phân phối siARN và/hoặc dược phẩm và/hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế vào cơ thể của đối tượng bằng phương pháp hoặc đường dùng mà ít nhất một phần đưa siARN và/hoặc dược phẩm và/hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế đến vị trí mong muốn để tạo ra tác dụng mong muốn. Các đường dùng thích hợp cho phương pháp theo sáng chế bao gồm sử dụng khu trú và sử dụng toàn thân. Nói chung, sử dụng khu trú giúp phân phối thể tiếp hợp siARN nhiều hơn tới vị trí cụ thể của đối tượng so với sự tuần hoàn toàn thân; trong khi đó sử dụng toàn thân giúp phân phối siARN và/hoặc dược phẩm và/hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế vào hệ tuần hoàn hệ thống cơ bản của đối tượng. Xét rằng sáng chế được dự định để đề xuất các biện pháp phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh tăng lipit máu, theo một số phương án, cách thức sử dụng có thể phân phối thuốc đến gan được sử dụng.

Việc sử dụng cho đối tượng có thể được thực hiện bằng các đường dùng thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các

đường dùng qua đường miệng và ngoài đường tiêu hóa, như sử dụng qua đường tĩnh mạch, sử dụng trong cơ, sử dụng dưới da, sử dụng qua da, sử dụng trong khí quản (sol khí), sử dụng trong phổi, sử dụng trong mũi, sử dụng qua trực tràng, và sử dụng khu trú (bao gồm sử dụng trong miệng và sử dụng dưới lưỡi). Tần suất sử dụng có thể là một hoặc nhiều lần trong ngày, hằng tuần, hai tuần một lần, ba tuần một lần, hằng tháng, hai tháng một lần, hàng quý, hàng nửa năm hoặc hàng năm.

Liều của siARN hoặc dược phẩm hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có thể là liều thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này, mà có thể được xác định theo các thông số khác nhau, đặc biệt là độ tuổi, cân nặng và giới tính của đối tượng. Độ độc và hiệu quả có thể được xác định trong nuôi cấy tế bào hoặc trên các động vật thử nghiệm bằng các quy trình được học chuẩn, ví dụ, bằng cách xác định LD₅₀ (liều gây chết mà gây chết 50% quần thể), ED₅₀ (liều mà có thể gây ra 50% cường độ phản ứng tối đa trong phản ứng đã phân loại, và có thể khiến cho 50% đối tượng thử nghiệm có đáp ứng tích cực trong đáp ứng định tính), hoặc IC₅₀ (nồng độ của chất ức chế/thuốc mà đáp ứng đã phân loại được ức chế một nửa). Khoảng liều dùng cho người có thể được đưa ra dựa trên số liệu thu được từ phân tích nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu trên động vật.

Khi siARN, dược phẩm và/hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế được sử dụng, ví dụ, cho khỉ cynomolgus đực hoặc cái, 3-5 tuổi cân nặng từ 2 đến 6 kg, (i) đối với thể tiếp hợp siARN, lượng siARN của nó có thể nằm trong khoảng từ 0,001 đến 100 mg/kg thể trọng, theo một số phương án nằm trong khoảng từ 0,01 đến 50 mg/kg thể trọng, theo một số phương án nằm trong khoảng từ 0,05 đến 20 mg/kg thể trọng, theo các phương án khác nằm trong khoảng từ 0,1 đến 15 mg/kg thể trọng, và theo các phương án khác nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 mg/kg thể trọng; (ii) đối với dược phẩm được tạo thành từ siARN và chất mang dược dụng, lượng siARN của nó có thể nằm trong khoảng từ 0,001 đến 50 mg/kg thể trọng, theo một số phương án nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10 mg/kg thể trọng, theo một số phương án nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5 mg/kg thể trọng, và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 0,1 đến 3 mg/kg thể trọng, dựa trên lượng siARN.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự biểu hiện của gen PCSK9 ở các tế bào gan, bao gồm cho một lượng hữu hiệu của siARN và/hoặc dược phẩm và/hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế tiếp xúc với các tế bào gan, và đưa

siARN và/hoặc được phẩm và/hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế vào các tế bào gan, để đạt được mục đích ức chế sự biểu hiện của gen PCSK9 trong các tế bào gan thông qua cơ chế của ARN can thiệp. Các tế bào gan có thể được chọn từ các dòng tế bào ung thư gan (như SMMC-7721, HepG2 và Huh7), và các tế bào gan nguyên phát được phân lập. Theo một số phương án, các tế bào gan là các tế bào ung thư gan HepG2.

Trong trường hợp mà sự biểu hiện của gen PCSK9 ở tế bào được ức chế bằng phương pháp theo sáng chế, lượng siARN trong siARN đã cải biến và/hoặc được phẩm và/hoặc thể tiếp hợp siARN theo sáng chế thường là lượng sao cho 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 μ M, hoặc từ 0,01 nM đến 100 nM, hoặc từ 0,05 nM đến 50 nM, hoặc từ 0,05 nM đến 5 nM trên bề mặt của tế bào đích. Lượng cần để đạt được nồng độ khu trú này sẽ khác nhau theo nhiều yếu tố, bao gồm phương pháp phân phối, vị trí phân phối, số lớp tế bào giữa vị trí phân phối và tế bào đích hoặc các mô, đường phân phối (khu trú hoặc toàn thân), v.v.. Nồng độ tại vị trí phân phối có thể cao hơn đáng kể so với vị trí trên bề mặt của tế bào hoặc mô đích.

Kit

Sáng chế đề xuất kit chứa một lượng hữu hiệu của ít nhất một trong số siARN cải biến, được phẩm, và thể tiếp hợp siARN theo sáng chế.

Theo một số phương án, kit theo sáng chế có thể cung cấp siARN cải biến trong đồ chứa. Theo một số phương án, kit theo sáng chế có thể bao gồm đồ chứa chứa tá được được dụng. Theo một số phương án, kit có thể còn chứa các thành phần khác, như chất làm ổn định hoặc chất bảo quản. Theo một số phương án, kit theo sáng chế có thể chứa ít nhất một chất điều trị khác trong đồ chứa khác đồ chứa cung cấp siARN cải biến theo sáng chế. Theo một số phương án, kit có thể bao gồm hướng dẫn trộn siARN cải biến với chất mang và/hoặc tá được được dụng hoặc các thành phần khác (nếu có).

Trong kit theo sáng chế, siARN cải biến và chất mang và/hoặc tá được được dụng, cũng như là siARN cải biến, được phẩm, và/hoặc thể tiếp hợp siARN và/hoặc thể tiếp hợp, và/hoặc tá được được dụng có thể được cung cấp ở dạng bất kỳ, như ở dạng lỏng, dạng khô hoặc dạng đông khô. Theo một số phương án, siARN cải biến và chất mang và/hoặc tá được được dụng, và được phẩm và/hoặc thể tiếp hợp và tùy ý (các) tá được

được dụng là gần như tinh khiết và/hoặc gần như được vô trùng. Theo một số phương án, kit theo sáng chế có thể cung cấp nước đã vô trùng.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả thêm nhờ các ví dụ, nhưng không bị giới hạn ở khía cạnh bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Trừ khi được quy định theo cách khác, các tác nhân phản ứng và môi trường nuôi cấy được sử dụng trong các ví dụ sau đều sẵn có trên thị trường, và các quy trình được sử dụng như điện di axit nucleic và PCR thời gian thực được tiến hành theo các phương pháp được mô tả trong tài liệu Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)).

Khi siARN hoặc thể tiếp hợp siARN chống lại gen PCSK9 được tổng hợp theo sáng chế hoặc siARN hoặc thể tiếp hợp siARN là đối chứng âm được sử dụng để chuyển nhiễm vào tế bào, Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen) được sử dụng làm tác nhân chuyển nhiễm. Các quy trình cụ thể có thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Trừ khi được quy định theo cách khác, các tỷ lệ của các tác nhân phản ứng đề cập dưới đây đều được tính toán theo tỷ lệ thể tích (thể tích/thể tích).

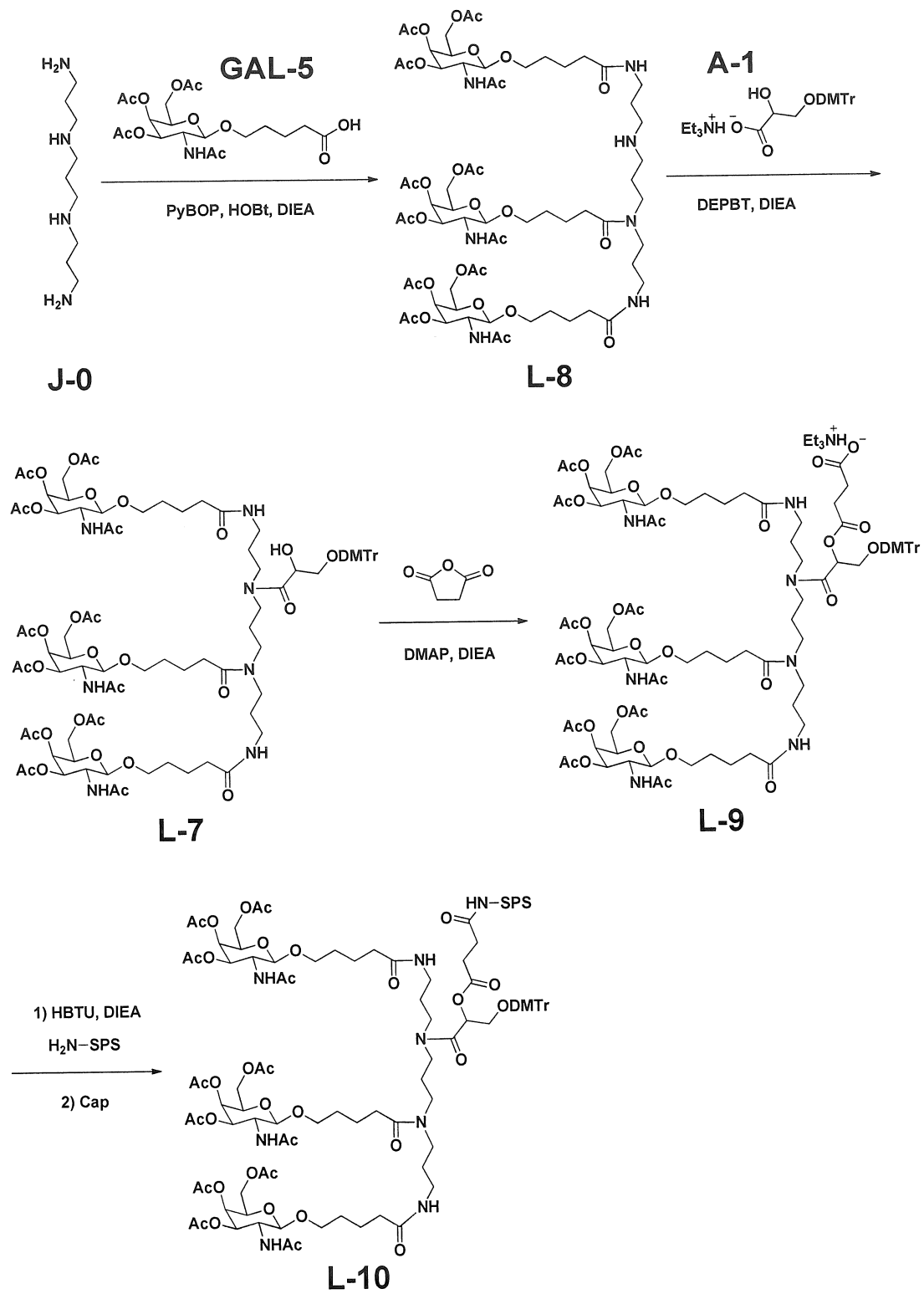
Toàn bộ số liệu thử nghiệm được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm \text{SEM}$ (giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn), và số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích thống kê Graphpad prism 6.0. ANOVA một chiều được sử dụng để phân tích và Tukey được sử dụng làm phương pháp phân tích để so sánh các nhóm để xác định liệu sự chênh lệch giữa hai nhóm là có đáng kể hay không. Nếu phát hiện thấy sự chênh lệch là không đáng kể bằng phương pháp ANOVA một chiều, khi P tổng số $< 0,05$, kiểm định T được sử dụng cho kiểm định hai phía; khi $p < 0,05$, có sự chênh lệch đáng kể giữa hai nhóm.

Ví dụ điều chế 1: Điều chế thể tiếp hợp 1

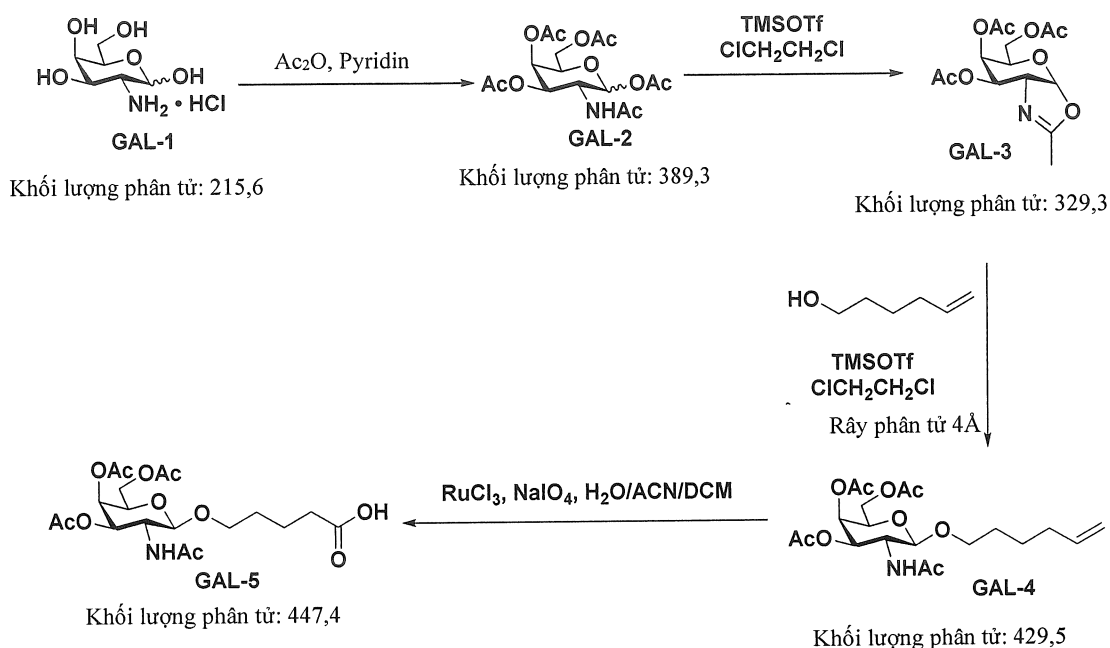
Trong ví dụ điều chế này, thể tiếp hợp 1 được thể hiện trong bảng 3 được tổng hợp và ký hiệu của nó là L10-siPCSKa1M1S. siARN đã tiếp hợp trong thể tiếp hợp này có các trình tự mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của thể tiếp hợp 1 trong Bảng 3.

(1-1) Tổng hợp hợp chất L-10:

Hợp chất L-10 được tổng hợp theo phương pháp sau:



(1-1-1) Tổng hợp GAL-5 (đoạn cuối của phân tử tiếp hợp)



(1-1-1a) Tổng hợp GAL-2

100,0 g GAL-1 (N-acetyl-D-galactosamin hydrochlorua, CAS No.: 1772-03-8, được mua từ NingBo hongxiang bio-chem Co., Ltd., 463,8 mmol) được hòa tan trong 1000 ml pyridin khan, mà được bổ sung 540 ml axetic anhydrit (được mua từ Enox Inc., 5565,6 mmol) trong bể nước đá để phản ứng trong điều kiện khuấy ở nhiệt độ phòng trong 1,5 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được rót vào 10 L nước đá và được lọc hút trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được rửa bằng 2 L nước đá, và sau đó bổ sung dung môi hỗn hợp gồm axetonitril/toluen (tỷ lệ thể tích/thể tích của axetonitril: toluen = 1:1) cho đến khi hòa tan hoàn toàn. Dung môi được loại bỏ bằng cách bay hơi để thu được 130,0 g sản phẩm GAL-2 ở dạng chất rắn màu trắng.

(1-1-1b) Tổng hợp GAL-3

GAL-2 (35,1 g, 90,0 mmol) thu được ở bước (1-1-1a) được hòa tan trong 213 ml 1,2-dicloetan khan, mà được bổ sung 24,0 g trimetylsilyl triflometansulfonat (TMSOTf, CAS No.: 27607-77-8, được mua từ Macklin Inc., 108,0 mmol) trong bể nước đá trong điều kiện khí nitơ để phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm.

Dung dịch phản ứng được bổ sung 400 ml diclometan để pha loãng, lọc bằng diatomit, và sau đó bổ sung 1L dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa và khuấy đều. Phân tách pha hữu cơ. Pha nước còn lại được chiết hai lần, mỗi lần 300 ml dicloetan. Các pha hữu cơ được thu gom và lần lượt rửa bằng 300 ml dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa và 300 ml dung dịch nước muối bão hòa. Pha hữu cơ được phân tách và làm khô

bằng natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ bằng cách bay hơi đến khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 26,9 g sản phẩm GAL-3 ở dạng siro nhớt màu vàng nhạt.

(1-1-1c) Tổng hợp GAL-4

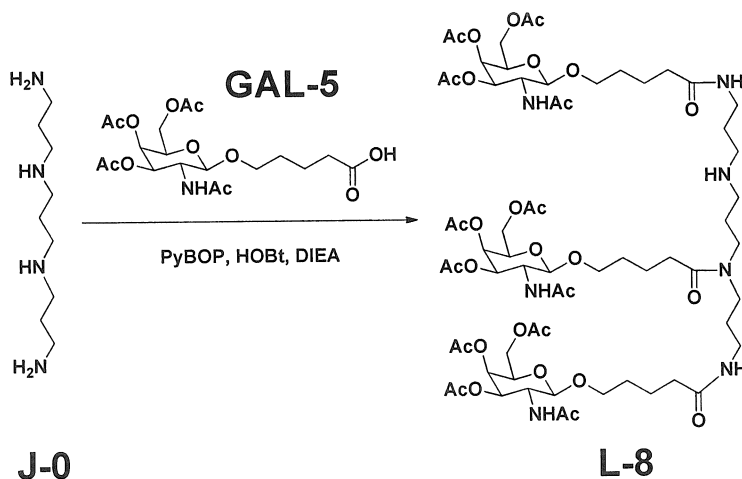
GAL-3 (26,9 g, 81,7 mmol) thu được ở bước (1-1-1b) được hòa tan trong 136 ml 1,2-dicloetan khan, được bổ sung 30 g bột rây phân tử 4Å khô sau đó bổ sung 9,0 g 5-hexen-1-ol (CAS No.: 821-41-0, được mua từ Adamas-beta Inc., 89,9 mmol), và được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. 9,08 g TMSOTf (40,9 mmol) được bổ sung trong bể đá trong điều kiện khí nitơ để phản ứng trong điều kiện khuấy ở nhiệt độ phòng qua đêm. Bột rây phân tử 4Å được loại bỏ bằng cách lọc. Dịch lọc được bổ sung 300 ml dicloetan để pha loãng, lọc bằng diatomit, và sau đó được bổ sung 500 ml dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa và khuấy trong 10 phút để rửa. Phân tách pha hữu cơ. Pha nước được chiết một lần bằng 300 ml dicloetan. Các pha hữu cơ được thu gom và lần lượt rửa bằng 300 ml dung dịch nước natri bicacbonat bão hòa và 300 ml dung dịch nước muối bão hòa. Pha hữu cơ được phân tách và làm khô bằng natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ bằng cách bay hơi đến khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 41,3g sản phẩm GAL-4 ở dạng siro màu vàng, mà được sử dụng trực tiếp trong phản ứng oxy hóa tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

(1-1-1d) Tổng hợp GAL-5

GAL-4 (14,9 g, 34,7 mmol) thu được theo phương pháp được mô tả trong bước (1-1-1c) được hòa tan trong dung môi hỗn hợp chứa 77 ml diclometan và 77 ml axetonitril, lần lượt được bổ sung 103 ml nước khử ion và 29,7 g natri periodat (CAS No.: 7790-28-5, được mua từ Aladdin Inc., 138,8 mmol), và khuấy trong bể đá trong 10 phút. Ruteni trichlorua (CAS No.: 14898-67-0, sẵn có từ Energy Chemical, 238 mg, 1,145 mmol) được bổ sung để phản ứng ở nhiệt độ phòng qua đêm. Dung dịch phản ứng thu được được pha loãng bằng cách bổ sung 300 ml nước trong điều kiện khuấy, và điều chỉnh đến pH bằng khoảng 7,5 bằng cách bổ sung natri bicacbonat bão hòa. Pha hữu cơ được phân tách và loại bỏ. Pha nước được chiết ba lần, mỗi lần bằng 200 ml diclometan, và pha hữu cơ được loại bỏ. Pha nước được điều chỉnh đến độ pH bằng 3 bằng axit xitric dạng rắn và chiết ba lần, mỗi lần bằng 200 ml diclometan, và các pha hữu cơ thu được được thu gom và làm khô bằng natri sulfat khan. Dung môi được loại bỏ bằng cách bay hơi đến khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 6,85 g sản phẩm GAL-5 ở dạng chất rắn có bột

màu trắng. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12,01 (br, 1H), 7,83 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 5,21 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H), 4,96 (dd, $J = 11,2, 3,2$ Hz, 1H), 4,49 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 4,07 – 3,95 (m, 3H), 3,92 – 3,85 (m, 1H), 3,74 – 3,67 (m, 1H), 3,48 – 3,39 (m, 1H), 2,20 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,11 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,90 (s, 3H), 1,77 (s, 3H), 1,55 – 1,45 (m, 4H).

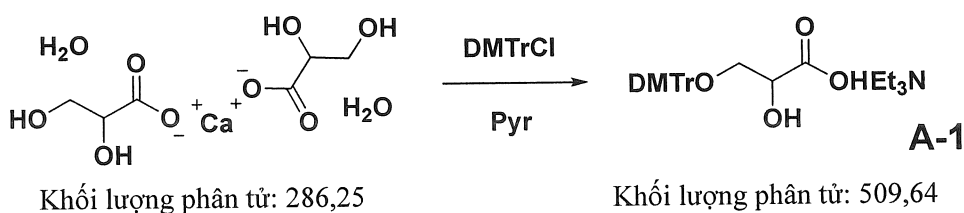
(1-1-2) Tổng hợp L-8



J-0 (9,886 g, 52,5 mmol, được mua từ Alfa Aesar Inc.) và GAL-5 (72,819 g, 162,75 mmol, thu được bằng cách kết hợp một vài mẻ sản phẩm) thu được ở bước (1-1-1) được hòa tan trong 525 ml diclometan, và được bổ sung diisopropyletylamin (DIEA, 44,782 g, 346,50 mmol), benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino phosphoni hexaflorophosphat (PyBOP, 90,158 g, 173,25 mmol) và hydroxybenzotriazol (HOBt, 23,410 g, 173,25mmol) để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được rửa bằng cách bổ sung 20 ml dung dịch natri bicarbonat bão hòa và 200 ml dung dịch nước muối bão hòa. Pha nước được chiết hai lần, mỗi lần bằng 100 ml diclometan. Các pha hữu cơ được thu gom, làm khô bằng natri sulfat khan, và lọc. Sau đó dung môi được loại bỏ bằng cách bay hơi đến khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel pha thường (200-300 mesh). Cột được bổ sung 10% khối lượng trietylamin để trung hòa tính axit của silicagel, làm cân bằng bằng 1% khối lượng trietylamin, và rửa giải bằng dung dịch rửa giải gradient chứa diclometan: metanol = 100:25-100:40. Thu gom nước rửa giải, và dung môi được loại bỏ bằng cách bay hơi đến khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 38,8 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 : $C_{85}H_{119}N_7O_{30}$, $[M+H]^+$, theo tính toán: 1477,59, theo thực tế: 1477,23.

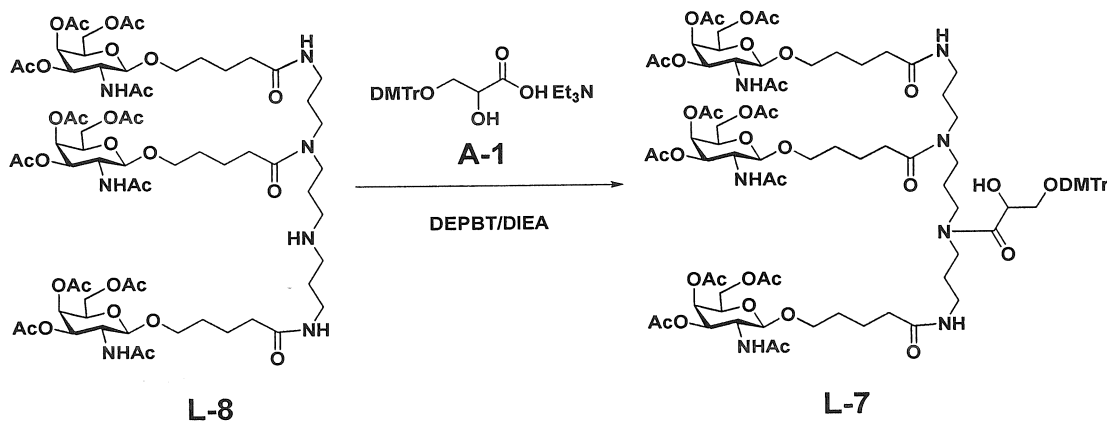
(1-1-3a) Tổng hợp A-1



DMTrCl (4,4'-dimethoxytrityl clorua, 101,65 g, 300 mmol) được hòa tan trong 1000 ml pyridin khan, được bổ sung canxi DL-glyxerat hydrat (28,63 g, 100 mmol) để phản ứng ở nhiệt độ 45°C trong 20 giờ. Dung dịch phản ứng thu được được lọc. Cặn được rửa bằng 200 ml DCM, và dịch lọc được cô đến khô trong điều kiện áp suất giảm. Hòa tan cặn trong 500 ml diclometan và rửa hai lần, mỗi lần rửa bằng 200 ml triethylamin phosphat 0,5 M (pH = 7-8). Pha nước được chiết hai lần, mỗi lần bằng 200 ml diclometan. Các pha hữu cơ được thu gom, làm khô bằng natri sulfat khan, và lọc. Dung môi được loại bằng cách làm bay hơi đến khô trong điều kiện áp suất giảm, cặn được tinh chế bằng cách sử dụng cột silicagel pha thường (200-300 mesh). Cột được rửa giải bằng dung dịch rửa giải gradien chứa ete dầu mỏ: etyl axetat: diclometan: metanol = 1:1:1:0,35 - 1:1:1:0,55. Nước rửa giải được thu gom, và dung môi được loại bằng cách làm bay hơi đến khô trong điều kiện áp suất giảm. Hòa tan cặn trong 600 ml diclometan, và rửa một lần bằng 200 ml triethylamin phosphat 0,5 M. Pha nước được chiết một lần bằng 200 ml diclometan. Các pha hữu cơ được thu gom, làm khô bằng natri sulfat khan, và lọc. Dung môi được loại bằng cách làm bay hơi đến khô trong điều kiện áp suất giảm, cặn được làm khô trong điều kiện áp suất giảm trong bơm dầu chân không qua đêm để thu được 50,7 g sản phẩm A-1 ở dạng chất rắn màu trắng. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) 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, $J = 12,3, 7,0$

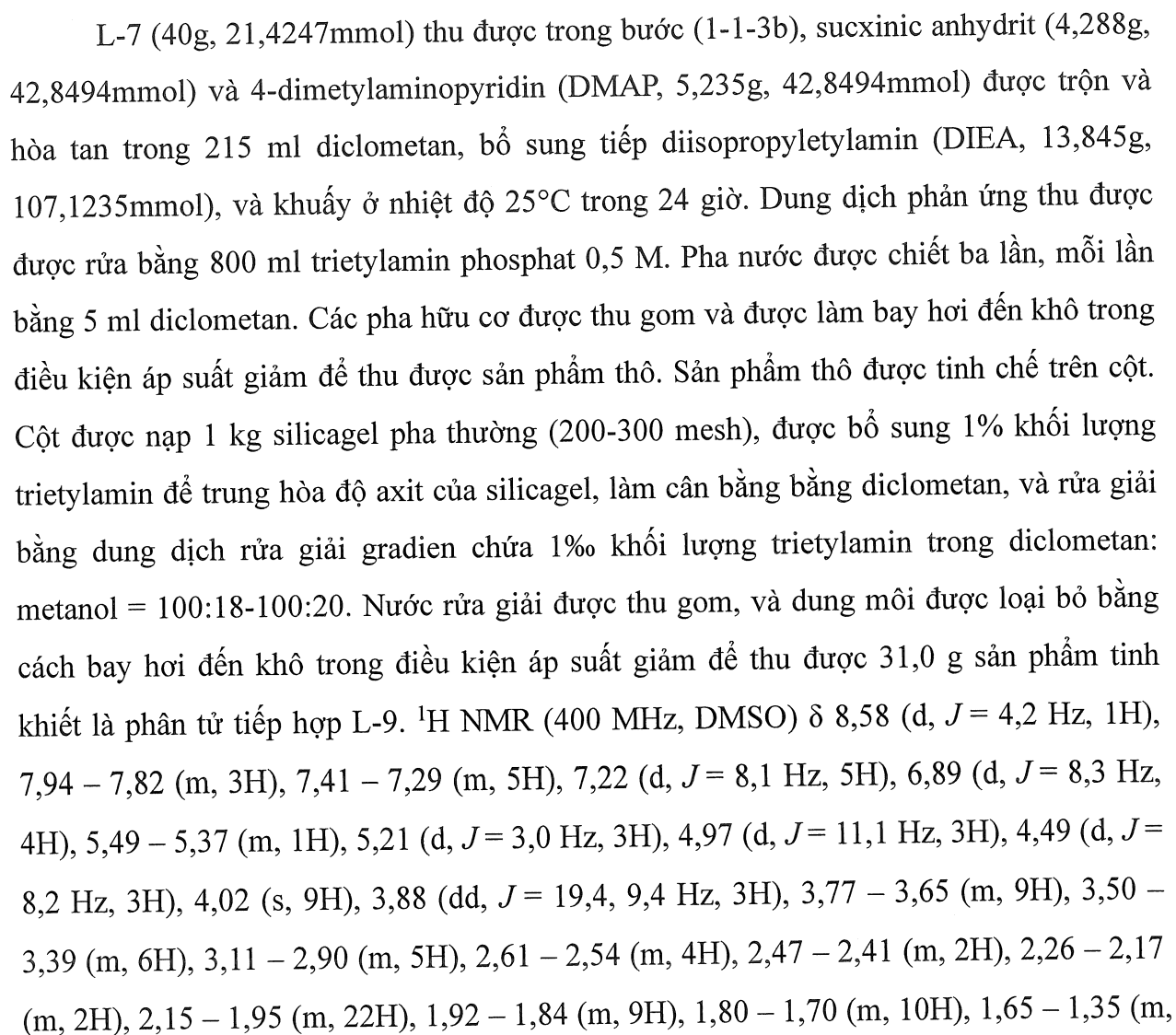
Hz, 1H), 2,52 (q, $J = 6,3$ Hz, 6H), 1,03 (t, $J = 6,3$ Hz, 9H). MS m/z : $C_{24}H_{23}O_6$, $[M-H]^-$, theo tính toán: 407,15, theo thực tế: 406,92.

(1-1-3b) Tổng hợp L-7



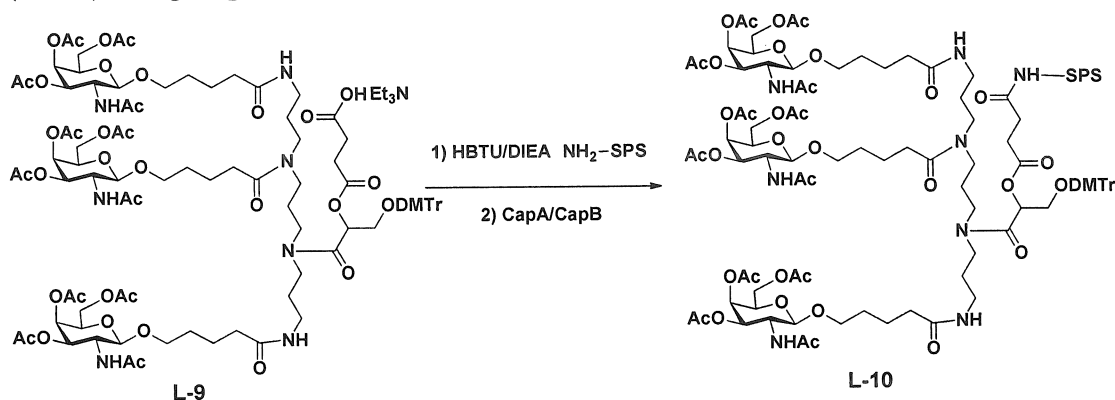
L-8 (40 g, 27,09 mmol, thu được bằng cách gom một vài mẻ sản phẩm) thu được trong bước (1-1-2) và A-1 (41,418 g, 81,27 mmol) thu được ở bước (1-1-3a) được trộn và được hòa tan trong 271 ml diclometan, được bổ sung 3-diethoxyphosphoryl-1,2,3-benzotrizin-4(3H)-on (DEPBT) (24,318 g, 81,37 mmol), được bổ sung tiếp diisopropyletylamin (21,007 g, 162,54 mmol) để phản ứng trong điều kiện khuấy ở nhiệt độ 25°C trong 1,5 giờ. Pha hữu cơ được rửa bằng 800 ml dung dịch natri bicarbonat bão hòa. Pha nước được chiết ba lần, mỗi lần bằng 50 ml diclometan. Pha hữu cơ được rửa bằng 150 ml dung dịch nước muối bão hòa, và pha nước được chiết một lần bằng 50 ml diclometan, và các pha hữu cơ được thu gom, làm khô bằng natri sulfat khan và lọc. Dung môi được loại bằng cách làm bay hơi đến khô trong điều kiện áp suất giảm, và cặn được làm khô bằng bột trong bơm dầu chân không qua đêm để thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế trên cột. Cột được nạp 2 kg silicagel pha thường (200-300 mesh), được bổ sung 200 ml trietylamin để trung hòa tính axit của silicagel, làm cân bằng bằng ete dầu mỏ chứa 1% khối lượng trietylamin, và rửa giải bằng dung dịch rửa giải gradien chứa ete dầu mỏ: etyl axetat: diclometan: N,N-dimetylformamit = 1:1:1:0,5 - 1:1:1:0,6. Thu gom nước rửa giải, và dung môi được loại bỏ bằng cách bay hơi đến khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 40,4 g sản phẩm tinh khiết L-7. 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7,90 – 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 –

(1-1-4) Tổng hợp L-9



17H), 1,31 – 1,19 (m, 4H), 0,96 (t, $J = 7,1$ Hz, 9H). MS m/z : $C_{94}H_{13}N_7O_{38}$, $[M-DMTr]^+$, theo tính toán: 1664,72, theo thực tế: 1665,03.

(1-1-5) 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 thể pha rắn.

Phân tử tiếp hợp L-9 (22,751 g, 11 mmol) thu được trong bước (1-1-4), O-benzotriazol-tetrametyluronium hexaflophosphat (HBTU, 6,257 g, 16,5 mmol) và diisopropyletylamin (DIEA, 2,843 g, 22 mmol) được trộn và hòa tan trong 900 ml axetonitril, và được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Dung dịch phản ứng thu được được bổ sung nhựa aminometyl (H_2N Resin, 88 g, 100-200 mesh, tải lượng amino: 400 $\mu\text{mol/g}$, được mua từ Tianjin Nankai HECHENG S&T Co., Ltd.). Phản ứng được tiến hành trên máy lắc ở nhiệt độ 25°C và ở tốc độ quay là 150 rpm/phút trong 18 giờ, sau đó lọc. Cặn được rửa hai lần (mỗi lần bằng 300 ml DCM) và ba lần (mỗi lần bằng 300 ml axetonitril), và làm khô trong bơm dầu chân không trong 18 giờ. Sau đó các nguyên liệu ban đầu (CapA, CapB, 4-dimethylaminopyridin (DMAP) và axetonitril) được bổ sung theo tỷ lệ nạp như được thể hiện trong bảng 2 để thực hiện phản ứng tạo mũ. Phản ứng được tiến hành trên máy lắc ở nhiệt độ 25°C và ở tốc độ quay bằng 150 rpm/phút trong 5 giờ. Dung dịch phản ứng được lọc. Cặn được rửa ba lần, mỗi lần bằng 300 ml axetonitril. Dung môi được loại bằng cách làm bay hơi đến khô trong điều kiện áp suất giảm, cặn được làm khô trong điều kiện áp suất giảm trong bơm dầu chân không qua đêm để thu được 102 g hợp chất L-10 (tức là, phân tử tiếp hợp L-9 được liên kết với giá thể pha rắn), với lượng tải 90,8 $\mu\text{mol/g}$.

Bảng 2 Tỷ lệ nạp của phản ứng tạo mũ

| Các nguyên liệu ban đầu | Lượng | Loại | Số Lô | Nhà sản xuất |
|-------------------------|-------|------|-------|--------------|
|-------------------------|-------|------|-------|--------------|

| | | | | |
|-------------|---------|---------------------------|-----------|--------------------------|
| CapA | 1980 ml | — | — | — |
| CapB | 220 ml | — | — | — |
| DMAP | 1,100 g | tinh khiết theo phân tích | I1422139 | Aladdin |
| axetonitril | 220 ml | tinh khiết theo quang phổ | O15161001 | CINC (Shanghai) Co., Ltd |

Trong bảng trên, Cap A và Cap B là các dung dịch chất tạo mẫu. Cap A là dung dịch hỗn hợp chứa 20% thể tích của N-metylimidazol trong pyridin/axetonitril, trong đó tỷ lệ thể tích của pyridin so với axetonitril là 3:5. Cap B là dung dịch chứa 20% thể tích của axetic anhydrit trong axetonitril.

(1-2) Tổng hợp mạch có nghĩa của thể tiếp hợp 1

Mạch có nghĩa của thể tiếp hợp siARN 1 trong Bảng 3 được tổng hợp bằng cách liên kết từng monome nucleosit theo hướng 3' đến 5' theo trình tự sắp xếp của các nucleotit trong mạch có nghĩa nhờ phương pháp tổng hợp pha rắn sử dụng phosphoramidit, bắt đầu các chu kỳ từ hợp chất L-10 được điều chế trong bước trên. Việc liên kết mỗi monome nucleosit bao gồm phản ứng bốn bước gồm khử bảo vệ, liên kết, tạo mẫu, và oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa. Trong đó, nếu hai nucleotit được liên kết với nhau thông qua liên kết phosphoeste, thì phản ứng bốn bước gồm khử bảo vệ, liên kết, tạo mẫu và oxy hóa được bao gồm trong quá trình liên kết monome nucleosit sau đó; và khi hai nucleotit được liên kết với nhau thông qua liên kết phosphorothioat, thì phản ứng bốn bước gồm khử bảo vệ, liên kết, tạo mẫu, và lưu huỳnh hóa được bao gồm trong quá trình liên kết monome nucleosit sau đó. Các điều kiện tổng hợp là như sau.

Các monome nucleosit được cung cấp trong dung dịch axetonitril 0,1 M. Điều kiện cho phản ứng khử bảo vệ trong mỗi bước là giống nhau, tức là nhiệt độ bằng 25°C, thời gian phản ứng là 70 giây, dung dịch axit dicloaxetic trong diclometan (3% thể tích/thể tích) làm tác nhân khử bảo vệ, và tỷ lệ mol của axit dicloaxetic so với nhóm bảo vệ 4,4'-dimetoxyltrityl trên giá thể pha rắn là 5:1.

Điều kiện của phản ứng liên kết trong mỗi phản ứng là giống nhau, bao gồm nhiệt độ bằng 25°C, tỷ lệ mol của trình tự axit nucleic được liên kết với giá thể pha rắn so với các monome nucleosit là 1:10, tỷ lệ mol của trình tự axit nucleic được liên kết với giá thể pha rắn so với tác nhân liên kết là 1:65, thời gian phản ứng là 600 giây, và dung dịch axetonitril 0,5 M chứa 5-ethylthio-1H-tetrazol (ETT) làm tác nhân liên kết.

Điều kiện của phản ứng tạo mũ trong mỗi bước là giống nhau, bao gồm nhiệt độ bằng 25°C, thời gian phản ứng là 15 giây, dung dịch hỗn hợp chứa Cap A và Cap B theo tỷ lệ mol là 1:1 làm dung dịch chất tạo mũ, và tỷ lệ mol của chất tạo mũ so với trình tự axit nucleic được liên kết với giá thể pha rắn là 1:1:1 (axetic anhydrit: N-metylimidazol: trình tự axit nucleic được liên kết với giá thể pha rắn).

Điều kiện của phản ứng oxy hóa trong mỗi bước là giống nhau, bao gồm nhiệt độ bằng 25°C, dung dịch phản ứng là 15 giây, và nước iot 0,05 M làm tác nhân oxy hóa; và tỷ lệ mol của iot so với trình tự axit nucleic được liên kết với giá thể pha rắn trong bước liên kết là 30:1. Phản ứng được tiến hành trong dung môi hỗn hợp chứa tetrahydrofuran: nước: pyridin (3:1:1).

Điều kiện của phản ứng lưu huỳnh hóa trong mỗi bước là giống nhau, bao gồm nhiệt độ bằng 25°C, thời gian phản ứng là 300 giây, và xanthan hydrit làm tác nhân lưu huỳnh hóa và tỷ lệ mol của tác nhân lưu huỳnh hóa so với trình tự axit nucleic được liên kết với giá thể pha rắn trong bước liên kết là 120:1. Phản ứng được tiến hành trong dung môi hỗn hợp chứa axetonitril: pyridin (1:1).

Sau khi liên kết monome nucleosit cuối cùng được hoàn tất, trình tự axit nucleic đã liên kết với giá thể pha rắn được phân cắt, khử bảo vệ, tinh chế, loại muối và đông khô để thu được mạch có nghĩa, trong đó,

Điều kiện để phân cắt và khử bảo vệ là như sau: bổ sung trình tự nucleotit được tổng hợp đã liên kết với giá thể vào dung dịch nước amoniac 25% khối lượng để phản ứng ở nhiệt độ 55°C trong 16 giờ, trong đó lượng dung dịch nước amoniac là 0,5 ml/ μ mol. Giá thể còn lại được loại bỏ bằng cách lọc, và dịch nổi được cô đến khô trong chân không.

Điều kiện để tinh chế và loại muối là như sau: tinh chế axit nucleic được tiến hành bằng cách sử dụng cột tinh chế sắc ký ion điều chế (Source 15Q) với dung dịch rửa giải gradien là NaCl. Cụ thể là, chất rửa giải A là natri phosphat 20 mM (pH 8,1), dung môi là nước/axetonitril có tỷ lệ 9:1 (thể tích/thể tích); chất rửa giải B là natri clorua 1,5 M, natri phosphat 20 mM (pH 8,1), dung môi là nước/axetonitril có tỷ lệ 9:1 (thể tích/thể tích); gradien rửa giải: tỷ lệ của chất rửa giải A: chất rửa giải B = 100:0-50:50. Nước giải hấp được thu gom, được gộp lại và khử muối bằng cách sử dụng cột tinh chế sắc ký pha đảo.

Điều kiện cụ thể bao gồm: sử dụng cột Sephadex để loại muối (chất độn: Sephadex G25) và rửa giải bằng nước khử ion.

Phương pháp phát hiện là như sau: độ tinh khiết của mạch có nghĩa nêu trên được xác định bằng sắc ký trao đổi ion (IEX-HPLC); và khối lượng phân tử được phân tích bằng sắc ký lỏng-đo phổ khối (LC-MS). Thực tế là các giá trị đo được là phù hợp với các giá trị tính toán chứng tỏ là mạch có nghĩa SS mà đầu 3' của nó được tiếp hợp với phân tử tiếp hợp L-9 được tổng hợp.

(1-3) Tổng hợp mạch đối nghĩa của thể tiếp hợp 1

Mạch đối nghĩa của thể tiếp hợp 1 trong bảng 3 được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp pha rắn sử dụng phosphoramidit, bắt đầu các chu kỳ từ giá thể pha rắn thông thường (UnyLinker™ đã nạp giá thể rắn NittoPhase®HL, Kinovate Life Sciences Inc.). Các điều kiện phản ứng gồm khử bảo vệ, liên kết, tạo mũ, oxy hóa hoặc lưu huỳnh hóa, phân cắt và khử bảo vệ, và tinh chế và khử muối trong phương pháp tổng hợp pha rắn là giống như các điều kiện được sử dụng để tổng hợp mạch có nghĩa. Sau đó, tiến hành đông khô để thu được mạch đối nghĩa. Độ tinh khiết của mạch đối nghĩa được phát hiện bằng sắc ký trao đổi ion (IEX-HPLC); và khối lượng phân tử được phân tích bằng sắc ký lỏng-đo phổ khối (LC-MS). Kết quả là các giá trị đo được phù hợp với các giá trị tính toán chứng tỏ là mạch đối nghĩa AS có các trình tự đích được tổng hợp.

(1-4) Tổng hợp thể tiếp hợp 1

Đối với thể tiếp hợp 1, mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa lần lượt được hòa tan trong nước để tiêm để thu được dung dịch có nồng độ 40 mg/mL. Hai mạch này được trộn theo tỷ lệ tương đương mol, được gia nhiệt ở nhiệt độ 50°C trong 15 phút, làm nguội ở nhiệt độ trong phòng để tạo ra sản phẩm đã bắt cặp mồi, và sau đó đông khô để thu được bột đông khô. Sau khi thể tiếp hợp được pha loãng đến nồng độ 0,2 mg/mL bằng nước siêu tinh khiết (hệ thống nước siêu tinh khiết Milli-Q ultra, với điện trở suất bằng 18,2MΩ*cm (25°C)), khối lượng phân tử được xác định bằng thiết bị sắc ký lỏng-đo phổ khối (LC-MS) (được mua từ Waters Corp., model: LCT Premier). Thực tế là các giá trị đo được là phù hợp với các giá trị tính toán được chứng tỏ là thể tiếp hợp 1 được tổng hợp là trình tự axit nucleic mạch kép đích được thiết kế với phân tử tiếp hợp L-9. Thể tiếp hợp 1 có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (403). siARN tiếp hợp trong thể

tiếp hợp này có các trình tự của thể tiếp hợp 1 (cũng được gọi là L10-siPCSKa1M1S) như được thể hiện trong Bảng 3.

Ví dụ điều chế 2: Điều chế các thể tiếp hợp 2-7

Các thể tiếp hợp 2-7 như được thể hiện trong bảng 3 được điều chế bằng phương pháp giống như trong ví dụ điều chế 1 ngoại trừ là các trình tự mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa tham gia vào quá trình tổng hợp là các trình tự của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN tiếp hợp trong thể tiếp hợp 2, thể tiếp hợp 3, thể tiếp hợp 4, thể tiếp hợp 5, thể tiếp hợp 6, hoặc thể tiếp hợp 7 như được thể hiện trong Bảng 3. Do đó, lần lượt thu được các thể tiếp hợp 2-7. Khối lượng phân tử của các thể tiếp hợp 2-7 được xác định.

Bảng 3 thể hiện số và các trình tự siARN của các thể tiếp hợp.

Bảng 3: các thể tiếp hợp siARN

| Các thể tiếp hợp | Số | Hướng trình tự 5'-3' | | SEQ ID NO |
|------------------|-----------------|----------------------|---|-----------|
| thể tiếp hợp 1 | L10-siPCSKa1M1S | mạch có nghĩa | AmsAmsGmCmAmAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm | 25 |
| | | mạch đối nghĩa | GmsAfsUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmsGmsGm | 26 |
| thể tiếp hợp 2 | L10-siPCSKb1M1S | mạch có nghĩa | UmsUmsUmGmUmAmGfCfAfUmUmUmUmUmAmUmUmAmAm | 85 |
| | | mạch đối nghĩa | UmsUfsAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmAsAmsCm | 86 |
| thể tiếp hợp 3 | L10-siPCSKc1M1S | mạch có nghĩa | GmsCmsCmUmGmGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAmAm | 145 |
| | | mạch đối nghĩa | UmsUfsCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmsCmsUm | 146 |
| thể tiếp hợp 4 | L10-siPCSKd1M1S | mạch có nghĩa | CmsUmsGmUmUmUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm | 205 |
| | | mạch đối nghĩa | AmsGfsUmUmAmCfAmAmAmAmGmCmAmAfAmAfCmAmGmsGmsUm | 206 |
| thể tiếp hợp 5 | L10-siPCSKe1M1S | mạch có | GmsGmsUmUmUmUmGfUfAfGmCmAmUmUmUmUmUmAmUm | 265 |

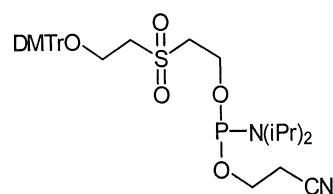
| | | | | |
|-------------------|---------------------|----------------------|--|-----|
| | | nghĩa | m | 266 |
| | | mạch
đối
nghĩa | AmsUfsAmAmAmAfAmUmGm
CmUmAmCmAfAmAfAmCmCm
sCmsAm | |
| thể tiếp hợp
6 | L10-siPCSKf
1M1S | mạch
có
nghĩa | GmsUmsGmAmCmUmUfUfUfU
mAmAmAmAmUmAmAmAmA
m | 325 |
| | | mạch
đối
nghĩa | UmsUfsUmUmAmUfUmUmUm
AmAmAmAmAfGmUfCmAmCm
sCmsAm | 326 |
| thể tiếp hợp
7 | L10-siPCSK
g4M5S | mạch
có
nghĩa | CmsUmsAmGmAmCmCfUmGfU
mdTUmUmGmCmUmUmUmUm
GmUm | 397 |
| | | mạch
đối
nghĩa | AmsCfsAmAfAfAfGmCfAmAfA
mAmCmAfGmGfUmCfUmAmG
msAmsAm | 398 |

Ví dụ điều chế 3: Tổng hợp các trình tự siARN

siARN 1 như được thể hiện trong Bảng 3 được tổng hợp bằng phương pháp giống như trong ví dụ điều chế 1 ngoại trừ là

1) đối với mạch có nghĩa, các chu kỳ được bắt đầu từ giá thể pha rắn thông thường (các giá thể rắn NittoPhase®HL đã nạp UnyLinker™, Kinovate Life Sciences Inc.);

2) đối với mạch đối nghĩa, trình tự của siARN 1 khác với trình tự của mạch đối nghĩa của siARN đã tiếp hợp trong thể tiếp hợp 1 ở chỗ mạch đối nghĩa của siARN 1 có 5'-phosphat ở nucleotit đầu tiên ở đầu 5'. Do đó, trong quá trình tổng hợp mạch đối nghĩa theo phương pháp tổng hợp pha rắn sử dụng phosphoramidit, sau khi liên kết monome nucleosit cuối cùng của mạch đối nghĩa, monome có công thức (CPR-I) (được mua từ Suzhou GenePharma Inc. như Cat#13-2601-XX) được liên kết với đầu 5' của mạch đối nghĩa nhờ phản ứng bốn bước gồm khử bảo vệ, liên kết, tạo mũ, và oxy hóa để tạo thành dạng cải biến 5'-phosphat.



(CPR-I)

Trong quá trình liên kết, các điều kiện khử bảo vệ, liên kết, tạo mũ, oxy hóa, phân cắt và khử bảo vệ, tinh chế và khử muối được sử dụng là giống như các điều kiện được sử dụng để tổng hợp mạch có nghĩa.

siARN 2 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp giống như phương pháp dùng để điều chế siARN 1 ngoại trừ là các trình tự axit nucleic của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN tham gia vào quá trình tổng hợp siARN 2 là các trình tự mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN 2 như được thể hiện trong Bảng 4.

Các siARN 3-6 được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp giống như phương pháp dùng để điều chế siARN 1 ngoại trừ là các trình tự axit nucleic của mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN tham gia vào quá trình tổng hợp là các trình tự mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa của siARN 3, siARN 4, siARN 5 hoặc siARN 6 như được thể hiện trong Bảng 4, trong đó các mạch đối nghĩa của các siARN này có nhóm cải biến 5'-phosphat ở nucleotit đầu tiên ở đầu 5'. Do đó, mạch đối nghĩa có nhóm cải biến 5'-phosphorothioat có thể được tạo ra bằng cách thay thế điều kiện phản ứng oxy hóa bằng điều kiện phản ứng lưu huỳnh hóa trong quá trình liên kết monome CPR-I. Do đó, lần lượt thu được siARN 3, siARN 4, siARN 5 hoặc siARN 6.

Bảng 4 thể hiện các số và các trình tự của các siARN.

Bảng 4: Các trình tự siARN

| siARN | Số | Hướng trình tự 5'-3' | | SEQ ID NO |
|---------|---------------|----------------------|--|-----------|
| siARN 1 | siPCSKa1M1SP | mạch có nghĩa | AmsAmsGmCmAmAmGfCfAfGmAmCmAmUmUmUmAmUmCm | 361 |
| | | mạch đối nghĩa | PGmsAfsUmAmAmAfUmGmUmCmUmGmCmUfUmGfCmUmUmsGmsGm | 362 |
| siARN 2 | siPCSKb1M1SP | mạch có nghĩa | UmsUmsUmGmUmAmGfCfAfUmUmUmUmAmUmUmAmAm | 363 |
| | | mạch đối nghĩa | PUmsUfsAmAmUmAfAmAmAmAmUmGfCmUfAmCmAmAmAmsAmsCm | 364 |
| siARN 3 | siPCSKc1M1SPs | mạch có nghĩa | GmsCmsCmUmGmGmAfGfUfUmUmAmUmUmCmGmGmAmAm | 365 |
| | | mạch đối nghĩa | PsUmsUfsCmCmGmAfAmUmAmAmAmCmUmCfCmAfGmGmCmsCmsUm | 366 |
| siARN 4 | siPCSKd1M1SPs | mạch có nghĩa | CmsUmsGmUmUmUmUfGfCfUmUmUmUmGmUmAmAmCmUm | 367 |

| | | | | |
|---------|-------------------|----------------|--|-----|
| | | mạch đối nghĩa | PsAmsGfsUmUmAmCfAmAmAm
AmGmCmAmAfAmAfCmAmGms
GmsUm | 368 |
| siARN 5 | siPCSKe1M
1SPs | mạch có nghĩa | GmsGmsUmUmUmUmGfUfAfGm
CmAmUmUmUmUmUmAmUm | 369 |
| | | mạch đối nghĩa | PsAmsUfsAmAmAmAfAmUmGm
CmUmAmCmAfAmAfAmCmCmsC
msAm | 370 |
| siARN 6 | siPCSKf1M
1SPs | mạch có nghĩa | GmsUmsGmAmCmUmUfUfUfUm
AmAmAmAmUmAmAmAmAm | 371 |
| | | mạch đối nghĩa | PsUmsUfsUmUmAmUfUmUmUm
AmAmAmAmAfGmUfCmAmCms
CmsAm | 372 |

Ví dụ thử nghiệm 1 Hoạt tính ức chế và tác dụng ngoài đích của siARN trong hệ psiCHECK *in vitro*

Trong ví dụ thử nghiệm này, hoạt tính trên đích và hoạt tính ngoài đích của các siARN theo sáng chế được đánh giá bằng cách phát hiện sự ức chế của mỗi mạch đối nghĩa của các siARN 1-6 đối với sự biểu hiện của plasmit trên đích, và sự ức chế của mỗi mạch có nghĩa, vùng mầm của mạch đối nghĩa hoặc vùng mầm của mạch có nghĩa của các siARN đối với sự biểu hiện của plasmit ngoài đích trong hệ psiCHECK *in vitro*.

Theo phương pháp được mô tả trong tài liệu Kumico Ui-Tei et. Al., Functional dissection of siRNA 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, các plasmit để phát hiện được tạo ra và đồng chuyển nhiễm với siARN cần phát hiện vào các tế bào HEK293A; và mức biểu hiện của gen báo cáo luxiferaza kép phản ánh hoạt tính trên đích và hoạt tính ngoài đích của các siARN. Các bước cụ thể là như sau:

[1] Tạo ra các plasmit để phát hiện

Bốn loại plasmit để phát hiện được tạo ra bằng cách sử dụng plasmit psiCHECK™-2 (Promega™), trong đó GSCM là plasmit trên đích; và PSCM, GSSM và PSSM là các plasmit ngoài đích:

(1) GSCM, được sử dụng để phát hiện hoạt tính trên đích của mạch đối nghĩa của siARN, chứa trình tự đích mà chứa vùng bổ sung hoàn toàn với trình tự của mạch đối

nghĩa của siARN cần phát hiện, trong đó trình tự đích trong GSCM tương ứng với các siARN 1, 2, 4, 5 và 6 được thể hiện bởi SEQ ID NO: 373:

5'-GGCGTGCCTGCCAAGCTCACACAGCAGGAACTGAGCCAGAAACGCA
GATTGGGCTGGCTCTGAAGCCAAGCCTCTTCTTACTTCACCCGGCTGGGCTCC
TCATTTTTACGGGTAAACAGTGAGGCTGGGAAGGGGAACACAGACCAGGAAGC
TCGGTGAGTGATGGCAGAACGATGCCTGCAGGCATGGAACTTTTTCCGTTATC
ACCCAGGCCTGATTCACTGGCCTGGCGGAGATGCTTCTAAGGCATGGTCGGGG
GAGAGGGCCAACAACACTGTCCCTCCTTGAGCACCAGCCCCACCCAAGCAAGCA
GACATTTATCTTTTGGGTCTGTCCTCTCTGTTGCCTTTTTACAGCCAACCTTTCT
AGACCTGTTTTGCTTTTGTAACCTGAAGATATTTATTCTGGGTTTTGTAGCATTT
TTATTAATATGGTGACTTTTTTAAAATAAAAACAAACAAACGTTGTCCTAACAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'(SEQ ID NO: 373);

và trình tự đích trong GSCM tương ứng với siARN 3 được thể hiện trong SEQ ID NO: 374:

5'-GCGTGGCCAAGGGTGCCAGCATGCGCAGCCTGCGCGTGCTCAACTG
CCAAGGGAAGGGCACGGTTAGCGGCACCCTCATAGGCCTGGAGTTTATTTCGG
AAAAGCCAGCTGGTCCAGCCTGTGGGGCCACTGGTGGTGCTGCTGCCCCTGG
CGGGTGGGTACAGCCGCGTCCTCAACGCCGCCTGCCAGCGCCTGGCGAGGGC
TGGGGTCGTGCTGGTCAACGCTGCCGGCAACTTCCGGGACGATGCCTGCCTCT
ACTCCCCAGCCTCAGCTCCCGAGGTCATCACAGTTGGGGCCACCAATGCCCAA
GACCAGCCGGTGACCCTGGGGACTTTGGGGACCAACTTTGGCCGCTGTGTGG
ACCTCTTTGCCCCAGGGGAGGACATCATTGGTGCCTCCAGCGACTGCAGCACC
TGCTTTGTGTCACAGAGTGGGACATCACAGGCTGCTGCCACGTGGCTGGCAT
TGCAGCCATGATGCTGTCTGCCGAGCCGGAGCTCACCTGGCCGAGTTGAGG
CAGAGACTGATCCACTTCTCTGCCAAAGATGTCATCAATGAGGCCTGGTTCCC
TGAGGACCAGCGGGTACTG-3'(SEQ ID NO: 374).

(2) PSCM, được sử dụng để phát hiện tác dụng ngoài đích của mạch có nghĩa, chứa trình tự đích mà chính xác là giống như trình tự của mạch đối nghĩa của siARN cần phát hiện, trong đó trình tự đích trong PSCM tương ứng với mỗi siARN được thể hiện trong Bảng 5a:

Bảng 5a Các trình tự đích trong PSCM tương ứng với các siARN

| siARN | Các trình tự đích trong PSCM (hướng trình tự 5'-3') | SEQ ID NO |
|---------|---|-----------|
| siARN 1 | GATAAATGTCTGCTTGCTTGG | 375 |
| siARN 2 | TTAATAAAAATGCTACAAAAC | 376 |
| siARN 3 | TTCCGAATAAACTCCAGGCCT | 377 |
| siARN 4 | AGTTACAAAAGCAAAACAGGT | 378 |
| siARN 5 | ATAAAAATGCTACAAAACCCA | 379 |
| siARN 6 | TTTTATTTTAAAAAGTCACCA | 380 |

(3) GSSM được sử dụng để phát hiện tác dụng ngoài đích của vùng mầm của mạch đối nghĩa, trong đó trình tự đích trong GSSM tương ứng với mỗi siARN được thể hiện trong Bảng 5b:

Bảng 5b Các trình tự đích trong PSCM tương ứng với các siARN

| siARN | Các trình tự đích trong GSSM (hướng trình tự 5'-3') | SEQ ID NO |
|---------|---|-----------|
| siARN 1 | AACCTACCTACTCCATTTATC | 381 |
| siARN 2 | TGGGGTGCTACGGTTTATTAA | 382 |
| siARN 3 | CTTAAGTTCTGGGATTCGGAA | 383 |
| siARN 4 | CAAGTGGGGTAGGTTGTAAC | 384 |
| siARN 5 | GTTTGGGGTGCTAATTTTAT | 385 |
| siARN 6 | GTTGTCAGGGGGCAAATAAAA | 386 |

(4) PSSM được sử dụng để phát hiện tác dụng ngoài đích của vùng mầm của mạch có nghĩa, trong đó trình tự đích trong PSSM tương ứng với mỗi siARN được thể hiện trong Bảng 5c:

Bảng 5c Các trình tự đích trong PSSM tương ứng với các siARN

| siARN | Các trình tự đích trong PSSM (hướng trình tự 5'-3') | SEQ ID NO |
|---------|---|-----------|
| siARN 1 | TCGCCCCGTGAGGCTTGCTTTT | 387 |
| siARN 2 | GGCCGCCCCCGGCTACAAACA | 388 |
| siARN 3 | GGAATCCGCCCCTCCAGGCAG | 389 |
| siARN 4 | CTGGCACCCCTCAAAACAGTG | 390 |
| siARN 5 | CGCCCCCGTAGACAAAACCAC | 391 |
| siARN 6 | GGGGCGGGGCCAAAGTCACAC | 392 |

Bản sao đơn của các trình tự đích nêu trên được tách dòng vào vị trí Xho I/Not I của plasmit psiCHECKTM-2 tương ứng.

[2] Chuyển nhiễm và nuôi cấy tế bào

(1) Đồng chuyển nhiễm GSCM và siARN 1

Các tế bào HEK293A (được mua từ Nanjing Cobioer Biosciences Co., LTD) được nuôi cấy trong môi trường đầy đủ H-DMEM (công ty Hyclone) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (FBS, công ty Hyclone), và 0,2% thể tích Penixilin-Streptomycin (công ty Hyclone) ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ chứa 5% CO₂/95% không khí.

Các tế bào HEK293A được cấy vào đĩa có 96 lỗ ở mật độ 8×10^3 tế bào/lỗ. Sau 16 giờ, mật độ phát triển tế bào đạt tới mức nằm trong khoảng từ 70 đến 80%. Tại thời điểm đó, môi trường đầy đủ H-DMEM trong các lỗ nuôi cấy được hút ra. 80 µl môi trường Opti-MEM (công ty GIBCO) được bổ sung vào mỗi lỗ và tiếp tục nuôi cấy trong 1,5 giờ.

Các plasmit phát hiện GSCM được pha loãng bằng nước DEPC để thu được dung dịch làm việc chứa plasmit phát hiện có nồng độ 200 ng/µl; siARN 1 được chuẩn bị với nước DEPC trong dung dịch làm việc chứa siARN ở 11 nồng độ khác nhau gồm 1000 nM, 333 nM, 111 nM, 37,0 nM, 12,3 nM, 4,12 nM, 1,37 nM, 0,46 nM, 0,15 nM, 0,05 nM và 0,017 nM, tương ứng.

Các dung dịch A1-A11 lần lượt được chuẩn bị. Mỗi phần của các dung dịch A1-A11 chứa, lần lượt, 1 µl dung dịch làm việc chứa siARN ở mỗi trong số 11 nồng độ nêu trên, 0,05 µl dung dịch làm việc chứa plasmit phát hiện (chứa 10 ng plasmit phát hiện) và 10 µl môi trường Opti-MEM.

Các dung dịch B được chuẩn bị. Mỗi phần dung dịch B chứa 0,2 µl Lipofectamin™ 2000 và 10 µl môi trường Opti-MEM.

Dung dịch C được chuẩn bị. Mỗi phần dung dịch C chứa 0,05 µl dung dịch làm việc chứa plasmit phát hiện (chứa 10 ng plasmit phát hiện) và 10 µl môi trường Opti-MEM.

Một phần dung dịch B sau đó lần lượt được trộn với một phần của mỗi dung dịch trong số các dung dịch A1-A11 và một phần dung dịch C. Các hỗn hợp được ủ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng để thu được 12 phức hợp chuyển nhiễm X1-X12. Mỗi phức hợp chuyển nhiễm được chuẩn bị ba lần.

Các phức hợp chuyển nhiễm X1-X11 lần lượt được bổ sung vào các lỗ nuôi cấy với lượng 20 µl/lỗ và được trộn đều, và ba phần nhỏ của phức hợp chuyển nhiễm ở cùng nồng độ siARN lần lượt được bổ sung vào ba lỗ nuôi cấy để thu được các hỗn hợp đồng chuyển nhiễm ở các nồng độ siARN cuối bằng 10 nM, 3,33 nM, 1,11 nM, 0,37 nM, 0,123

nM, 0,0412 nM, 0,0137 nM, 0,0046 nM, 0,0015 nM, 0,0005 nM và 0,00017 nM (được ghi lại dưới dạng các nhóm thử nghiệm 1-11).

Các phức hợp chuyển nhiễm X12 lần lượt được bổ sung vào ba lỗ nuôi cấy khác với lượng 20 μ l/lỗ để thu được các hỗn hợp chuyển nhiễm mà không chứa siARN (được ghi lại dưới dạng các nhóm đối chứng).

Sau khi các hỗn hợp đồng chuyển nhiễm chứa siARN và các hỗn hợp chuyển nhiễm không chứa siARN được chuyển nhiễm trong các lỗ nuôi cấy trong 4 giờ, mỗi lỗ được bổ sung 100 μ l môi trường đầy đủ H-DMEM chứa 20% FBS. Đĩa có 96 lỗ được đặt trong tủ ủ CO₂ và tiếp tục ủ trong 24 giờ.

(2) Đồng chuyển nhiễm các plasmit và các siARN khác.

GSCM và các siARN 2-6 được đồng chuyển nhiễm theo cách giống như GSCM và siARN 1, ngoại trừ là siARN1 lần lượt được thay thế bằng các siARN 2-6.

PSCM và các siARN 1-6 được đồng chuyển nhiễm theo cách giống như GSCM và các siARN 1-6, ngoại trừ là GSCM lần lượt được thay thế bằng PSCM.

GSSM và các siARN 1-6 được đồng chuyển nhiễm theo cách giống như GSCM và các siARN 1-6, ngoại trừ là GSCM lần lượt được thay thế bằng GSSM.

PSSM và các siARN 1-6 được đồng chuyển nhiễm theo cách giống như GSCM và các siARN 1-6, ngoại trừ là GSCM lần lượt được thay thế bằng PSSM.

[3] Phát hiện

Môi trường trong các lỗ nuôi cấy được hút ra. 150 μ l dung dịch hỗn hợp chứa tác nhân phản ứng Dual-Glo[®] Luciferaza và H-DMEM (có tỷ lệ thể tích 1:1) được bổ sung vào mỗi lỗ, và được trộn kỹ. Sau khi tiến hành ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, 120 μ l dung dịch hỗn hợp được chuyển nhiễm vào đĩa ELISA có 96 lỗ. Giá trị phát quang hóa học của Firefly (Fir) trong mỗi lỗ của đĩa ELISA được đọc bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa đa chế độ Synergy II (BioTek company). Sau đó, 60 μ l tác nhân phản ứng Dual-Glo[®] Stop & Glo[®] được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa ELISA, và được trộn kỹ. Sau khi tiến hành ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, giá trị phát quang hóa học của *Renilla* (Ren) trong mỗi lỗ của đĩa ELISA được đọc bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa theo cách sắp xếp để đọc Fir.

Tỷ lệ phát quang (tỷ lệ = Ren/Fir) của mỗi lỗ của đĩa ELISA được tính toán, và tỷ lệ phát quang (tỷ lệ (thử nghiệm) hoặc tỷ lệ (đối chứng)) của mỗi nhóm thử nghiệm hoặc

nhóm đối chứng là trung bình của các tỷ lệ của ba lỗ nuôi cấy. Sử dụng tỷ lệ phát quang của nhóm đối chứng để tham khảo, tỷ lệ phát quang của mỗi nhóm thử nghiệm được chuẩn hóa để thu được tỷ lệ R của tỷ lệ (thử nghiệm)/tỷ lệ (đối chứng), mà là mức biểu hiện, tức là, hoạt tính còn lại tương đối của gen báo cáo *Renilla*. Tỷ lệ ức chế của siARN là $(1-R) \times 100\%$.

Log (chất ức chế) so với đường cong đáp ứng-liều biến thiên (bốn thông số)-hiệu quả được khớp bằng cách sử dụng phân tích hồi quy không tuyến tính của phần mềm Graphpad 5.0, theo các hoạt tính dư tương đối của gen báo cáo *Renilla* trong hệ psiCHECK sau khi chuyển nhiễm các siARN khác nhau (siARN 1, siARN 2, siARN 3, siARN 4, siARN 5 hoặc siARN 6). Fig.1A-1F thể hiện các đường cong liều-hiệu quả của các siARN 1-6 tương ứng, trong đó trục hoành là logarit nồng độ của các siARN (lg nM), trục tung là hoạt tính còn lại tương đối (%) của *Renilla*, và mỗi chấm là giá trị trung bình của các hoạt tính còn lại tương đối của *Renilla* trong ba lỗ nuôi cấy của nhóm thử nghiệm so với nhóm đối chứng.

Giá trị IC₅₀ của siARN cần thử nghiệm hướng đích GSCM được tính toán dựa trên hàm số tương ứng với đường cong liều-hiệu quả được khớp. Hàm số này là như sau:

$$Y = \text{Bot} + \frac{\text{Top} - \text{Bot}}{1 + 10^{(X - X') \times \text{Hill Slope}}}$$

trong đó:

Y là tỷ lệ R, tức là, hoạt tính còn lại tương đối (%) của *Renilla*,

X là logarit của nồng độ của các siARN đã chuyển nhiễm,

Bot là giá trị Y ở đáy của giai đoạn ở trạng thái ổn định,

Top là giá trị Y ở đỉnh của giai đoạn ở trạng thái ổn định,

X' là giá trị X mà tại đó Y là giá trị trung bình giữa giá trị đáy và giá trị đỉnh, và độ dốc Hill là độ dốc của đường cong tại X'.

Khi Y=50%, giá trị X₅₀ tương ứng được xác định dựa trên đường cong liều-hiệu quả và hàm số tương ứng. Giá trị IC₅₀ của mỗi siARN được tính toán (giá trị IC₅₀=10^{X₅₀} (nM)). Các giá trị IC₅₀ và các giá trị R² được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6 các giá trị IC₅₀ và R² của các siARN đối với GSCM

| siARN | Số | IC ₅₀ | R ² |
|-------|----|------------------|----------------|
|-------|----|------------------|----------------|

| | | | |
|---------|---------------|-----------|--------|
| siARN 1 | siPCSKa1M1SP | 0,0544nM | 0,9993 |
| siARN 2 | siPCSKb1M1SP | 0,0291 nM | 0,9979 |
| siARN 3 | siPCSKc1M1SPs | 0,0341 nM | 0,9995 |
| siARN 4 | siPCSKd1M1SPs | 0,0194 nM | 0,9974 |
| siARN 5 | siPCSKe1M1SPs | 0,0561 nM | 0,9956 |
| siARN 6 | siPCSKf1M1SPs | 0,0400 nM | 0,9927 |

Bảng 6 và Fig.1A-1F chỉ ra rằng các siARN theo sáng chế thể hiện hoạt tính ức chế tương đối cao ở các tế bào HEK293A *in vitro*, trong đó các giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng từ 0,0194 nM đến 0,0561 nM.

Các đường cong liều-hiệu quả của các siARN 1-6 đối với PSCM, GSSM và PSSM tương ứng của chúng được tạo ra lần lượt bằng cách sử dụng phương pháp giống như trên ngoại trừ là GSCM được thay thế bằng PSCM, GSSM và PSSM tương ứng. Các kết quả chỉ ra rằng mỗi siARN ở mỗi nồng độ không có tác dụng ức chế trên các plasmit PSCM, GSSM và PSSM ngoài đích tương ứng của nó.

Các kết quả trên đây chỉ ra rằng các siARN theo sáng chế có hoạt tính hướng đích tốt, và không mạch nào trong số mạch có nghĩa, vùng mầm của mạch đối nghĩa và vùng mầm của mạch có nghĩa có tác dụng ngoài đích rõ ràng.

Ví dụ thử nghiệm 2: Đánh giá hiệu quả của các thể tiếp hợp siARN ở động vật linh trưởng không phải người (non-human primate-NHP)

Khỉ cynomolgus thông thường (cân nặng 2,4-3,1 kg) có độ tuổi từ 3 đến 4 năm được chia thành hai nhóm theo cân nặng của chúng. Mỗi nhóm gồm 4 con khỉ cynomolgus, một nửa trong số chúng là đực, được tiêm một mũi dưới da thể tiếp hợp 4 hoặc 5 tương ứng.

Khỉ cynomolgus thông thường (cân nặng 4,0-5,5 kg) có độ tuổi từ 4 đến 5 năm được chia thành ba nhóm theo cân nặng của chúng. Mỗi nhóm gồm 3 con khỉ cynomolgus, toàn bộ trong số chúng là đực, được tiêm một mũi dưới da thể tiếp hợp 1, 2 hoặc 7 tương ứng.

Mỗi thể tiếp hợp được chuẩn bị với dung dịch tiêm natri clorua vô trùng thành dung dịch có nồng độ 9 mg/ml (dựa trên siARN; điều này được áp dụng tương tự dưới

đây). Thẻ tích được sử dụng cho mỗi con là 1ml/kg, và liều dùng là 9 mg/kg. n ngày trước khi sử dụng được xác định là D-n, ngày sử dụng được xác định là D1, và ngày thứ n sau khi sử dụng được xác định là Dn.

(2-1) Phát hiện mARN PCSK9 trong mô gan

Vào ngày D-7 và D15, tiến hành chọc gan tương ứng trên các con khi mà đã được cho sử dụng thẻ tiếp hợp 1, thẻ tiếp hợp 2, thẻ tiếp hợp 4, thẻ tiếp hợp 5 hoặc thẻ tiếp hợp 7 ở mỗi nhóm. Mỗi lần chọc, thu lấy mô gan có kích thước khoảng $2 \times 2 \times 8 \text{ mm}^3$, và lưu trữ trong ống EP vô trùng có dung tích 1,5mL chứa 1ml dung dịch bảo quản ARN sau đó (công ty Sigma Aldrich). Sau khi đặt trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C trong 24 giờ, mô gan được chuyển sang bước đông lạnh ở nhiệt độ -80°C để bảo quản.

Sau đó, mô gan được làm đồng nhất bằng thiết bị đồng nhất mô. Tiếp đó tổng lượng ARN trong mô gan được chiết và thu được bằng Trizol (công ty Thermo Fisher) theo các quy trình chiết ARN tổng số trong hướng dẫn sử dụng.

Đối với ARN tổng số được chiết ra từ mô gan của mỗi con khi, 1 μg ARN tổng số được lấy ra làm khuôn mẫu để phiên mã ngược, và tác nhân phản ứng được cung cấp trong kit phiên mã ngược Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit (được mua từ Beijing Tsingke Biotechnology Co., Ltd., Cat No. TSK301M), trong đó Goldenstar™ Oligo (dT)₁₇ được chọn làm đoạn mồi, được sử dụng để tạo ra 20 μl hệ phản ứng phiên mã ngược theo các quy trình của quá trình phiên mã ngược trong hướng dẫn sử dụng kit. ARN tổng số của mỗi mô gan nêu trên được phiên mã ngược. Các điều kiện để tiến hành phiên mã ngược là như sau: mỗi hệ phản ứng phiên mã ngược được đặt và ủ ở nhiệt độ 50°C trong 50 phút, sau đó ủ ở nhiệt độ 85°C trong 5 phút, và cuối cùng ủ ở nhiệt độ 4°C trong 30 giây; sau khi phản ứng kết thúc, 80 μl nước DEPC được bổ sung vào mỗi hệ phản ứng phiên mã ngược để thu được dung dịch chứa cADN.

Đối với mỗi hệ phản ứng phiên mã ngược, 5 μl dung dịch chứa cADN nêu trên được lấy ra làm khuôn mẫu để thực hiện phản ứng qPCR, và tác nhân phản ứng được cung cấp trong kit NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus (được mua từ Novoprotein Scientific Co., Ltd., Cat No. E096-01B) được sử dụng để tạo ra 20 μl hệ phản ứng qPCR, trong đó các trình tự của các đoạn mồi PCR được sử dụng để khuếch đại gen đích PCSK9 và gen đối chứng nội được thể hiện trong bảng 7, và nồng độ cuối của mỗi đoạn mồi là 0,25 μM . Mỗi hệ phản ứng qPCR được đặt trên thiết bị PCR thời gian thực ABI

StepOnePlus, và được khuếch đại bằng cách sử dụng phương pháp ba bước. Các quy trình khuếch đại bao gồm làm biến tính sơ bộ ở nhiệt độ 95°C trong 10 phút, biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, và bắt cặp mồi ở nhiệt độ 60°C trong 30 giây, sau đó kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây. Sau khi lặp lại quy trình nêu trên gồm biến tính, bắt cặp mồi, và kéo dài 40 lần, thu được sản phẩm W chứa gen đích đã khuếch đại PCSK9 và gen đối chứng nội đã khuếch đại GAPDH. Sản phẩm W sau đó được ủ ở nhiệt độ 95°C trong 15 giây, 60°C trong 1 phút, và 95°C trong 15 giây. Đường cong nóng chảy của gen đích PCSK9 và gen đối chứng nội GAPDH trong sản phẩm W lần lượt được thu gom bằng thiết bị PCR định lượng huỳnh quang thời gian thực, và thu được các giá trị Ct của gen đích PCSK9 và gen đối chứng nội GAPDH.

Bảng 7 Trình tự của các đoạn mồi

| Các gen | Các đoạn mồi ngược (theo hướng 5' đến 3') | Các đoạn mồi xuôi (theo hướng 5' đến 3') |
|---------------|---|--|
| PCSK9 của khi | GAAGGGGAACACAGACCAGG(SEQ ID NO: 393) | CTCCATCAGGCCACAGTGAA(SEQ ID NO: 394) |
| GAPDH của khi | GGGAGCCAAAAGGGTCATCA(SEQ ID NO: 395) | CGTGGACTGTGGTCATGAGT(SEQ ID NO: 396) |

Tính toán định lượng tương đối mức biểu hiện của gen đích PCSK9 vào ngày D15 và D-7 được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp so sánh Ct ($\Delta\Delta Ct$). Phương pháp tính toán là như sau:

$$\Delta Ct (D15) = Ct (\text{gen đích vào ngày D15}) - Ct (\text{gen đối chứng nội vào ngày D15})$$

$$\Delta Ct (D-7) = Ct (\text{gen đích vào ngày D-7}) - Ct (\text{gen đối chứng nội vào ngày D-7})$$

$$\Delta\Delta Ct (D15) = \Delta Ct (D15) - \Delta Ct (\text{giá trị trung bình vào ngày D-7})$$

$$\Delta\Delta Ct (D-7) = \Delta Ct (D-7) - \Delta Ct (\text{giá trị trung bình vào ngày D-7})$$

trong đó ΔCt (giá trị trung bình vào ngày D-7) là giá trị trung bình số học của ΔCt (D-7) của mỗi con khi trước khi sử dụng. Do đó, mỗi con tương ứng với $\Delta\Delta Ct$ (D15) và $\Delta\Delta Ct$ (D-7).

Mức biểu hiện của mARN PCSK9 vào ngày D15 ở khi được chuẩn hóa dựa trên giá trị thu được vào ngày D-7 của con khi này, trong đó mức biểu hiện của mARN PCSK9 vào ngày D-7 được xác định là 100%;

$$\text{mức biểu hiện tương đối của mARN PCSK9} = 2^{(-\Delta\Delta Ct(D15))} \times 100\%;$$

$$\text{Tỷ lệ ức chế của thể tiếp hợp chống lại mARN PCSK9} = (1 - 2^{(-\Delta\Delta Ct(D15))}) \times 100\%.$$

Đối với nhóm mà các con khi được cho dùng cùng một thể tiếp hợp, thì tỷ lệ ức chế của thể tiếp hợp chống lại mARN PCSK9 là trung bình số học của các tỷ lệ ức chế ở tất cả các con trong nhóm này.

Bảng 8 thể hiện tỷ lệ ức chế của mỗi thể tiếp hợp chống lại mARN PCSK9 gan.

Bảng 8 Tỷ lệ ức chế của các thể tiếp hợp chống lại mARN PCSK9

| Các thể tiếp hợp | Số | Tỷ lệ ức chế % |
|------------------|-----------------|----------------|
| thể tiếp hợp 1 | L10-siPCSKa1M1S | 79 ± 4 |
| thể tiếp hợp 2 | L10-siPCSKb1M1S | 68 ± 11 |
| thể tiếp hợp 4 | L10-siPCSKd1M1S | 81 ± 6 |
| thể tiếp hợp 5 | L10-siPCSKe1M1S | 65 ± 18 |
| thể tiếp hợp 7 | L10-siPCSKg4M5S | 56 ± 22 |

Như có thể thấy từ Bảng 8, sau khi sử dụng một liều 9 mg/kg, toàn bộ các thể tiếp hợp siARN đều thể hiện tỷ lệ ức chế lớn hơn 56% đối với mARN PCSK9 vào ngày 15 sau khi sử dụng so với ngày thứ 7 trước khi sử dụng, trong đó thể tiếp hợp 1 và thể tiếp hợp 4 đều thể hiện tỷ lệ ức chế lên đến 79% và 81% đối với mARN PCSK9 trong mô gan NHP tương ứng.

(2-2) Phát hiện lượng protein PCSK9 trong huyết thanh

Đối với NHP mà được cho sử dụng thể tiếp hợp 4, tiến hành lấy máu ở tĩnh mạch vào ngày D-15, và D-9 và D1 tương ứng trước khi sử dụng, và tiến hành lấy máu ở tĩnh mạch vào ngày D3, D8, D14, D22, và D29 tương ứng sau khi sử dụng. Tiến hành lấy máu hàng tuần sau đó trong 18 tuần cho đến ngày D127.

Đối với NHP mà được cho dùng thể tiếp hợp 1 hoặc 7, tiến hành lấy máu ở tĩnh mạch vào ngày D-14, và D-7 và D1 tương ứng trước khi sử dụng, và tiến hành lấy máu ở tĩnh mạch vào các ngày D4, D8, D15, D22, và D29 tương ứng sau khi sử dụng. Tiến hành lấy máu hàng tuần sau đó trong 12 tuần cho đến ngày D85.

Huyết thanh được tách ra mỗi mẫu trong số các mẫu máu được lấy ở nhiệt độ phòng.

(2-2-1) Phát hiện lượng protein PCSK9 trong huyết thanh của khỉ cynomolgus mà được cho sử dụng thể tiếp hợp 4.

Huyết thanh được thu gom vào các ngày D-9, D8, D14, D85, D92, D99, D106 và D120 sau khi sử dụng thể tiếp hợp 4 được chọn, và huyết thanh nêu trên thu được ở mỗi thời điểm được pha loãng 25 lần bằng tác nhân phản ứng hiệu chỉnh pha loãng RD5P (tỷ lệ pha loãng 1:5) trong kit Human Proprotein Convertase 9/PCSK9 Quantikine ELISA (công ty R&D Systems, U.S., Cat No. DPC900), và mức hấp thụ của mỗi huyết thanh đã pha loãng ở bước sóng 450 nm được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa tự động hoàn toàn (công ty SYNERGY™ MX, Biotek) theo các quy trình nêu trong hướng dẫn sử dụng kit. Theo mỗi nồng độ pha loãng của mẫu chuẩn trong kit và giá trị hấp thụ tương ứng của nó, đường cong chuẩn được lập đồ thị bằng cách sử dụng hàm hồi quy tuyến tính trong phần mềm Graphpad 5.0, và thu được phương trình tuyến tính tương ứng: $Y = aX + b$, trong đó a là độ dốc của đường thẳng đã khớp, và b là giá trị Y tương ứng (giao điểm) khi $X = 0$. Lượng protein PCSK9 trong huyết thanh đã pha loãng có thể được tính toán bằng cách đưa giá trị hấp thụ đo được của mỗi huyết thanh đã pha loãng vào phương trình nêu trên. Lượng protein PCSK9 trong huyết thanh thu được ở mỗi thời điểm có thể thu được theo các lần pha loãng.

Lượng protein PCSK9 đã chuẩn hóa = (lượng protein PCSK9 sau khi sử dụng/lượng protein PCSK9 trước khi sử dụng)

Tỷ lệ ức chế đối với mức biểu hiện của protein PCSK9 = $(1 - \text{lượng protein PCSK9 sau khi sử dụng} / \text{lượng protein PCSK9 trước khi sử dụng}) \times 100\%$;

trong đó lượng protein PCSK9 trước khi sử dụng là lượng protein PCSK9 vào ngày D-9.

Lượng protein PCSK9 ở mỗi thời điểm sau khi sử dụng được chuẩn hóa dựa trên lượng protein PCSK9 trước khi sử dụng; lượng protein PCSK9 trước khi sử dụng được xác định là 100%, và được thể hiện là D0 trên Fig.2; sau khi khỉ cynomolgus được tiêm dưới da một liều đơn 9 mg/kg thể tiếp hợp 4, lượng protein PCSK9 được chuẩn hóa trong huyết thanh ở các thời điểm khác nhau được thể hiện trên Fig.2.

(2-2-2) Phát hiện lượng protein PCSK9 trong huyết thanh của khỉ cynomolgus mà được cho sử dụng thể tiếp hợp 1 hoặc thể tiếp hợp 7

Lượng protein PCSK9 trong huyết thanh của khỉ cynomolgus mà được cho dùng thể tiếp hợp 1 hoặc 7 được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp giống như trong mục (2-2-1) ngoại trừ là (1) huyết thanh của D-14, D-7, D8, D15, D22, D29, D36, D43,

D50, D57, D64 và D85 được chọn; và (2) lượng protein PCSK9 trước khi sử dụng là giá trị trung bình số học của hai lượng protein PCSK9 vào ngày D-14 và D-7. Sau khi cynomolgus được tiêm một liều dưới da 9mg/kg thể tiếp hợp 1 hoặc 7, lượng protein PCSK9 đã chuẩn hóa trong huyết thanh thu được ở các thời điểm khác nhau được thể hiện trên Fig.2.

Như có thể thấy từ Fig.2, vào ngày 14 sau khi sử dụng một liều, thể tiếp hợp 4 cho thấy tỷ lệ ức chế là lớn hơn 90% đối với mức biểu hiện của protein PCSK9 trong huyết thanh của NHP, và duy trì tỷ lệ ức chế lớn hơn 50% đối với mức biểu hiện protein PCSK9 cho đến tuần 12 sau khi sử dụng.

Đối với thể tiếp hợp 7, vào ngày 22 sau khi sử dụng một liều, đã cho thấy tỷ lệ ức chế là 82% đối với mức biểu hiện của protein PCSK9 trong huyết thanh của NHP, và duy trì tỷ lệ ức chế lớn hơn 66% đối với mức biểu hiện của protein PCSK9 cho đến tuần thứ 9 sau khi sử dụng.

Đối với thể tiếp hợp 1, vào ngày 15 sau khi sử dụng một liều, đã cho thấy tỷ lệ ức chế là 83% đối với mức biểu hiện của protein PCSK9 trong huyết thanh của NHP, và duy trì tỷ lệ ức chế lớn hơn 65% đối với mức biểu hiện của protein PCSK9 cho đến tuần thứ 7 sau khi sử dụng.

(2-3) Phát hiện lượng lipid máu (LDL-c và CHO) trong huyết thanh

(2-3-1) Phát hiện lượng lipid máu (LDL-c và CHO) trong huyết thanh của cynomolgus mà được cho dùng thể tiếp hợp 4

Huyết thanh thu được ở mỗi thời điểm sau khi sử dụng thể tiếp hợp 4 nêu ở mục (2-2) được chọn, và lượng lipid máu (LDL-c hoặc CHO) trong huyết thanh thu được ở mỗi thời điểm được đo bằng thiết bị phân tích hóa sinh tự động hoàn toàn (Hitachi 7060) sử dụng kit thử nghiệm LDL-C (DENUO CH7538, Shanghai Zhicheng Biotechnology Co., Ltd.) hoặc kit thử nghiệm CHOL (DENUO CH7532, Shanghai Zhicheng Biotechnology Co., Ltd.) theo các quy trình nêu trong hướng dẫn sử dụng.

Lượng lipid máu chuẩn hóa = (lượng lipid máu sau khi sử dụng/lượng lipid máu trước khi sử dụng) $\times$ 100%.

Tỷ lệ ức chế so với lipid máu = (1 - lượng lipid máu sau khi sử dụng/lượng lipid máu trước khi sử dụng) $\times$ 100%.

Trong đó, lượng lipit máu trước khi sử dụng là giá trị trung bình số học của ba lượng lipit máu vào các ngày D-15, D-9 và D1 trước khi sử dụng; và lượng lipit máu được dùng để chỉ LDL-c hoặc CHO.

Lượng lipit máu ở mỗi thời điểm sau khi sử dụng được chuẩn hóa dựa trên lượng lipit máu trước khi sử dụng; lượng lipit máu trước khi sử dụng được xác định là 100%, và được thể hiện là D0 trên Fig.3 và Fig.4.

Sau khi khỉ cynomolgus được tiêm một liều dưới da 9 mg/kg thể tiếp hợp 4, lượng LDL-c đã chuẩn hóa và lượng CHO đã chuẩn hóa trong huyết thanh ở các thời điểm khác nhau được thể hiện trên Fig.3 và Fig.4 tương ứng.

(2-3-2) Phát hiện lượng lipit máu (LDL-c và CHO) trong huyết thanh của khỉ cynomolgus mà được cho dùng thể tiếp hợp 7

Lượng lipit máu (LDL-c và CHO) trong huyết thanh của khỉ cynomolgus mà được cho dùng thể tiếp hợp 7 được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp giống như nêu trong mục (2-3-1) ngoại trừ là (1) huyết thanh thu được ở mỗi thời điểm sau khi sử dụng thể tiếp hợp 7 nêu ở mục (2-2) được chọn để phát hiện lipit máu; và (2) lượng lipit máu trước khi sử dụng là trung bình số học của ba lượng lipit máu vào các ngày D-14, D-7 và D1 trước khi sử dụng. Sau khi khỉ cynomolgus được tiêm một liều dưới da 9 mg/kg thể tiếp hợp 7, lượng LDL-c đã chuẩn hóa và lượng CHO đã chuẩn hóa trong huyết thanh thu được ở các thời điểm khác nhau được thể hiện trên Fig.3 và Fig.4 tương ứng.

Như được thể hiện trên Fig.3, từ ngày thứ 14 sau khi sử dụng, thể tiếp hợp 4 cho thấy tác dụng ức chế đáng kể đến LDL-c. Vào ngày 22 sau khi sử dụng, thể tiếp hợp 4 cho thấy tỷ lệ ức chế lên đến 64% đối với LDL-c. Thể tiếp hợp 4 duy trì tỷ lệ ức chế lớn hơn 50% đối với LDL-c từ tuần thứ 2 đến tuần thứ 11 sau khi sử dụng. Lượng LDL-c trong huyết thanh của NHP mà được cho dùng thể tiếp hợp 4 tiếp tục thấp hơn lượng thu được trước khi sử dụng trong khoảng thời gian quan sát là 127 ngày.

Đối với thể tiếp hợp 7, vào ngày 22 sau khi sử dụng một liều, thể tiếp hợp 7 thể hiện tỷ lệ ức chế bằng 36% đối với LDL-c. Thể tiếp hợp 7 duy trì tỷ lệ ức chế bằng 30% đối với LDL-c từ tuần thứ 2 đến tuần thứ 4 sau khi sử dụng. Lượng LDL-c trong huyết thanh của NHP mà được cho dùng thể tiếp hợp 7 tiếp tục thấp hơn lượng thu được trước khi sử dụng trong khoảng thời gian quan sát là 11 tuần.

Như được thể hiện trên Fig.4, từ ngày thứ 14 sau khi sử dụng một liều, thể tiếp hợp 4 cũng thể hiện tác dụng ức chế đáng kể đối với CHO. Vào ngày 22 sau khi sử dụng, thể tiếp hợp 4 thể hiện tỷ lệ ức chế lên đến 38% đối với CHO. Thể tiếp hợp 4 duy trì tỷ lệ ức chế lớn hơn 30% đối với CHO từ tuần thứ 2 đến tuần thứ 8 sau khi sử dụng. Lượng CHO trong huyết thanh của NHP mà được cho dùng thể tiếp hợp 4 tiếp tục thấp hơn lượng thu được trước khi sử dụng trong khoảng thời gian quan sát là 127 ngày.

Đối với thể tiếp hợp 7, vào ngày 22 sau khi sử dụng, thể tiếp hợp 7 thể hiện tỷ lệ ức chế bằng 38% đối với CHO. Thể tiếp hợp 7 duy trì tỷ lệ ức chế về cơ bản lớn hơn 30% đối với CHO từ tuần thứ 2 đến tuần thứ 8 sau khi sử dụng. Lượng CHO trong huyết thanh của NHP mà được cho dùng thể tiếp hợp 7 tiếp tục thấp hơn lượng thu được trước khi sử dụng trong khoảng thời gian quan sát là 11 tuần.

(2-4) Các xét nghiệm máu định kỳ và chức năng đông máu trước và sau khi chọc gan

Trước và sau khi chọc gan, khi mà đã được cho dùng thể tiếp hợp 4 hoặc 5 được lấy máu ở tĩnh mạch. Máu định kỳ và chức năng đông máu được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị phân tích huyết học năm loại tự động hoàn toàn (ADVIA 2120/ADVIA 2120i, Siemens company, Germany) và thiết bị phân tích chức năng đông máu tự động hoàn toàn (CA-7000/CS-2000i, Sysmex company, Japan) tương ứng. Các kết quả chỉ ra rằng việc sử dụng mỗi thể tiếp hợp không tác động đáng kể đến máu định kỳ và chức năng đông máu, so với trước khi sử dụng, chứng tỏ là các thể tiếp hợp siARN theo sáng chế có độ an toàn sinh học tốt.

Ví dụ thử nghiệm 3: Đánh giá độc tính của các thể tiếp hợp siARN ở chuột cống và chuột nhắt

Trong ví dụ thử nghiệm này, các phản ứng độc đối với các thể tiếp hợp siARN theo sáng chế ở các động vật nhỏ được đánh giá bằng cách quan sát các phản ứng độc lâm sàng ở chuột cống hoặc chuột nhắt mà đã được cho dùng thể tiếp hợp 1, 4 hoặc 7, phát hiện khối lượng gan, xét nghiệm máu định kỳ, xét nghiệm sinh hóa máu, lipit máu và các chỉ thị khác, và tiến hành các xét nghiệm giải phẫu học vĩ mô và mô học.

(3-1) Đánh giá tính độc ở chuột cống

(3-1-1) Thử nghiệm tính độc ở chuột cống SD mà đã được cho dùng thể tiếp hợp 1 hoặc 4

Chuột cống SD loại SPF 6-9 tuần tuổi và có cân nặng 210-250 g (được mua từ Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., số li xăng sản xuất: SCXK (Beijing) 2016-0011 hoặc SCXK (Beijing) 2016-0006), đều là chuột đực, được chia làm ba nhóm theo cân nặng của chúng, mỗi nhóm 5 con. Các con chuột cống được tiêm dưới da thể tiếp hợp 1, thể tiếp hợp 4 hoặc đối chứng 1×PBS (pH 7,4) riêng rẽ. Liều thể tiếp hợp được tính toán dựa vào cân nặng. Mỗi thể tiếp hợp được chuẩn bị với 1×PBS (pH 7,4) thành dung dịch 60 mg/ml, thể tích sử dụng là 5 ml/kg, và liều dùng là 300 mg/kg.

Sau khi dùng dưới da một liều, các chỉ số sau được phát hiện:

- (1) Đánh giá tình trạng chung: đánh giá tình trạng chung hai ngày một lần;
- (2) Cân nặng: cân nặng được đo vào ngày D1 trước khi sử dụng, D3, D6, D10 và D14 sau khi sử dụng, và D15 (khi tiến hành giải phẫu);
- (3) Lượng thức ăn đưa vào cơ thể: lượng thức ăn đưa vào cơ thể được đánh giá vào ngày D2-3, D6-7 và D12-13 tương ứng;
- (4) Huyết học: Vào ngày D15 trước khi tiến hành giải phẫu, 1,9 ml máu được lấy ra từ động mạch chủ ở bụng của chuột cống, trong đó 1,0 ml mẫu máu được chống đông bằng EDTA-K2, và máu toàn phần được tiêm trực tiếp để phát hiện các chỉ số tế bào học trong máu sau đây: số lượng hồng cầu (RBC), số lượng bạch cầu (WBC), số lượng tiểu cầu (PLT), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), thể tích tiểu thể trung bình (MCV), hemoglobin tiểu thể trung bình (MCH), nồng độ hemoglobin tiểu thể trung bình (MCHC), lượng hồng cầu lưới (RET), tỷ lệ phần trăm hồng cầu lưới (RET%), lượng và tỷ lệ phần trăm bạch cầu trung tính (NEU), lượng và tỷ lệ phần trăm tế bào lympho (LYM), lượng và tỷ lệ phần trăm bạch cầu đơn nhân (MONO), lượng và tỷ lệ phần trăm bạch cầu ưa eosin (EOS), và lượng và tỷ lệ phần trăm bạch cầu ưa bazơ (BASO); và 0,9 ml mẫu máu còn lại được chống đông bằng natri xitrat và được ly tâm ở tốc độ 1800×g ở nhiệt độ 15°C đến 25°C trong 10 phút để tách huyết tương được dùng để phát hiện thời gian đông máu (thời gian prothrombin (PT) và thời gian thrombin hoạt hóa một phần (APTT));
- (5) Hóa sinh máu: sau khi sử dụng, 0,6 ml máu được lấy từ tĩnh mạch cảnh của chuột cống vào ngày D2, và 3 ml máu được lấy từ động mạch chủ ở bụng của chuột cống vào ngày D15 trước khi giải phẫu; các mẫu máu, không mẫu nào trong số chúng được chống đông, được ly tâm ở tốc độ 1800×g tại nhiệt độ nằm trong khoảng từ

15°C đến 25°C trong 10 phút và huyết thanh được tách ra để đánh giá các chỉ số sinh hóa của máu gồm phosphataza kiềm (ALP), alanin aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST), creatin kinaza (CK), lactat dehydroaza (LDH), γ -glutamyl transpeptidaza (GGT), ure (Urea), creatinin (Crea), nồng độ ion natri (Na^+), nồng độ ion kali (K^+), ion clorua (Cl^-), glucoza huyết (GLU), bilirubin tổng số (TBIL), protein tổng số (TP), albumin (ALB) và tỷ lệ albumin/globulin (A/G).

(6) Xét nghiệm giải phẫu học vĩ mô và mô học: Các con chuột được giải phẫu vào ngày D15, mỗi cơ quan được cân, và xét nghiệm mô học được tiến hành.

(3-1-2) Thử nghiệm tính độc ở chuột cống SD mà đã được cho dùng thể tiếp hợp 7

Tính độc ở chuột cống SD mà được cho dùng thể tiếp hợp 7 được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp giống như nêu trong mục (3-1-1) ngoại trừ là thể tiếp hợp 4 được thay thế bằng thể tiếp hợp 7; thể tiếp hợp 7 được thay thế bằng 1×PBS (pH 7,4) thành dung dịch 20 mg/ml và dung dịch 6 mg/ml tương ứng; thể tích sử dụng là 5 ml/kg, và liều dùng là 100 mg/kg và 30 mg/kg tương ứng. Đối với chỉ số (5) của hóa sinh máu, máu được lấy ra vào ngày D8 và D15 tương ứng trước khi giải phẫu sau khi sử dụng.

Các kết quả chỉ ra rằng không thể tiếp hợp nào trong số các thể tiếp hợp thể hiện tính độc rõ ràng ở chuột cống.

(3-2) Đánh giá tính độc ở chuột nhắt

Mỗi nhóm gồm 10 con chuột nhắt ICR loại SPF có độ tuổi từ 5 đến 6 tuần (được mua từ SPF (Beijing) biotechnology co., LTD.), một nửa trong số chúng là con đực, được tiêm dưới da thể tiếp hợp 1, thể tiếp hợp 4 hoặc thể tiếp hợp 7. Tiến hành sử dụng một lần một tuần trong 2 tuần liên tiếp, tổng cộng 3 lần (vào các ngày D1, D8 và D15 tương ứng). Liều thể tiếp hợp được tính toán dựa vào cân nặng. Mỗi thể tiếp hợp được chuẩn bị với 1×PBS (pH 7,4) thành dung dịch 30 mg/ml, thể tích sử dụng là 10 ml/kg, và liều dùng là 300 mg/kg.

Sau khi sử dụng 3 lần, phát hiện các chỉ số sau:

- (1) Đánh giá tình trạng chung: đánh giá tình trạng chung một ngày một lần;
- (2) Cân nặng: Cân nặng được đo vào ngày D1, D8 và D15, và trước khi sử dụng và ngày D16 (khi tiến hành giải phẫu) tương ứng;
- (3) Lượng thức ăn đưa vào cơ thể: lượng thức ăn đưa vào cơ thể được đánh giá hàng tuần;

(4) Xét nghiệm hóa sinh máu: Vào ngày D16 khi tiến hành giải phẫu, 1 ml máu được lấy ra bằng loại bỏ nhãn cầu, và không được chống đông; đầu tiên máu được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 60 phút, và sau đó ly tâm ở nhiệt độ 4°C ở tốc độ 3000 rpm trong 15 phút để thu được huyết thanh để đánh giá hóa sinh máu; các chỉ số xét nghiệm là giống như các chỉ số xét nghiệm hóa sinh máu trong xét nghiệm tính độc ở chuột cống.

(6) Xét nghiệm giải phẫu học vĩ mô và mô học: Các con chuột được giải phẫu vào ngày D16, mỗi cơ quan được cân, và xét nghiệm mô học được tiến hành.

Các kết quả chỉ ra rằng không thể tiếp hợp nào trong số các thể tiếp hợp thể hiện tính độc rõ ràng ở chuột nhắt.

Các kết quả trên đây chỉ ra rằng các thể tiếp hợp theo sáng chế có độ ổn định sinh học tốt.

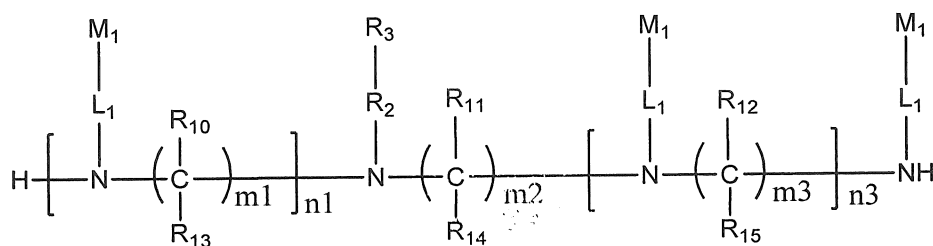
Một vài phương án theo sáng chế được mô tả chi tiết trên đây, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở các mô tả chi tiết cụ thể nêu trong các phương án trên. Nhiều thay đổi đơn giản đối với các giải pháp kỹ thuật theo sáng chế có thể được đưa ra trong phạm vi sáng chế, và các thay đổi đơn giản này cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Cần lưu ý rằng mỗi dấu hiệu kỹ thuật trong số các dấu hiệu kỹ thuật cụ thể được bộc lộ trong các phương án trên có thể được kết hợp theo cách thích hợp bất kỳ được đề xuất mà không gây ra mâu thuẫn nào. Để tránh các đoạn lặp không cần thiết, các cách kết hợp có thể có không được mô tả trong sáng chế.

Ngoài ra, nhiều phương án khác theo sáng chế cũng có thể được kết hợp miễn là không nằm ngoài phạm vi của sáng chế, mà nên được coi là phần mô tả của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể tiếp hợp siARN để ức chế sự biểu hiện gen PCSK9 trong các tế bào gan, trong đó thể tiếp hợp này có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (308):



Công thức (308),

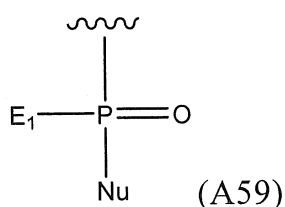
trong đó:

n_1 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3, và n_3 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4;

mỗi m_1 , m_2 , hoặc m_3 độc lập với nhau là một số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 10;

R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{14} , hoặc R_{15} độc lập với nhau là H, hoặc được chọn từ nhóm bao gồm C_1 - C_{10} alkyl, C_1 - C_{10} haloalkyl, và C_1 - C_{10} alkoxy;

R_3 là nhóm có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (A59):



trong đó,

E_1 là OH, SH hoặc BH_2 ;

Nu là siARN;

siARN bao gồm mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa; mỗi nucleotit trong siARN độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến; trong đó mạch có nghĩa bao gồm trình tự nucleotit I, và mạch đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II ít nhất bổ sung ngược một phần để tạo thành vùng mạch kép; trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II là các trình tự được chọn từ một trong số các nhóm i)-vi)

sau:

i) trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- AAGCAAGCAGACAUUUAUZ₁ -3' (SEQ ID NO: 1);

5'- Z₂AUAAAUGUCUGCUUGCUU -3' (SEQ ID NO: 2),

trong đó, Z₁ là C và Z₂ là G, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z₃ ở vị trí tương ứng với Z₁; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z₄ ở vị trí tương ứng với Z₂, trong đó Z₄ là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;

ii) trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 61 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 62 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- UUUGUAGCAUUUUUAUUAZ₅ -3' (SEQ ID NO: 61);

5'- Z₆UAAUAAAAAUGCUACAAA -3' (SEQ ID NO: 62),

trong đó, Z₅ là A và Z₆ là U, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z₇ ở vị trí tương ứng với Z₅; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z₈ ở vị trí tương ứng với Z₆, trong đó Z₈ là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;

iii) trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 121 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 122 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- GCCUGGAGUUUAUUCGGAZ₉ -3' (SEQ ID NO: 121);

5'- Z₁₀UCCGAAUAAACUCCAGGC -3' (SEQ ID NO: 122),

trong đó, Z₉ là A và Z₁₀ là U, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z₁₁ ở vị trí tương ứng với Z₉; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z₁₂ ở vị trí tương ứng với Z₁₀, trong đó Z₁₂ là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;

iv) trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 181 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 182 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- CUGUUUUGCUUUUGUAACZ₁₃ -3' (SEQ ID NO: 181);

5'- Z₁₄GUUACAAAAGCAAAACAG -3' (SEQ ID NO: 182),

trong đó, Z₁₃ là U và Z₁₄ là A, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z₁₅ ở vị trí tương ứng với Z₁₃; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z₁₆ ở vị trí tương ứng với Z₁₄, trong đó Z₁₆ là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;

v) trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 241 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 242 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- GGUUUUGUAGCAUUUUUAZ₁₇ -3' (SEQ ID NO: 241);

5'- Z₁₈UAAAAAUGCUACAAAACC -3' (SEQ ID NO: 242),

trong đó, Z₁₇ là U và Z₁₈ là A, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z₁₉ ở vị trí tương ứng với Z₁₇; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z₂₀ ở vị trí tương ứng với Z₁₈, trong đó Z₂₀ là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa; và

vi) trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 301 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit, và trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 302 có chiều dài tương đương nhau và khác nhau không quá 3 nucleotit:

5'- GUGACUUUUUAAAAUAAAZ₂₁ -3' (SEQ ID NO: 301);

5'- Z₂₂UUUAUUUUAAAAAGUCAC -3' (SEQ ID NO: 302),

trong đó, Z₂₁ là A và Z₂₂ là U, và

trình tự nucleotit I bao gồm nucleotit Z₂₃ ở vị trí tương ứng với Z₂₁; trình tự nucleotit II bao gồm nucleotit Z₂₄ ở vị trí tương ứng với Z₂₂, trong đó Z₂₄ là nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;

R₂ là alkylen mạch thẳng có chiều dài gồm từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon, trong đó

một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tùy ý được thay thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, S(O)₂, C₂-C₁₀ alkenylen, C₂-C₁₀ alkynylen, C₆-C₁₀ arylen, C₃-C₁₈ heteroxycylen, và C₅-C₁₀ heteroarylen; và trong đó R₂ tùy ý có một hoặc nhiều nhóm thế bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: C₁-C₁₀ alkyl, C₆-C₁₀ aryl, C₅-C₁₀ heteroaryl, C₁-C₁₀ haloalkyl, -OC₁-C₁₀ alkyl, -OC₁-C₁₀ alkylphenyl, -C₁-C₁₀ alkyl-OH, -OC₁-C₁₀ haloalkyl, -SC₁-C₁₀ alkyl, -SC₁-C₁₀ alkylphenyl, -C₁-C₁₀ alkyl-SH, -SC₁-C₁₀ haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH₂, -C₁-C₁₀ alkyl-NH₂, -N(C₁-C₁₀ alkyl)(C₁-C₁₀ alkyl), -NH(C₁-C₁₀ alkyl), -N(C₁-C₁₀ alkyl) (C₁-C₁₀ alkylphenyl), -NH(C₁-C₁₀ alkylphenyl), xyano, nitro, -CO₂H, -C(O)O(C₁-C₁₀ alkyl), -CON(C₁-C₁₀ alkyl)(C₁-C₁₀ alkyl), -CONH(C₁-C₁₀ alkyl), -CONH₂, -NHC(O)(C₁-C₁₀ alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C₁-C₁₀ alkyl)C(O)(C₁-C₁₀ alkyl), -N(C₁-C₁₀ alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C₁-C₁₀ alkyl, -C(O)C₁-C₁₀ alkylphenyl, -C(O)C₁-C₁₀ haloalkyl, -OC(O)C₁-C₁₀ alkyl, -SO₂(C₁-C₁₀ alkyl), -SO₂(phenyl), -SO₂(C₁-C₁₀ haloalkyl), -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁-C₁₀ alkyl), -SO₂NH(phenyl), -NHSO₂(C₁-C₁₀ alkyl), -NHSO₂(phenyl), và -NHSO₂(C₁-C₁₀ haloalkyl);

mỗi L₁ độc lập là alkylen mạch thẳng có chiều dài gồm từ 1 đến 70 nguyên tử cacbon, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử cacbon tùy ý được thay thế bằng một hoặc nhiều nhóm bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: C(O), NH, O, S, CH=N, S(O)₂, C₂-C₁₀ alkenylen, C₂-C₁₀ alkynylen, C₆-C₁₀ arylen, C₃-C₁₈ heteroxycylen, và C₅-C₁₀ heteroarylen; và trong đó L₁ tùy ý có một hoặc nhiều nhóm thế bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm: C₁-C₁₀ alkyl, C₆-C₁₀ aryl, C₅-C₁₀ heteroaryl, C₁-C₁₀ haloalkyl, -OC₁-C₁₀ alkyl, -OC₁-C₁₀ alkylphenyl, -C₁-C₁₀ alkyl-OH, -OC₁-C₁₀ haloalkyl, -SC₁-C₁₀ alkyl, -SC₁-C₁₀ alkylphenyl, -C₁-C₁₀ alkyl-SH, -SC₁-C₁₀ haloalkyl, halo, -OH, -SH, -NH₂, -C₁-C₁₀ alkyl-NH₂, -N(C₁-C₁₀ alkyl)(C₁-C₁₀ alkyl), -NH(C₁-C₁₀ alkyl), -N(C₁-C₁₀ alkyl)(C₁-C₁₀ alkylphenyl), -NH(C₁-C₁₀ alkylphenyl), xyano, nitro, -CO₂H, -C(O)O(C₁-C₁₀ alkyl), -CON(C₁-C₁₀ alkyl)(C₁-C₁₀ alkyl), -CONH(C₁-C₁₀ alkyl), -CONH₂, -NHC(O)(C₁-C₁₀ alkyl), -NHC(O)(phenyl), -N(C₁-C₁₀ alkyl)C(O)(C₁-C₁₀ alkyl), -N(C₁-C₁₀ alkyl)C(O)(phenyl), -C(O)C₁-C₁₀ alkyl, -C(O)C₁-C₁₀ alkylphenyl, -C(O)C₁-C₁₀ haloalkyl, -OC(O)C₁-C₁₀ alkyl, -SO₂(C₁-C₁₀ alkyl), -SO₂(phenyl), -SO₂(C₁-C₁₀ haloalkyl), -SO₂NH₂, -SO₂NH(C₁-C₁₀ alkyl), -SO₂NH(phenyl), -NHSO₂(C₁-C₁₀ alkyl), -NHSO₂(phenyl), và -NHSO₂(C₁-C₁₀ haloalkyl);

~~~~~ là vị trí mà một nhóm được liên kết cộng hóa trị; và  $M_1$  là nhóm hướng đích;

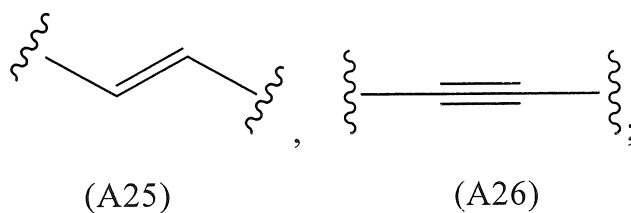
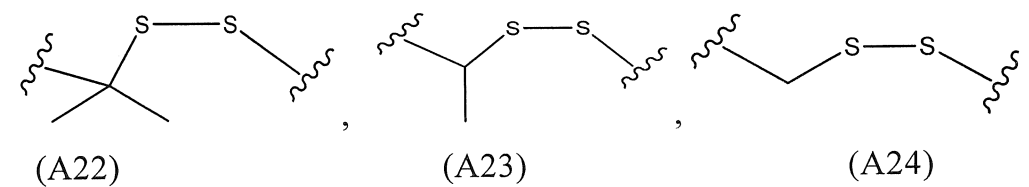
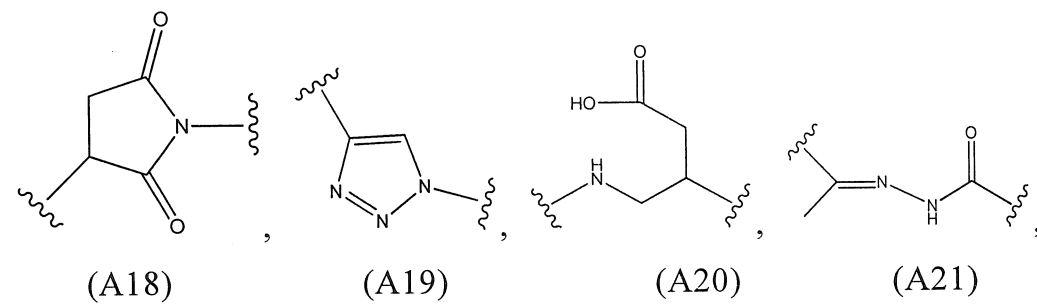
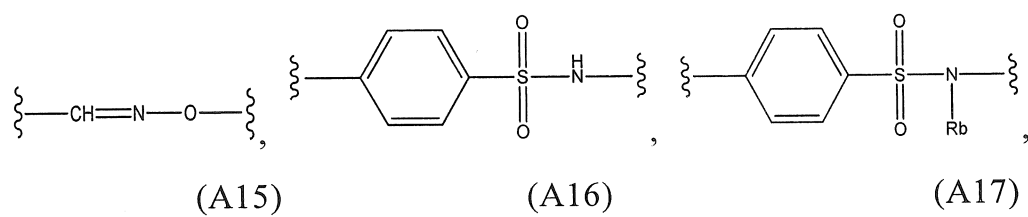
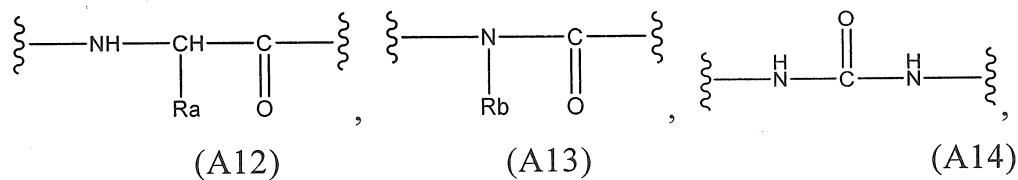
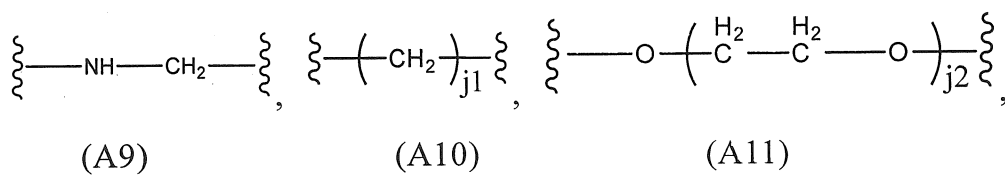
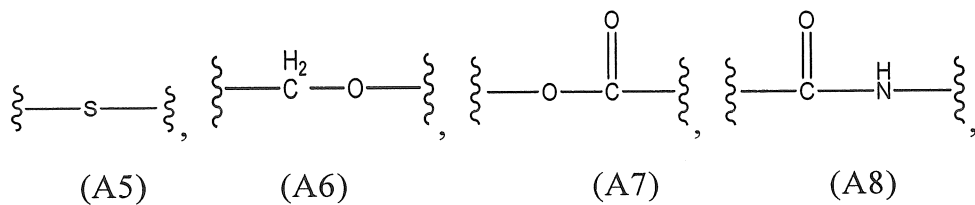
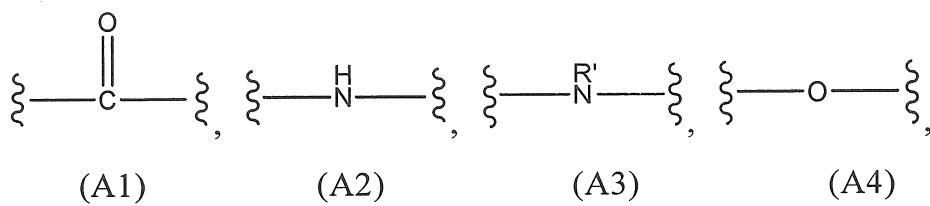
trong đó, mỗi nhóm hướng đích độc lập là phối tử mà gắn kết với thụ thể asialoglycoprotein trên bề mặt của tế bào gan của động vật có vú; hoặc

mỗi nhóm trong số các nhóm hướng đích độc lập là asialoglycoprotein hoặc sacarit; hoặc

mỗi nhóm trong số các nhóm hướng đích 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,  $\alpha$ -D-mannofuranoza,  $\beta$ -D-mannofuranoza,  $\alpha$ -D-mannopyranoza,  $\beta$ -D-mannopyranoza,  $\alpha$ -D-glucopyranoza,  $\beta$ -D-glucopyranoza,  $\alpha$ -D-glucofuranoza,  $\beta$ -D-glucofuranoza,  $\alpha$ -D-fructofuranoza,  $\alpha$ -D-fructopyranoza,  $\alpha$ -D-galactopyranoza,  $\beta$ -D-galactopyranoza,  $\alpha$ -D-galactofuranoza,  $\beta$ -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- $\beta$ -D-glucopyranoza, 2-deoxy-2-metylamin-L-glucopyranoza, 4,6-dideoxy-4-formamido-2,3-di-O-metyl-D-mannopyranoza, 2-deoxy-2-sulfoamino-D-glucopyranoza, axit N-glycolyl- $\alpha$ -neuraminic, 5-thio- $\beta$ -D-glucopyranoza, metyl 2,3,4-tris-O-axetyl-1-thio-6-O-trityl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, 4-thio- $\beta$ -D-galactopyranoza, etyl 3,4,6,7-tetra-O-acetyl-2-deoxy-1,5-dithio- $\alpha$ -D-glucoheptopyranoside, 2,5-anhydro-D-allononitril, riboza, D-riboza, D-4-thioriboza, L-riboza, L-4-thioriboza; hoặc

ít nhất một hoặc mỗi nhóm trong số các nhóm hướng đích là galactoza hoặc N-axetylgalactosamin.

2. Thụ thể tiếp hợp siARN theo điểm 1, trong đó mỗi  $L_1$  độc lập được chọn từ nhóm bao gồm các công thức (A1)-(A26) và tổ hợp bất kỳ của chúng:



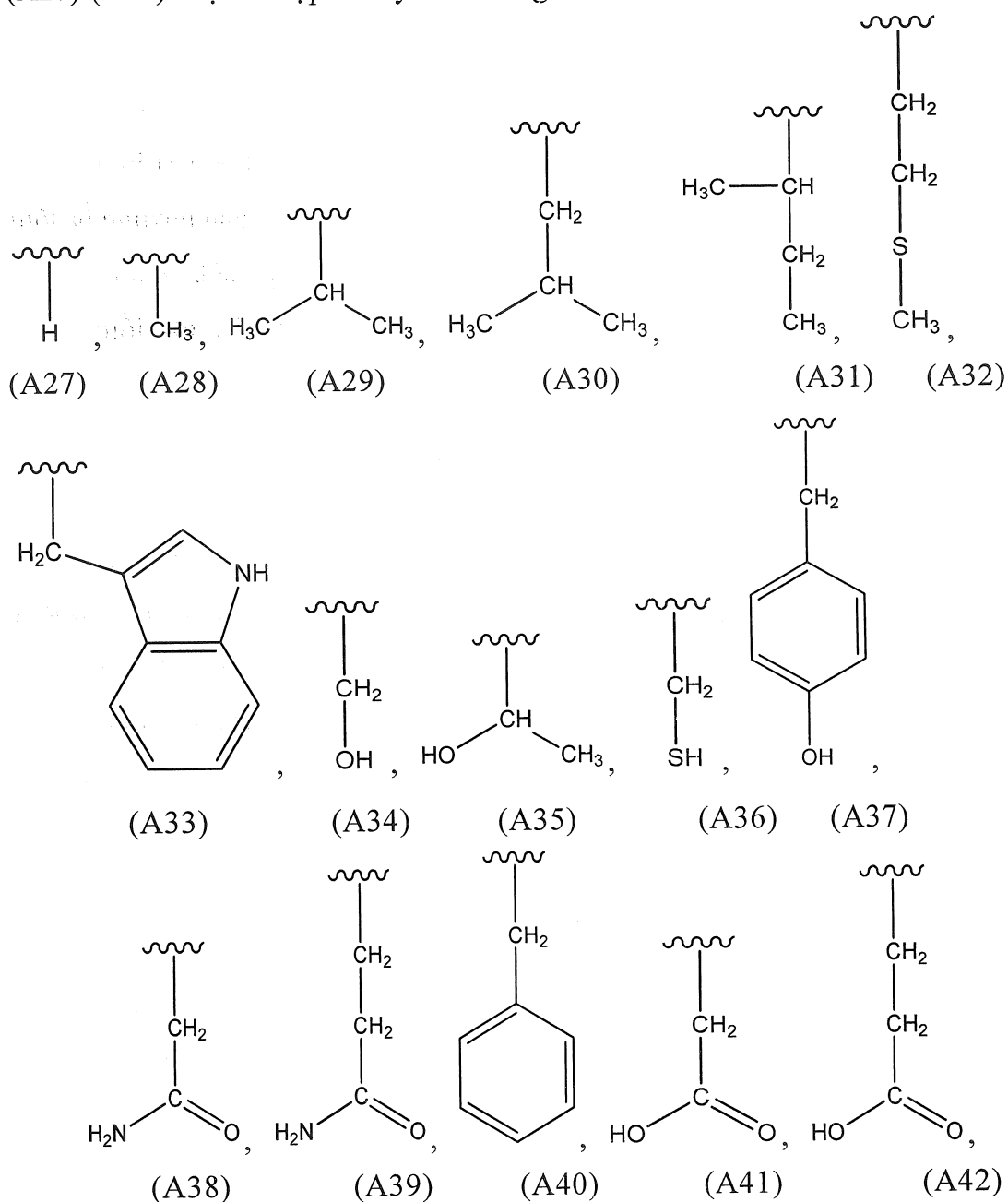


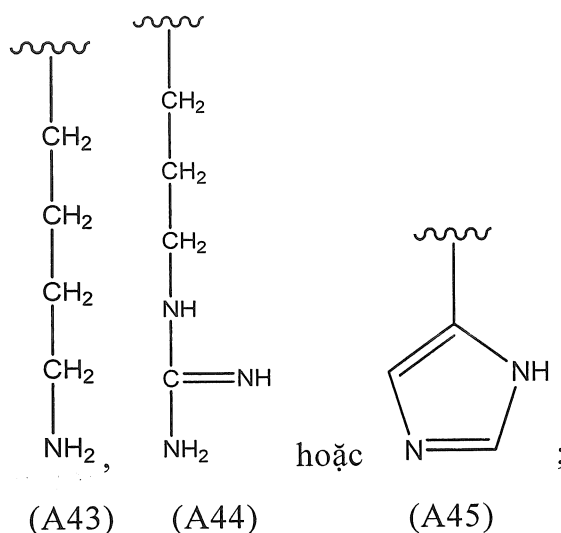
trong đó,

mỗi j1 độc lập là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20; mỗi j2 độc lập là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 20;

mỗi R' độc lập là C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl;

mỗi Ra độc lập được chọn từ nhóm bao gồm các nhóm có các công thức (A27)-(A45) hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng:





mỗi Rb độc lập là C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alkyl;

hoặc L<sub>1</sub> được chọn từ các tổ hợp liên kết của một hoặc nhiều trong số các công thức (A1), (A4), (A5), (A6), (A8), (A10), (A11), và (A13);

hoặc L<sub>1</sub> được chọn từ các tổ hợp liên kết gồm ít nhất hai công thức trong số các công thức (A1), (A4), (A8), (A10), và (A11);

hoặc L<sub>1</sub> được chọn từ các tổ hợp liên kết gồm ít nhất hai công thức trong số các công thức (A1), (A8) và (A10);

hoặc L<sub>1</sub> có chiều dài gồm 3 đến 25 nguyên tử;

hoặc L<sub>1</sub> có chiều dài gồm 4 đến 15 nguyên tử;

~~~~ là vị trí nơi mà một nhóm được liên kết cộng hóa trị.

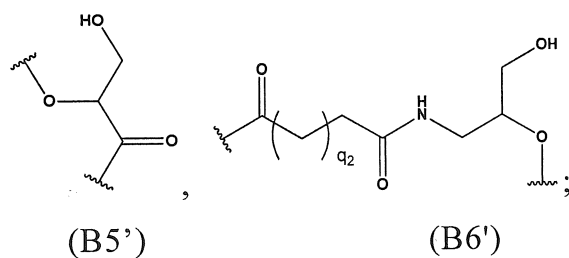
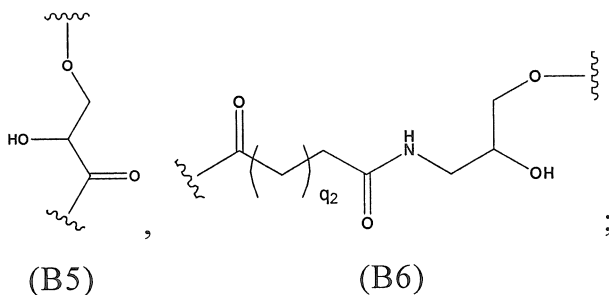
3. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm 1 hoặc 2, trong đó mỗi m₁, m₂ hoặc m₃ độc lập với nhau là một số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 5, và/hoặc m₁ = m₂ = m₃.

4. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó R₂ bao gồm cả vị trí liên kết với nguyên tử N trên khung có nitơ và vị trí liên kết với nguyên tử P trên nhóm R₃; hoặc

trên nhóm R₂, vị trí liên kết với nguyên tử N trên khung có nitơ tạo thành liên kết amit với nguyên tử N, và vị trí liên kết với nguyên tử P trên nhóm R₃ tạo thành liên kết phosphoeste với nguyên tử P;

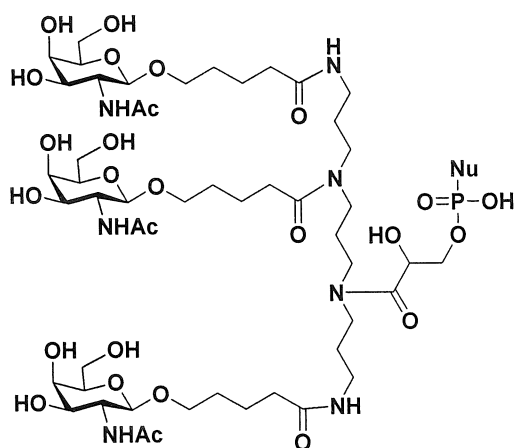
hoặc R₂ là nhóm có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức bất kỳ trong số các

công thức (B5), (B6), (B5') hoặc (B6'),

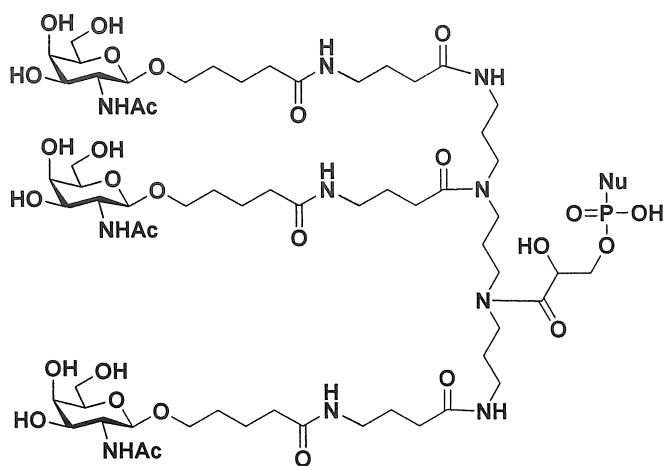


trong đó $\sim$ là vị trí trong đó nhóm này được liên kết cộng hóa trị; và q_2 là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

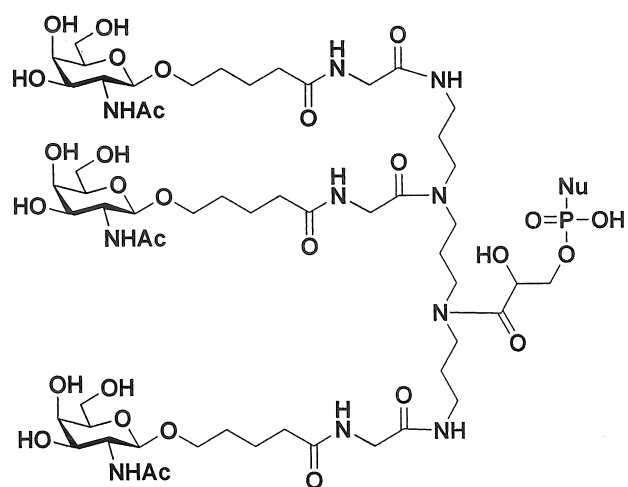
5. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó thẻ tiếp hợp này có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (403), (404), (405), (406), (407), (408), (409), (410), (411), (412), (413), (414), (415), (416), (417), (418), (419), (420), (421), hoặc (422):



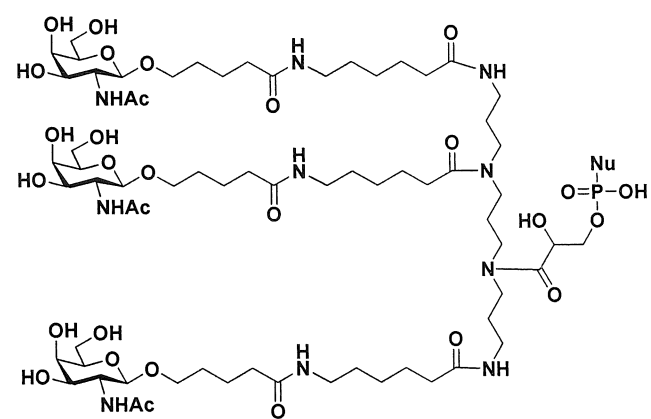
Công thức (403)



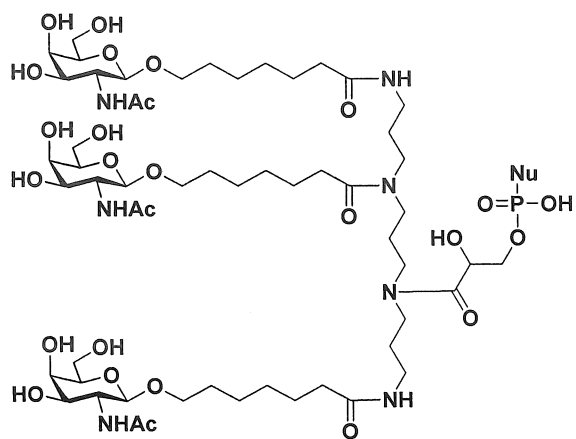
Công thức (404)



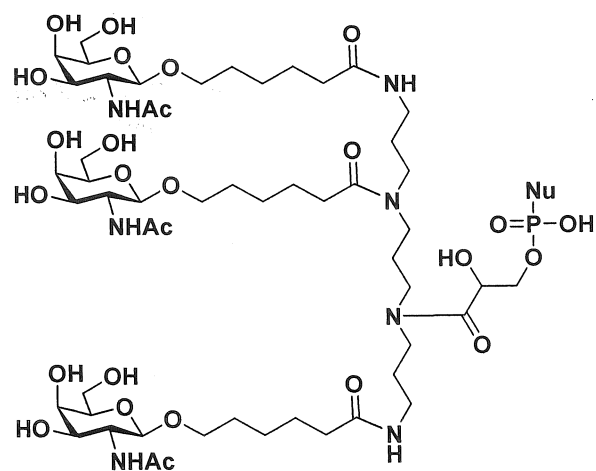
Công thức (405)



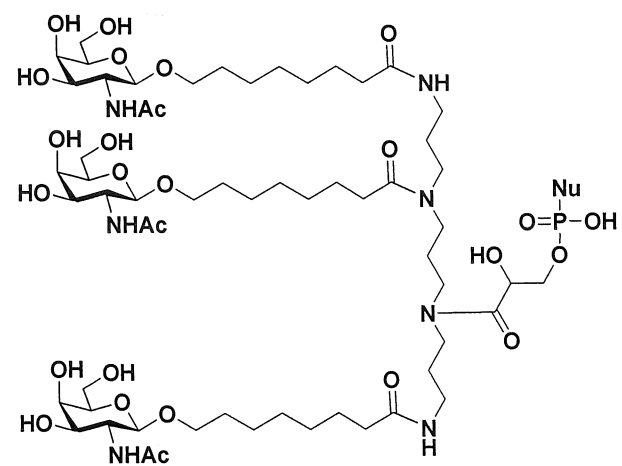
Công thức (406)



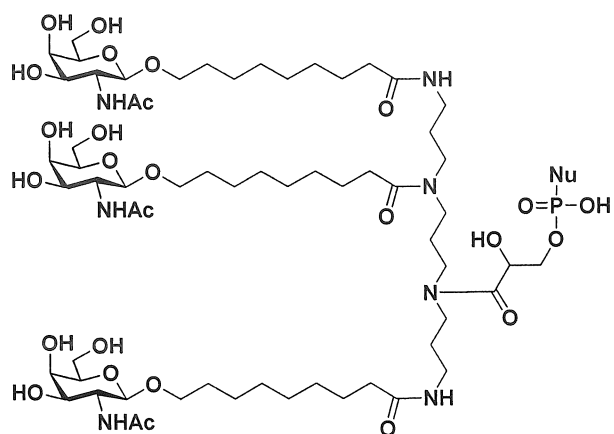
Công thức (407)



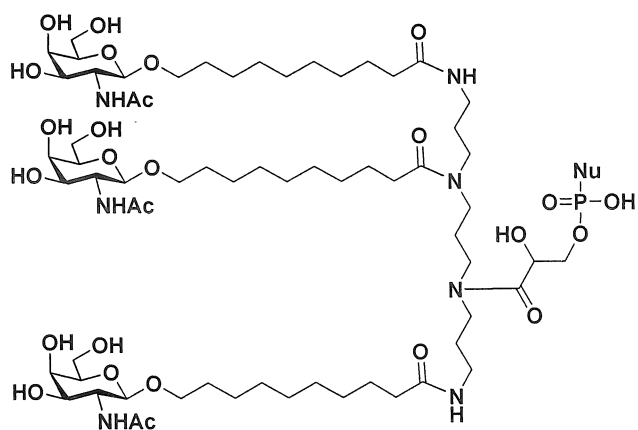
Công thức (408)



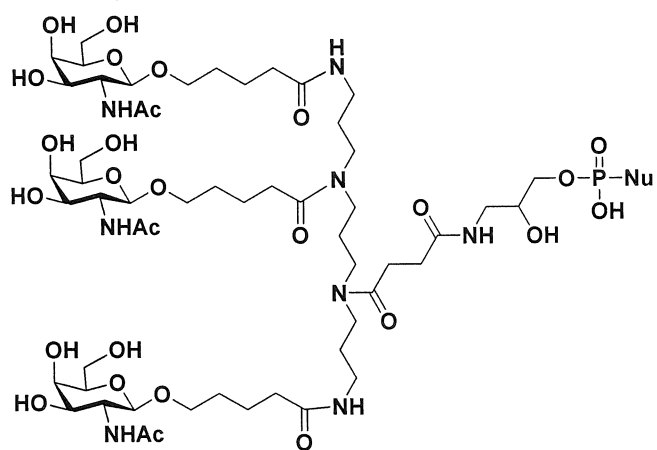
Công thức (409)



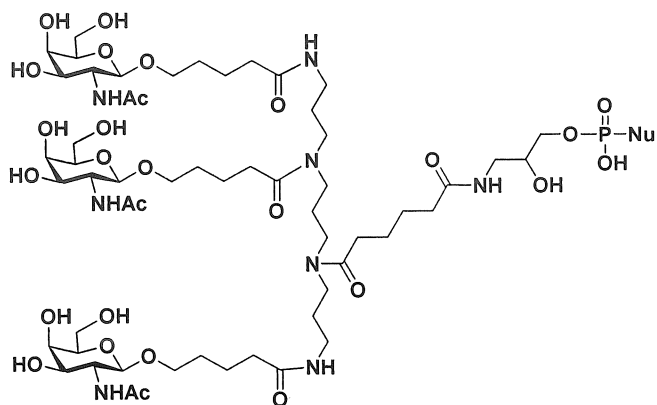
Công thức (410)



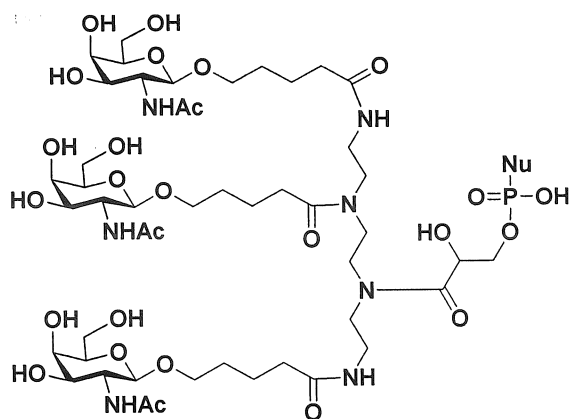
Công thức (411)



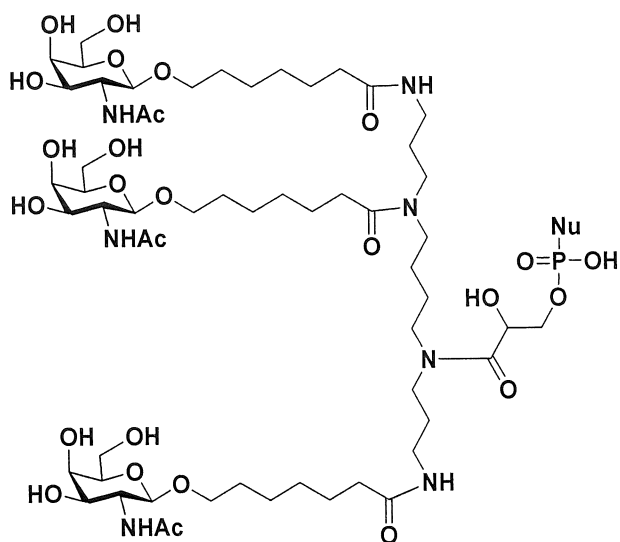
Công thức (412)



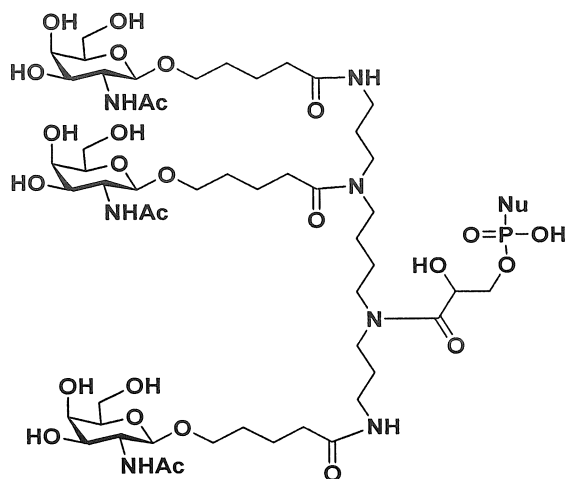
Công thức (413)



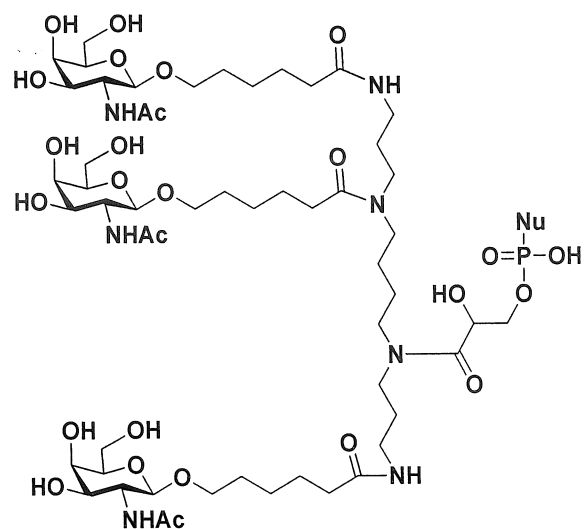
Công thức (414)



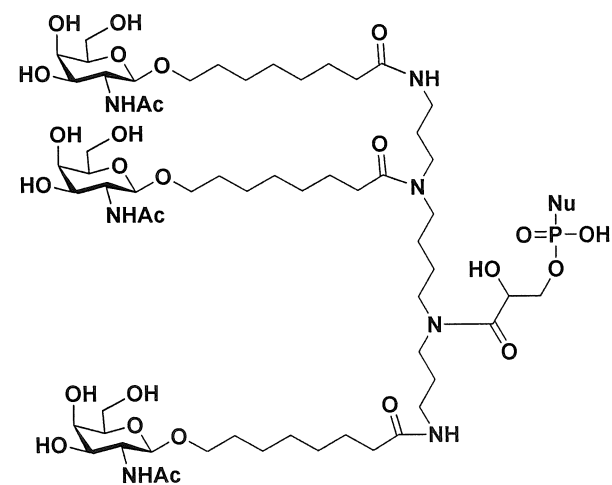
Công thức (415)



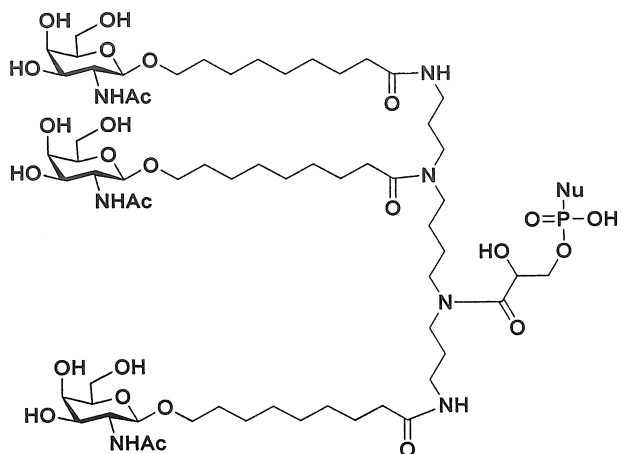
Công thức (416)



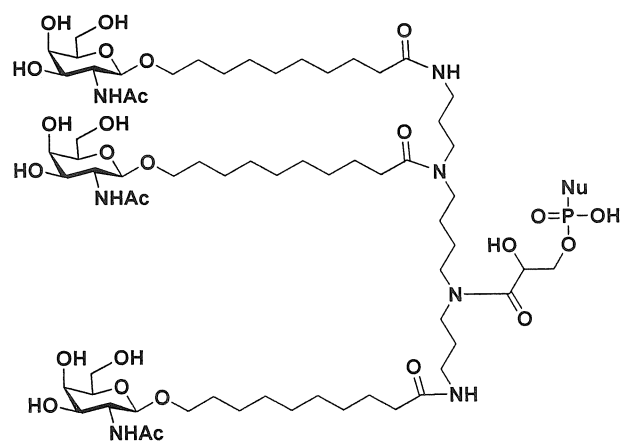
Công thức (417)



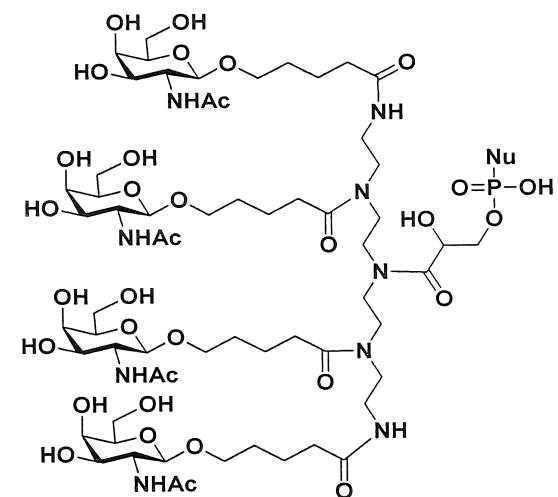
Công thức (418)



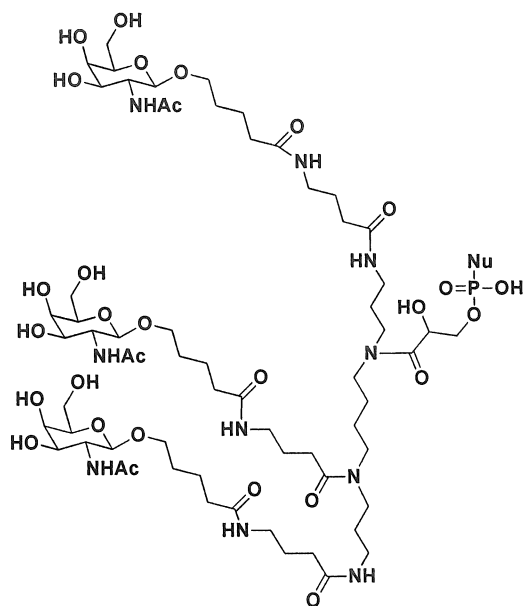
Công thức (419)



Công thức (420)



Công thức (421)



Công thức (422).

6. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó nguyên tử P trong công thức (A59) được liên kết với vùng tận cùng của mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của siARN, và vùng tận cùng được dùng để chỉ bốn nucleotit đầu tiên được tính từ một đầu tận cùng của mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa; hoặc

nguyên tử P trong công thức (A59) được liên kết với một đầu của mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của siARN; hoặc

nguyên tử P trong công thức (A59) được liên kết với đầu 3' của mạch có nghĩa của siARN; hoặc

nguyên tử P trong công thức (A59) được liên kết với vị trí 2', 3', hoặc 5' của nucleotit trong siARN nhờ liên kết phosphodiester.

7. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó:

i) trình tự nucleotit I có không quá 1 nucleotit khác so với trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1, và/hoặc trình tự nucleotit II có không quá 1 nucleotit khác so với trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2; hoặc

ii) trình tự nucleotit I có không quá 1 nucleotit khác so với trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 61, và/hoặc trình tự nucleotit II có không quá 1 nucleotit khác so với trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 62; hoặc

iii) trình tự nucleotit I có không quá 1 nucleotit khác so với trình tự nucleotit như

được thể hiện bởi SEQ ID NO: 121, và/hoặc trình tự nucleotit II có không quá 1 nucleotit khác so với trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 122; hoặc

iv) trình tự nucleotit I có không quá 1 nucleotit khác so với trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 181, và/hoặc trình tự nucleotit II có không quá 1 nucleotit khác so với trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 182;

v) trình tự nucleotit I có không quá 1 nucleotit khác so với trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 241, và/hoặc trình tự nucleotit II có không quá 1 nucleotit khác so với trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 242; hoặc

vi) trình tự nucleotit I có không quá 1 nucleotit khác so với trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 301, và/hoặc trình tự nucleotit II có không quá 1 nucleotit khác so với trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 302.

8. Thể tiếp hợp siARN theo điểm 7, trong đó:

i) nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 bao gồm khác nhau ở vị trí Z_4 , trong đó Z_4 được chọn từ A, U hoặc C; hoặc

ii) nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 62 bao gồm khác nhau ở vị trí Z_8 , trong đó Z_8 được chọn từ A, C hoặc G; hoặc

iii) nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 122 bao gồm khác nhau ở vị trí Z_{12} , trong đó Z_{12} được chọn từ A, C hoặc G; hoặc

iv) nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 182 bao gồm khác nhau ở vị trí Z_{16} , trong đó Z_{16} được chọn từ U, C hoặc G;

v) nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 242 bao gồm khác nhau ở vị trí Z_{20} , trong đó Z_{20} được chọn từ U, C hoặc G; hoặc

vi) nucleotit khác nhau giữa trình tự nucleotit II và trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 302 bao gồm khác nhau ở vị trí Z_{24} , trong đó Z_{24} được chọn từ A, C hoặc G;

trong đó Z_3 là nucleotit bổ sung với Z_4 ; hoặc
 Z_7 là nucleotit bổ sung với Z_8 ; hoặc
 Z_{11} là nucleotit bổ sung với Z_{12} ; hoặc
 Z_{15} là nucleotit bổ sung với Z_{16} ; hoặc
 Z_{19} là nucleotit bổ sung với Z_{20} ; hoặc
 Z_{23} là nucleotit bổ sung với Z_{24} .

9. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm 7 hoặc 8, trong đó mạch có nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit III, mạch đối nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit IV; và trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV độc lập với nhau có chiều dài gồm 1 đến 4 nucleotit; trình tự nucleotit III được liên kết với đầu 5' của trình tự nucleotit I, trình tự nucleotit IV được liên kết với đầu 3' của trình tự nucleotit II; trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV có chiều dài tương đương nhau, và bổ sung ngược đáng kể hoặc bổ sung ngược hoàn toàn với nhau; “bổ sung ngược đáng kể” có nghĩa là không có quá 1 bazơ bắt cặp nhầm giữa hai trình tự nucleotit; và “bổ sung ngược hoàn toàn” có nghĩa là không có sự bắt cặp nhầm giữa hai trình tự nucleotit.

10. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm 9, trong đó:

i) trình tự nucleotit I là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3; trình tự nucleotit II là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4; và cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 1 nucleotit, và bazơ của trình tự nucleotit III là C; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là CC; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 3 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là CCC; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 4 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là ACCC; hoặc

ii) trình tự nucleotit I là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 63;

trình tự nucleotit II là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 64; và cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 1 nucleotit, và bazơ của trình tự nucleotit III là U; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là GU; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 3 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là GGU; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 4 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là GGGU; hoặc

iii) trình tự nucleotit I là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 123; trình tự nucleotit II là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 124; và cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 1 nucleotit, và bazơ của trình tự nucleotit III là G; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là AG; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 3 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là UAG; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 4 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là AUAG; hoặc

iv) trình tự nucleotit I là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 183; trình tự nucleotit II là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 184; và cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 1 nucleotit, và bazơ của trình tự nucleotit III là C; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là AC; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 3 nucleotit,

và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là GAC; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 4 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là AGAC;

v) trình tự nucleotit I là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 243; trình tự nucleotit II là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 244; và cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 1 nucleotit, và bazơ của trình tự nucleotit III là G; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là UG; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 3 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là CUG; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 4 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là UCUG; hoặc

vi) trình tự nucleotit I là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 303; trình tự nucleotit II là trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 304; và cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 1 nucleotit, và bazơ của trình tự nucleotit III là G; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 2 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là UG; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 3 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là AUG; hoặc

cả trình tự nucleotit III và trình tự nucleotit IV đều có chiều dài gồm 4 nucleotit, và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', thành phần bazơ của trình tự nucleotit III là UAUG.

11. Thể tiếp hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó mạch

đối nghĩa còn bao gồm trình tự nucleotit V, mà có chiều dài gồm từ 1 đến 3 nucleotit và được liên kết với đầu 3' của mạch đối nghĩa, nhờ đó tạo thành đầu nhô ra 3' của mạch đối nghĩa; hoặc

trình tự nucleotit V có chiều dài gồm 2 nucleotit; hoặc

trình tự nucleotit V là 2 thymin deoxyribonucleotit liên tiếp hoặc 2 uraxil ribonucleotit liên tiếp; hoặc

trình tự nucleotit V bổ sung với các nucleotit ở các vị trí tương ứng của mARN đích.

12. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó:

mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 6; hoặc

mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 7, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 8; hoặc

mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 65, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 66; hoặc

mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 67, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 68; hoặc

mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 125, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 126; hoặc

mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 127, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 128; hoặc

mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 185, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 186; hoặc

mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 187, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 188; hoặc

mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 245, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 246; hoặc

mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 247, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 248; hoặc

mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 305, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 306; hoặc

mạch có nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 307, và mạch đối nghĩa của siARN bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 308.

13. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 12, trong đó siARN có trình tự nucleotit như được thể hiện bởi trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 9-12, SEQ ID NO: 69-72, SEQ ID NO: 129-132, SEQ ID NO: 189-192, SEQ ID NO: 249-252, hoặc SEQ ID NO: 309-312.

14. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó mỗi nucleotit trong mạch có nghĩa và mạch đối nghĩa độc lập là nucleotit được cải biến có flo hoặc nucleotit được cải biến không có flo; hoặc

nucleotit được cải biến có flo được định vị trong trình tự nucleotit I và trình tự nucleotit II; và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ít nhất ở các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit I là các nucleotit được cải biến có flo; và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ít nhất ở các vị trí 2, 6, 14, và 16 của trình tự nucleotit II là các nucleotit được cải biến có flo; hoặc

theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 7, 8 và 9 hoặc ở các vị trí 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit I trong mạch có nghĩa là các nucleotit được cải biến

có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác trong mạch có nghĩa là các nucleotit được cải biến không có flo; theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 2, 6, 14 và 16 hoặc ở các vị trí 2, 6, 8, 9, 14, và 16 của trình tự nucleotit II trong mạch đối nghĩa là các nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác trong mạch đối nghĩa là các nucleotit được cải biến không có flo.

15. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm 14, trong đó mỗi nucleotit được cải biến không có flo độc lập là nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nucleotit có nhóm không có flo, hoặc dạng tương tự nucleotit; hoặc

nucleotit được tạo thành bằng cách thay thế 2'-hydroxy của nhóm riboza của nucleotit bằng nhóm không có flo được chọn từ nhóm bao gồm nucleotit được cải biến có nhóm 2'-alkoxy, nucleotit được cải biến có nhóm alkoxy được thế ở vị trí 2', nucleotit được cải biến có nhóm 2'-alkyl, nucleotit được cải biến có nhóm alkyl được thế ở vị trí 2', nucleotit được cải biến có nhóm 2'-amino, nucleotit được cải biến có nhóm amino được thế ở vị trí 2', và 2'-deoxy nucleotit; và dạng tương tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm isonucleotit, LNA, ENA, cET, UNA, và GNA; hoặc

mỗi nucleotit được cải biến không có flo là nucleotit được cải biến có nhóm metoxy, trong đó nucleotit được cải biến có nhóm metoxy được dùng để chỉ nucleotit được tạo thành bằng cách thế 2'-hydroxy của nhóm riboza bằng nhóm metoxy.

16. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm 14 hoặc 15, trong đó:

theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit I trong mạch có nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác trong mạch có nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có nhóm metoxy; và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 2, 6, 8, 9, 14 và 16 của trình tự nucleotit II trong mạch đối nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác trong mạch đối nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có nhóm metoxy; hoặc

theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 5, 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit I trong mạch có nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác của mạch có nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có

nhóm metoxy; và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit II trong mạch đối nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác trong mạch đối nghĩa là các nucleotit được cải biến có nhóm metoxy; hoặc

theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 7, 8 và 9 của trình tự nucleotit I trong mạch có nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác trong mạch có nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có nhóm metoxy; và theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3', các nucleotit ở các vị trí 2, 6, 14 và 16 của trình tự nucleotit II trong mạch đối nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có flo, và các nucleotit ở các vị trí khác trong mạch đối nghĩa của siARN là các nucleotit được cải biến có nhóm metoxy.

17. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó siRNA có trình tự nucleotit như được thể hiện bởi trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 13-24, SEQ ID NO: 73-84, SEQ ID NO: 133-144, SEQ ID NO: 193-204, SEQ ID NO: 253-264, hoặc SEQ ID NO: 313-324.

18. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó trong siARN, ít nhất một nhóm phosphat là nhóm phosphorothioat, và liên kết phosphorothioat được định vị ở ít nhất một vị trí của nhóm bao gồm các vị trí sau:

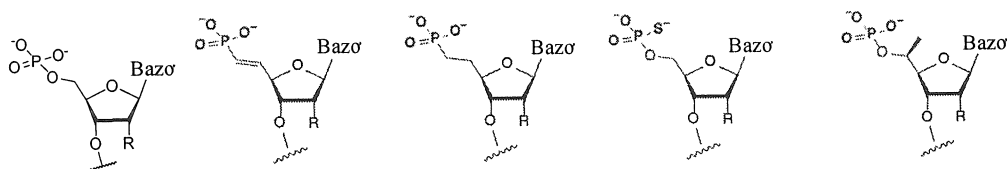
- vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai ở đầu 5' của mạch có nghĩa;
- vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba ở đầu 5' của mạch có nghĩa;
- vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai ở đầu 3' của mạch có nghĩa;
- vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba ở đầu 3' của mạch có nghĩa;
- vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;
- vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba ở đầu 5' của mạch đối nghĩa;
- vị trí giữa nucleotit thứ nhất và thứ hai ở đầu 3' của mạch đối nghĩa; và
- vị trí giữa nucleotit thứ hai và thứ ba ở đầu 3' của mạch đối nghĩa.

19. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó siARN có trình tự nucleotit như được thể hiện bởi trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID

NO: 25-36, SEQ ID NO: 85-96, SEQ ID NO: 145-156, SEQ ID NO: 205-216, SEQ ID NO: 265-276, hoặc SEQ ID NO: 325-336.

20. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19, trong đó nucleotit ở đầu 5' của mạch đối nghĩa của siARN là 5'-phosphat nucleotit hoặc nucleotit được cải biến có nhóm tương tự 5'-phosphat; hoặc

5'-phosphat nucleotit là nucleotit có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức (2); và nucleotit được cải biến có nhóm tương tự 5'-phosphat là nucleotit có cấu trúc như được thể hiện bởi công thức bất kỳ trong số các công thức (3) đến (6):



Công thức (2)

Công thức (3)

Công thức (4)

Công thức (5)

Công thức (6)

trong đó R được chọn từ H, OH, metoxy hoặc F;

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

21. Thẻ tiếp hợp siARN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20, trong đó siARN có trình tự nucleotit như được thể hiện bởi trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 37-60, SEQ ID NO: 97-120, SEQ ID NO: 157-180, SEQ ID NO: 217-240, SEQ ID NO: 277-300, hoặc SEQ ID NO: 337-360.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SU ZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO.,LTD

<120> THẺ TIẾP HỢP siARN

<130> FP1200369P

<150> 201910431319.2

<151> 2019-05-22

<150> 201910433243.7

<151> 2019-05-23

<160> 426

<170> Danh mục trình tự SIPO 1.0

<210> 1

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 1

aagcaagcag acauuuauun

19

<210> 2

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 2

gauaaauguc ugcuuugcuu

19

<210> 3

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 3

aagcaagcag acauuuaun

19

<210> 4

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 4

nauaaauguc ugcugcuu

19

<210> 5

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 5

aagcaagcag acauuuaun

19

<210> 6

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 6

nauaaauguc ugcugcuug g

21

<210> 7

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 7
ccaagcaagc agacauuuau n 21

<210> 8
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 8
nauaaauguc ugcuugcuug ggu 23

<210> 9
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 9
aagcaagcag acauuuau c 19

<210> 10
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 10
gauaaauguc ugcuugcuug g 21

<210> 11
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 11
ccaagcaagc agacauuuau c 21

<210> 12
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 12
gauaaauguc ugcuugcuug ggu

23

<210> 13
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 13
aagcaagcag acauuuauuc

19

<210> 14
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 14
gauaaauguc ugcuugcuug g

21

<210> 15
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 15
aagcaagcag acauuuauuc

19

<210> 16

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

<220>
<223> siARN

<400> 16
gauaaauguc ugcugcuug g 21

<210> 17
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 17
aagcaagcag acauuuau c 19

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

<220>
<223> siARN

<400> 18
gauaaauguc ugcugcuug g 21

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

<220>
<223> siARN

<400> 19
ccaagcaagc agacauuuau c 21

<210> 20
<211> 23
<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 20

gauaaauguc ugcugcuug ggu

23

<210> 21

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 21

ccaagcaagc agacauuuau c

21

<210> 22

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 22

gauaaauguc ugcugcuug ggu

23

<210> 23

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 23

ccaagcaagc agacauuuau c

21

<210> 24

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 24

gauaaauguc ugcugcuug ggu

23

<210> 25

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 25

aagcaagcag acauuuauuc

19

<210> 26

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 26

gauaaauguc ugcugcuug g

21

<210> 27

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 27

aagcaagcag acauuuauuc

19

<210> 28

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 28
gauaaauguc ugcugcuug g 21

<210> 29
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 29
aagcaagcag acauuuuac 19

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

<220>
<223> siARN

<400> 30
gauaaauguc ugcugcuug g 21

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

<220>
<223> siARN

<400> 31
ccaagcaagc agacauuuau c 21

<210> 32
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 32

gauaaauguc ugcugcuug ggu

23

<210> 33

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 33

ccaagcaagc agacauuuau c

21

<210> 34

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 34

gauaaauguc ugcugcuug ggu

23

<210> 35

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 35

ccaagcaagc agacauuuau c

21

<210> 36

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 36

gauaaauguc ugcugcuug ggu

23

<210> 37
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 37
 aagcaagcag acauuuauuc 19

<210> 38
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 38
 gauaaauguc ugcugcuug g 21

<210> 39
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 39
 aagcaagcag acauuuauuc 19

<210> 40
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 40
 gauaaauguc ugcugcuug g 21

<210> 41
 <211> 19

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 41
aagcaagcag acauuuuau c 19

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

<220>
<223> siARN

<400> 42
gauaaauguc ugcugcuug g 21

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

<220>
<223> siARN

<400> 43
ccaagcaagc agacauuuau c 21

<210> 44
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 44
gauaaauguc ugcugcuug ggu 23

<210> 45
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 45

gauaaauguc ugcugcuug ggu

23

<210> 46

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 46

gauaaauguc ugcugcuug ggu

23

<210> 47

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 47

ccaagcaagc agacauuuau c

21

<210> 48

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 48

gauaaauguc ugcugcuug ggu

23

<210> 49

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 49

aagcaagcag acauuuauuc

19

<210> 50

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 50

gauaaauguc ugcugcuug g

21

<210> 51

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 51

aagcaagcag acauuuauuc

19

<210> 52

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 52

gauaaauguc ugcugcuug g

21

<210> 53

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 53
aagcaagcag acauuuuau c 19

<210> 54
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 54
gauaaauguc ugcugcuug g 21

<210> 55
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 55
ccaagcaagc agacauuuau c 21

<210> 56
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 56
gauaaauguc ugcugcuug ggu 23

<210> 57
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 57
ccaagcaagc agacauuuau c 21

<210> 58
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 58
 gauaaauguc ugcugcuug ggu 23

<210> 59
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 59
 ccaagcaagc agacauuuau c 21

<210> 60
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 60
 gauaaauguc ugcugcuug ggu 23

<210> 61
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 61
 uuuguagcau uuuuauuaa 19

<210> 62

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

<220>
<223> siARN

<400> 62
uuaauaaaaa ugcuacaaa 19

<210> 63
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 63
uuuguagcau uuuuauuan 19

<210> 64
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 64
nuaauaaaaa ugcuacaaa 19

<210> 65
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 65
uuuguagcau uuuuauuan 19

<210> 66
<211> 21
<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 66

nuaauaaaaa ugcuacaaaa c

21

<210> 67

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 67

guuuuguagc auuuuuauua n

21

<210> 68

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 68

nuaauaaaaa ugcuacaaaa ccc

23

<210> 69

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 69

uuuguagcau uuuuauuaa

19

<210> 70

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 70

uuaauaaaaa ugcuacaaaa c

21

<210> 71

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 71

guuuuguagc auuuuuauua a

21

<210> 72

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 72

uuaauaaaaa ugcuacaaaa ccc

23

<210> 73

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 73

uuuguagcau uuuuauuaa

19

<210> 74

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 74
uuaauaaaaa ugcuaaaaa c 21

<210> 75
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 75
uuuguagcau uuuuauuaa 19

<210> 76
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 76
uuaauaaaaa ugcuaaaaa c 21

<210> 77
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 77
uuuguagcau uuuuauuaa 19

<210> 78
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 78

uuaauaaaaa ugcuacaaaa c

21

<210> 79

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 79

guuuuguagc auuuuuauua a

21

<210> 80

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 80

uuaauaaaaa ugcuacaaaa ccc

23

<210> 81

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 81

guuuuguagc auuuuuauua a

21

<210> 82

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 82

uuaauaaaaa ugcuacaaaa ccc

23

<210> 83
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 83
guuuuguagc auuuuuauua a 21

<210> 84
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 84
uuaauaaaaa ugcuaaaaaa ccc 23

<210> 85
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 85
uuuguagcau uuuuauuaa 19

<210> 86
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 86
uuaauaaaaa ugcuaaaaaa c 21

<210> 87
<211> 19

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 87
uuuguagcau uuuuauuaa 19

<210> 88
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 88
uuaauaaaaa ugcuaaaaa c 21

<210> 89
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 89
uuuguagcau uuuuauuaa 19

<210> 90
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 90
uuaauaaaaa ugcuaaaaa c 21

<210> 91
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 91

guuuuguagc auuuuuauua a

21

<210> 92

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 92

uuaauaaaaa ugcuaaaaaa ccc

23

<210> 93

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 93

guuuuguagc auuuuuauua a

21

<210> 94

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 94

uuaauaaaaa ugcuaaaaaa ccc

23

<210> 95

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 95

guuuuguagc auuuuuauua a

21

<210> 96

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 96

uuaauaaaaa ugcuaaaaaa ccc

23

<210> 97

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 97

uuuguagcau uuuuauuaa

19

<210> 98

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 98

uuaauaaaaa ugcuaaaaaa c

21

<210> 99

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 99
uuuguagcau uuuuauuaa 19

<210> 100
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 100
uuaauaaaaa ugcuaaaaa c 21

<210> 101
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 101
uuuguagcau uuuuauuaa 19

<210> 102
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 102
uuaauaaaaa ugcuaaaaa c 21

<210> 103
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 103
guuuuguagc auuuuuauua a 21

<210> 104
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 104
uuaauaaaaa ugcuacaaaa ccc

23

<210> 105
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 105
guuuuguagc auuuuuauua a

21

<210> 106
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 106
uuaauaaaaa ugcuacaaaa ccc

23

<210> 107
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 107
guuuuguagc auuuuuauua a

21

<210> 108

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

<220>
<223> siARN

<400> 108
uuaauaaaaa ugcuacaaaa ccc

23

<210> 109
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 109
uuuguagcau uuuuauuaa

19

<210> 110
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 110
uuaauaaaaa ugcuacaaaa c

21

<210> 111
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 111
uuuguagcau uuuuauuaa

19

<210> 112
<211> 21
<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 112

uuaauaaaaa ugcuacaaaa c

21

<210> 113

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 113

uuuguagcau uuuuauuaa

19

<210> 114

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 114

uuaauaaaaa ugcuacaaaa c

21

<210> 115

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 115

guuuuguagc auuuuuauua a

21

<210> 116

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 116

uuaauaaaaa ugcuacaaaa ccc

23

<210> 117

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 117

guuuuguagc auuuuuauua a

21

<210> 118

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 118

uuaauaaaaa ugcuacaaaa ccc

23

<210> 119

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 119

guuuuguagc auuuuuauua a

21

<210> 120

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 120
uuaauaaaaa ugcuacaaaaa ccc 23

<210> 121
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 121
gccuggaguu uauucggaa 19

<210> 122
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 122
uuccgaauaa acuccaggc 19

<210> 123
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 123
gccuggaguu uauucggan 19

<210> 124
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 124

nuccgaauaa acuccaggc

19

<210> 125

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 125

gccuggaguu uauucggan

19

<210> 126

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 126

nuccgaauaa acuccaggcc u

21

<210> 127

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 127

aggccuggag uuauucgga n

21

<210> 128

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 128

nuccgaauaa acuccaggcc uau

23

<210> 129
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 129
 gccuggaguu uauucggaa 19

<210> 130
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 130
 uuccgaauaa acuccaggcc u 21

<210> 131
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 131
 aggccuggag uuauucgga a 21

<210> 132
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 132
 uuccgaauaa acuccaggcc uau 23

<210> 133
 <211> 19

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 133
gccuggaguu uauucggaa 19

<210> 134
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 134
uuccgaauaa acuccaggcc u 21

<210> 135
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 135
gccuggaguu uauucggaa 19

<210> 136
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 136
uuccgaauaa acuccaggcc u 21

<210> 137
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 137

gccuggaguu uauucggaa

19

<210> 138

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 138

uuccgaauaa acuccaggcc u

21

<210> 139

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 139

aggccuggag uuauucgga a

21

<210> 140

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 140

uuccgaauaa acuccaggcc uau

23

<210> 141

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 141

aggccuggag uuuaucgga a

21

<210> 142

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 142

uuccgaauaa acuccaggcc uau

23

<210> 143

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 143

aggccuggag uuuaucgga a

21

<210> 144

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 144

uuccgaauaa acuccaggcc uau

23

<210> 145

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 145
gccuggaguu uauucggaa 19

<210> 146
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 146
uuccgaauaa acuccaggcc u 21

<210> 147
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 147
gccuggaguu uauucggaa 19

<210> 148
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 148
uuccgaauaa acuccaggcc u 21

<210> 149
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 149
gccuggaguu uauucggaa 19

<210> 150
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 150
uuccgaauaa acuccaggcc u

21

<210> 151
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 151
aggccuggag uuauucgga a

21

<210> 152
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 152
uuccgaauaa acuccaggcc uau

23

<210> 153
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 153
aggccuggag uuauucgga a

21

<210> 154

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

<220>
<223> siARN

<400> 154
uuccgaauaa acuccaggcc uau

23

<210> 155
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 155
aggccuggag uuauucgga a

21

<210> 156
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 156
uuccgaauaa acuccaggcc uau

23

<210> 157
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 157
gccuggaguu uauucggaa

19

<210> 158
<211> 21
<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 158

uuccgaauaa acuccaggcc u

21

<210> 159

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 159

gccuggaguu uauucggaa

19

<210> 160

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 160

uuccgaauaa acuccaggcc u

21

<210> 161

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 161

gccuggaguu uauucggaa

19

<210> 162

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 162

uuccgaauaa acuccaggcc u

21

<210> 163

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 163

aggccuggag uuauucgga a

21

<210> 164

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 164

uuccgaauaa acuccaggcc uau

23

<210> 165

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 165

aggccuggag uuauucgga a

21

<210> 166

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 166
uuccgaauaa acuccaggcc uau 23

<210> 167
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 167
aggccuggag uuuaucgga a 21

<210> 168
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 168
uuccgaauaa acuccaggcc uau 23

<210> 169
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 169
gccuggagu uauucggaa 19

<210> 170
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 170

uuccgaauaa acuccaggcc u 21

<210> 171
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 171
gccuggaguu uauucggaa 19

<210> 172
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 172
uuccgaauaa acuccaggcc u 21

<210> 173
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 173
gccuggaguu uauucggaa 19

<210> 174
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 174
uuccgaauaa acuccaggcc u 21

<210> 175
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 175
aggccuggag uuuaauucgga a

21

<210> 176
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 176
uuccgaauaa acuccaggcc uau

23

<210> 177
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 177
aggccuggag uuuaauucgga a

21

<210> 178
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 178
uuccgaauaa acuccaggcc uau

23

<210> 179
<211> 21

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 179
aggccuggag uuuaucgga a 21

<210> 180
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 180
uuccgaauaa acuccaggcc uau 23

<210> 181
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 181
cuguuuugcu uuuguaacu 19

<210> 182
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 182
aguuacaaaa gcaaaacag 19

<210> 183
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 183

cuguuuugcu uuuguaacn

19

<210> 184

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 184

nguuacaaaa gcaaaacag

19

<210> 185

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 185

cuguuuugcu uuuguaacn

19

<210> 186

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 186

nguuacaaaa gcaaaacagg u

21

<210> 187

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 187

accuguuuug cuuuuguaac n

21

<210> 188

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 188

nguuacaaaa gcaaaacagg ucu

23

<210> 189

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 189

cuguuuugcu uuuguaacu

19

<210> 190

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 190

aguuacaaaa gcaaaacagg u

21

<210> 191

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 191
accuguuuug cuuuuguaac u 21

<210> 192
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 192
aguuacaaaa gcaaaacagg ucu 23

<210> 193
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 193
cuguuuugcu uuuguaacu 19

<210> 194
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 194
aguuacaaaa gcaaaacagg u 21

<210> 195
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 195
cuguuuugcu uuuguaacu 19

<210> 196
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 196
aguuacaaaa gcaaaacagg u 21

<210> 197
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 197
cuguuuugcu uuuguaacu 19

<210> 198
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 198
aguuacaaaa gcaaaacagg u 21

<210> 199
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 199
accuguuuug cuuuuguaac u 21

<210> 200

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

<220>
<223> siARN

<400> 200
aguuacaaaa gcaaaacagg ucu 23

<210> 201
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 201
accuguuuug cuuuuguaac u 21

<210> 202
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 202
aguuacaaaa gcaaaacagg ucu 23

<210> 203
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 203
accuguuuug cuuuuguaac u 21

<210> 204
<211> 23
<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 204

aguuacaaaa gcaaaacagg ucu

23

<210> 205

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 205

cuguuuugcu uuuguaacu

19

<210> 206

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 206

aguuacaaaa gcaaaacagg u

21

<210> 207

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 207

cuguuuugcu uuuguaacu

19

<210> 208

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 208

aguuacaaaa gcaaaacagg u

21

<210> 209

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 209

cuguuuugcu uuuguaacu

19

<210> 210

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 210

aguuacaaaa gcaaaacagg u

21

<210> 211

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 211

accuguuuug cuuuuguaac u

21

<210> 212

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 212
aguuacaaaa gcaaaacagg ucu 23

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

<220>
<223> siARN

<400> 213
accuguuuug cuuuuguaac u 21

<210> 214
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 214
aguuacaaaa gcaaaacagg ucu 23

<210> 215
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 215
accuguuuug cuuuuguaac u 21

<210> 216
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 216

aguuacaaaa gcaaaacagg ucu

23

<210> 217

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 217

cuguuuugcu uuuguaacu

19

<210> 218

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 218

aguuacaaaa gcaaaacagg u

21

<210> 219

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 219

cuguuuugcu uuuguaacu

19

<210> 220

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 220

aguuacaaaa gcaaaacagg u

21

<210> 221
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 221
 cuguuuugcu uuuguaacu 19

<210> 222
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 222
 aguuacaaaa gcaaaacagg u 21

<210> 223
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 223
 accuguuuug cuuuuguaac u 21

<210> 224
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 224
 aguuacaaaa gcaaaacagg ucu 23

<210> 225
 <211> 21

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 225
accuguuuug cuuuuguaac u 21

<210> 226
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 226
aguuacaaaa gcaaaacagg ucu 23

<210> 227
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 227
accuguuuug cuuuuguaac u 21

<210> 228
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 228
aguuacaaaa gcaaaacagg ucu 23

<210> 229
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 229

cuguuuugcu uuuguaacu

19

<210> 230

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 230

aguuacaaaa gcaaaacagg u

21

<210> 231

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 231

cuguuuugcu uuuguaacu

19

<210> 232

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 232

aguuacaaaa gcaaaacagg u

21

<210> 233

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 233

cuguuuugcu uuuguaacu

19

<210> 234

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 234

aguuacaaaa gcaaaacagg u

21

<210> 235

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 235

accuguuuug cuuuuguaac u

21

<210> 236

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 236

aguuacaaaa gcaaaacagg ucu

23

<210> 237

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 237
 accuguuuug cuuuuguaac u 21

<210> 238
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 238
 aguuacaaaa gcaaaacagg ucu 23

<210> 239
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 239
 accuguuuug cuuuuguaac u 21

<210> 240
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 240
 aguuacaaaa gcaaaacagg ucu 23

<210> 241
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 241
 gguuuuguag cauuuuuau 19

<210> 242
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 242
auaaaaaugc uacaaaacc 19

<210> 243
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 243
gguuuuguag cauuuuuan 19

<210> 244
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 244
nuaaaaaugc uacaaaacc 19

<210> 245
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 245
gguuuuguag cauuuuuan 19

<210> 246

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

<220>
 <223> siARN

<400> 246
 nuaaaaaugc uacaaaaccc a 21

<210> 247
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 247
 uggguuuugu agcauuuuua n 21

<210> 248
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 248
 nuaaaaaugc uacaaaaccc aga 23

<210> 249
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 249
 gguuuuguag cauuuuuau 19

<210> 250
 <211> 21
 <212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 250

auaaaaaugc uacaaaaccc a

21

<210> 251

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 251

uggguuuugu agcauuuuua u

21

<210> 252

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 252

auaaaaaugc uacaaaaccc aga

23

<210> 253

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 253

gguuuuguag cauuuuuau

19

<210> 254

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 254

auaaaaaugc uacaaaaccc a

21

<210> 255

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 255

gguuuuguag cauuuuuau

19

<210> 256

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 256

auaaaaaugc uacaaaaccc a

21

<210> 257

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 257

gguuuuguag cauuuuuau

19

<210> 258

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 258
auaaaaaugc uacaaaaccc a 21

<210> 259
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 259
uggguuuugu agcauuuuua u 21

<210> 260
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 260
auaaaaaugc uacaaaaccc aga 23

<210> 261
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 261
uggguuuugu agcauuuuua u 21

<210> 262
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 262

auaaaaaugc uacaaaaccc aga

23

<210> 263

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 263

uggguuuugu agcauuuuua u

21

<210> 264

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 264

auaaaaaugc uacaaaaccc aga

23

<210> 265

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 265

gguuuuguag cauuuuuau

19

<210> 266

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 266

auaaaaaugc uacaaaaccc a

21

<210> 267
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 267
gguuuuguag cauuuuuau 19

<210> 268
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 268
auaaaaaugc uacaaaaccc a 21

<210> 269
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 269
gguuuuguag cauuuuuau 19

<210> 270
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 270
auaaaaaugc uacaaaaccc a 21

<210> 271
<211> 21

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 271
uggguuuugu agcauuuuua u 21

<210> 272
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 272
auaaaaaugc uacaaaaccc aga 23

<210> 273
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 273
uggguuuugu agcauuuuua u 21

<210> 274
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 274
auaaaaaugc uacaaaaccc aga 23

<210> 275
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 275

uggguuuugu agcauuuuua u

21

<210> 276

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 276

auaaaaaugc uacaaaaccc aga

23

<210> 277

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 277

gguuuuuguag cauuuuuau

19

<210> 278

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 278

auaaaaaugc uacaaaaccc a

21

<210> 279

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 279

gguuuuguag cauuuuuau

19

<210> 280

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 280

auaaaaaugc uacaaaaccc a

21

<210> 281

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 281

gguuuuguag cauuuuuau

19

<210> 282

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 282

auaaaaaugc uacaaaaccc a

21

<210> 283

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 283
uggguuuugu agcauuuuua u 21

<210> 284
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 284
auaaaaaugc uacaaaaccc aga 23

<210> 285
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 285
uggguuuugu agcauuuuua u 21

<210> 286
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 286
auaaaaaugc uacaaaaccc aga 23

<210> 287
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 287
uggguuuugu agcauuuuua u 21

<210> 288
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 288
auaaaaaugc uacaaaaccc aga

23

<210> 289
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 289
gguuuuguag cauuuuuau

19

<210> 290
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 290
auaaaaaugc uacaaaaccc a

21

<210> 291
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 291
gguuuuguag cauuuuuau

19

<210> 292

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

<220>
<223> siARN

<400> 292
auaaaaaavgc uacaaaaccc a 21

<210> 293
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 293
gguuuuguag cauuuuuau 19

<210> 294
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 294
auaaaaaavgc uacaaaaccc a 21

<210> 295
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 295
uggguuuugu agcauuuuua u 21

<210> 296
<211> 23
<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 296

auaaaaaugc uacaaaaccc aga

23

<210> 297

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 297

uggguuuugu agcauuuuua u

21

<210> 298

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 298

auaaaaaugc uacaaaaccc aga

23

<210> 299

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 299

uggguuuugu agcauuuuua u

21

<210> 300

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 300

auaaaaaugc uacaaaaccc aga

23

<210> 301

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 301

gugacuuuuu aaaauaaaa

19

<210> 302

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 302

uuuuuuuuua aaaagucac

19

<210> 303

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 303

gugacuuuuu aaaauaaan

19

<210> 304

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 304
nuuuauuuua aaaagucac 19

<210> 305
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 305
gugacuuuuu aaaauaaan 19

<210> 306
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 306
nuuuauuuua aaaagucacc a 21

<210> 307
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 307
uggugacuuu uuaaaauaaa n 21

<210> 308
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 308

nuuuauuuua aaaagucacc aua

23

<210> 309

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 309

gugacuuuuu aaaauaaaa

19

<210> 310

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 310

uuuuauuuua aaaagucacc a

21

<210> 311

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 311

uggugacuuu uuaaaauaaaa a

21

<210> 312

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 312

uuuuauuuua aaaagucacc aua

23

<210> 313
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 313
gugacuuuuu aaaauaaaa

19

<210> 314
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 314
uuuuuuuuua aaaagucacc a

21

<210> 315
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 315
gugacuuuuu aaaauaaaa

19

<210> 316
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 316
uuuuuuuuua aaaagucacc a

21

<210> 317
<211> 19

<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 317
gugacuuuuu aaaauaaaa 19

<210> 318
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 318
uuuuauuuua aaaagucacc a 21

<210> 319
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 319
uggugacuuu uuaaaauaaa a 21

<210> 320
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 320
uuuuauuuua aaaagucacc aua 23

<210> 321
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 321

uggugacuuu uuaaaauaaa a

21

<210> 322

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 322

uuuuauuuua aaaagucacc aua

23

<210> 323

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 323

uggugacuuu uuaaaauaaa a

21

<210> 324

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 324

uuuuauuuua aaaagucacc aua

23

<210> 325

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 325

gugacuuuuu aaaauaaaa

19

<210> 326

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 326

uuuuauuuua aaaagucacc a

21

<210> 327

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 327

gugacuuuuu aaaauaaaa

19

<210> 328

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 328

uuuuauuuua aaaagucacc a

21

<210> 329

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 329
gugacuuuuu aaaauaaaa 19

<210> 330
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 330
uuuuuuuuu aaaagucacc a 21

<210> 331
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 331
uggugacuuu uuaaaauaaa a 21

<210> 332
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 332
uuuuuuuuu aaaagucacc aua 23

<210> 333
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 333
uggugacuuu uuaaaauaaa a 21

<210> 334
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 334
uuuuuuuuua aaaagucacc aua 23

<210> 335
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 335
uggugacuuu uaaaauaaa a 21

<210> 336
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 336
uuuuuuuuua aaaagucacc aua 23

<210> 337
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 337
gugacuuuuu aaaauaaaa 19

<210> 338

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

<220>
<223> siARN

<400> 338
uuuuauuuua aaaagucacc a 21

<210> 339
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 339
gugacuuuuu aaaauaaaa 19

<210> 340
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 340
uuuuauuuua aaaagucacc a 21

<210> 341
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 341
gugacuuuuu aaaauaaaa 19

<210> 342
<211> 21
<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 342

uuuuuuuuua aaaagucacc a

21

<210> 343

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 343

uggugacuuu uuaaaauaaa a

21

<210> 344

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 344

uuuuuuuuua aaaagucacc aua

23

<210> 345

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 345

uggugacuuu uuaaaauaaa a

21

<210> 346

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 346

uuuuuuuuua aaaagucacc aua

23

<210> 347

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 347

uggugacuuu uaaaaauaaa a

21

<210> 348

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 348

uuuuuuuuua aaaagucacc aua

23

<210> 349

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 349

gugacuuuuu aaaauaaaa

19

<210> 350

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 350
uuuuuuuuua aaaagucacc a 21

<210> 351
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 351
gugacuuuuu aaaauaaaa 19

<210> 352
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 352
uuuuuuuuua aaaagucacc a 21

<210> 353
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 353
gugacuuuuu aaaauaaaa 19

<210> 354
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 354

uuuuuuuuua aaaagucacc a 21

<210> 355
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 355
uggugacuuu uuaaaauaaa a 21

<210> 356
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 356
uuuuuuuuua aaaagucacc aua 23

<210> 357
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 357
uggugacuuu uuaaaauaaa a 21

<210> 358
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 358
uuuuuuuuua aaaagucacc aua 23

<210> 359
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 359
uggugacuuu uuaaaaauaaa a

21

<210> 360
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 360
uuuuauuuua aaaagucacc aua

23

<210> 361
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 361
aagcaagcag acauuuuau

19

<210> 362
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 362
gauaaauguc ugcugcuug g

21

<210> 363
<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 363

uuuguagcau uuuuauuaa

19

<210> 364

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 364

uuaauaaaaa ugcuaaaaa c

21

<210> 365

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 365

gccuggaguu uauucggaa

19

<210> 366

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 366

uuccgaauaa acuccaggcc u

21

<210> 367

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 367

cuguuuugcu uuuguaacu

19

<210> 368

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 368

aguuacaaaa gcaaaacagg u

21

<210> 369

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 369

gguuuuguag cauuuuuau

19

<210> 370

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 370

auaaaaaugc uacaaaaccc a

21

<210> 371

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 371

gugacuuuuu aaaauaaaa

19

<210> 372

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 372

uuuuuuuuu aaaagucacc a

21

<210> 373

<211> 491

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN

<400> 373

ggcgtgcctg ccaagctcac acagcaggaa ctgagccaga aacgcagatt gggctggctc
tgaagccaag cctcttctta cttcaccggt ctgggctcct cattttttacg ggtaacagtg
aggctgggaa ggggaacaca gaccaggaag ctcggtgagt gatggcagaa cgatgcctgc
aggcatggaa cttttttccgt tatcaccag gcctgattca ctggcctggc ggagatgctt
ctaaggcatg gtcgggggag agggccaaca actgtccctc cttgagcacc agccccaccc
aagcaagcag acattttatct tttgggtctg tcctctctgt tgccttttta cagccaactt
ttctagacct gttttgcttt tgtaacttga agatatttat tctgggtttt gtagcatttt
tattaatatg gtgacttttt aaaataaaaa caaacaacg ttgtcctaac aaaaaaaaaa
aaaaaaaaa a

60

120

180

240

300

360

420

480

491

<210> 374

<211> 590

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN

<400> 374

gcgtggccaa gggtgccagc atgcgcagcc tgcgcgtgct caactgccaa ggggaagggca
cggtttagcgg caccctcata ggcctggagt ttattcggaa aagccagctg gtccagcctg

60

120

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-----|
| tgggggccact | ggtggtgctg | ctgcccctgg | cggggtgggta | cagccgcgtc | ctcaacgccg | 180 |
| cctgccagcg | cctggcgagg | gctgggggtcg | tgctgggtcac | cgctgccggc | aacttccggg | 240 |
| acgatgcctg | cctctactcc | ccagcctcag | ctcccagagg | catcacagtt | ggggccacca | 300 |
| atgcccaaga | ccagccgggtg | accctggggga | ctttgggggac | caactttggc | cgctgtgtgg | 360 |
| acctctttgc | cccaggggag | gacatcattg | gtgcctccag | cgactgcagc | acctgctttg | 420 |
| tgtcacagag | tgggacatca | caggctgctg | cccacgtggc | tggcattgca | gccatgatgc | 480 |
| tgtctgccga | gccggagctc | accctggccg | agttgaggca | gagactgatc | cacttctctg | 540 |
| ccaaagatgt | catcaatgag | gcctgggttc | ctgaggacca | gcgggtactg | | 590 |

<210> 375

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN

<400> 375

gataaatgtc tgcttgcttg g 21

<210> 376

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN

<400> 376

ttaataaaaa tgctacaaaa c 21

<210> 377

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN

<400> 377

ttccgaataa actccaggcc t 21

<210> 378

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN

<400> 378

agttacaaaa gcaaaacagg t

21

<210> 379

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN

<400> 379

ataaaaatgc tacaaaaccc a

21

<210> 380

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN

<400> 380

ttttatttta aaaagtcacc a

21

<210> 381

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN

<400> 381

aacctaccta ctccatttat c

21

<210> 382

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN

<400> 382

tgggggtgcta cggtttatta a

21

<210> 383

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN

<400> 383

cttaagttct gggattcgga a

21

<210> 384

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN

<400> 384

caagtgggggt aggttgtaac t

21

<210> 385

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN

<400> 385

gtttgggggtg ctaattttta t

21

<210> 386

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN

<400> 386
gttggtcaggg ggcaaataaa a 21

<210> 387
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN

<400> 387
tcgcccgtga ggcttgcttt t 21

<210> 388
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN

<400> 388
ggccgcccc ggctacaaac a 21

<210> 389
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN

<400> 389
ggaatccgcc cctccaggca g 21

<210> 390
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN

<400> 390
ctggcacccc tcaaacaggt g 21

<210> 391
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN

<400> 391
cgcccccgta gacaaaacca c 21

<210> 392
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN

<400> 392
ggggcggggc caaagtcaca c 21

<210> 393
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 393
gaaggggaac acagaccagg 20

<210> 394
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi

<400> 394
ctccatcagg ccacagtga 20

<210> 395

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 395
 gggagccaaa agggatcatca 20

<210> 396
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 396
 cgtggactgt ggcatgagt 20

<210> 397
 <211> 22
 <212> ADN/ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 397
 cuagaccugu dtuugcuuuu gu 22

<210> 398
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 398
 acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 399
 <211> 19
 <212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 399

agaccuguuu ugcuuuugu

19

<210> 400

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 400

acaaaagcaa aacaggucu

19

<210> 401

<211> 20

<212> ADN/ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 401

agaccugudt ugcuuuugn

20

<210> 402

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 402

ncaaaagcaa aacaggucu

19

<210> 403

<211> 20

<212> ADN/ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 403

agaccugudt uugcuuuugn

20

<210> 404

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 404

ncaaaaagcaa aacaggucua g

21

<210> 405

<211> 22

<212> ADN/ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 405

cuagaccugu dtuugcuuuu gn

22

<210> 406

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 406

ncaaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 407

<211> 20

<212> ADN/ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

| | |
|---------------------------|----|
| <400> 407 | |
| agaccugudt uugcuuuugu | 20 |
| <210> 408 | |
| <211> 21 | |
| <212> ARN | |
| <213> Trình tự nhân tạo | |
| <220> | |
| <223> siARN | |
| <400> 408 | |
| acaaaagcaa aacaggucua g | 21 |
| <210> 409 | |
| <211> 22 | |
| <212> ADN/ARN | |
| <213> Trình tự nhân tạo | |
| <220> | |
| <223> siARN | |
| <400> 409 | |
| cuagaccugu dtuugcuuuu gu | 22 |
| <210> 410 | |
| <211> 23 | |
| <212> ARN | |
| <213> Trình tự nhân tạo | |
| <220> | |
| <223> siARN | |
| <400> 410 | |
| acaaaagcaa aacaggucua gaa | 23 |
| <210> 411 | |
| <211> 20 | |
| <212> ADN/ARN | |
| <213> Trình tự nhân tạo | |
| <220> | |
| <223> siARN | |
| <400> 411 | |

agaccugudt uugcuuuugu

20

<210> 412

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 412

acaaaagcaa aacaggucua g

21

<210> 413

<211> 22

<212> ADN/ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 413

cuagaccugu dtuugcuuuu gu

22

<210> 414

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 414

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

<210> 415

<211> 20

<212> ADN/ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 415

agaccugudt uugcuuuugu

20

<210> 416
<211> 21
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 416
acaaaagcaa aacaggucua g 21

<210> 417
<211> 22
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 417
cuagaccugu dtuugcuuuu gu 22

<210> 418
<211> 23
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 418
acaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 419
<211> 20
<212> ADN/ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> siARN

<400> 419
agaccugudt uugcuuuugu 20

<210> 420
<211> 21

<212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 420
 acaaaaagcaa aacaggucua g 21

<210> 421
 <211> 22
 <212> ADN/ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 421
 cuagaccugu dtuugcuuuu gu 22

<210> 422
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 422
 acaaaaagcaa aacaggucua gaa 23

<210> 423
 <211> 20
 <212> ADN/ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> siARN

<400> 423
 agaccugudt uugcuuuugu 20

<210> 424
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 424

acaaaagcaa aacaggucua g

21

<210> 425

<211> 22

<212> ADN/ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 425

cuagaccugu dtuugcuuuu gu

22

<210> 426

<211> 23

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> siARN

<400> 426

acaaaagcaa aacaggucua gaa

23

Hoạt tính còn lại
tương đối của
Renilla (%)

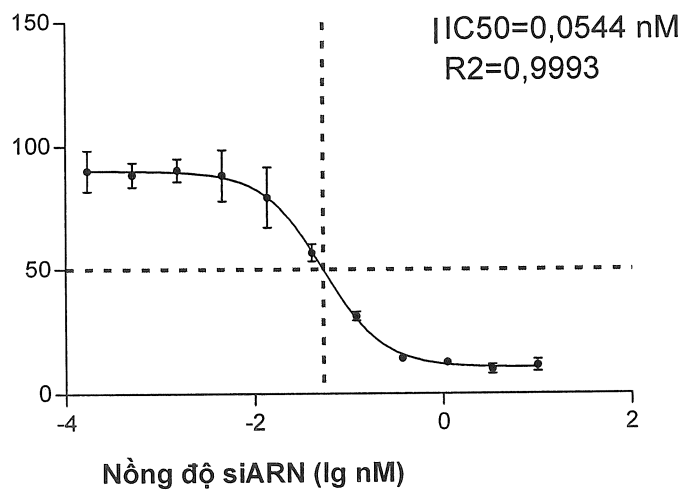


Fig.1A

Hoạt tính còn lại
tương đối của
Renilla (%)

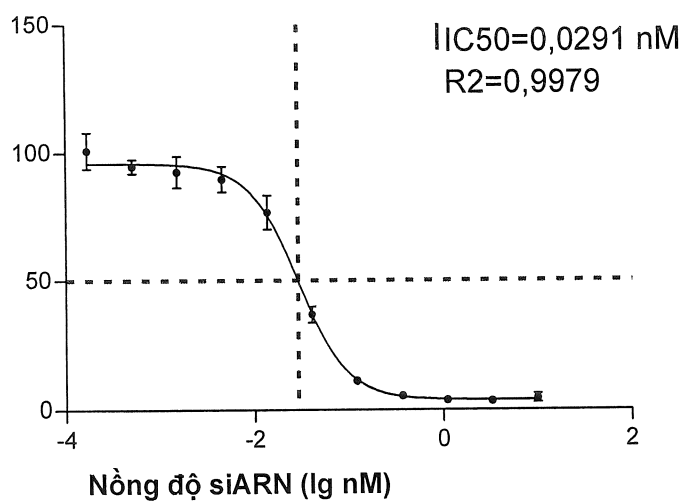


Fig.1B

Hoạt tính còn lại
tương đối của
Renilla (%)

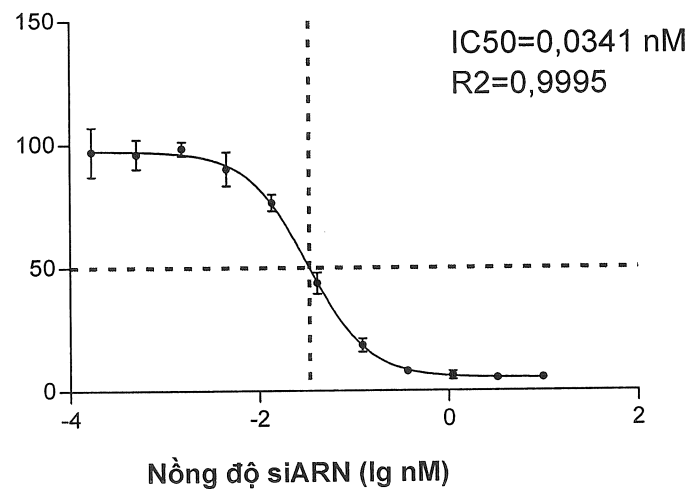


Fig.1C

Hoạt tính còn lại
tương đối của
Renilla (%)

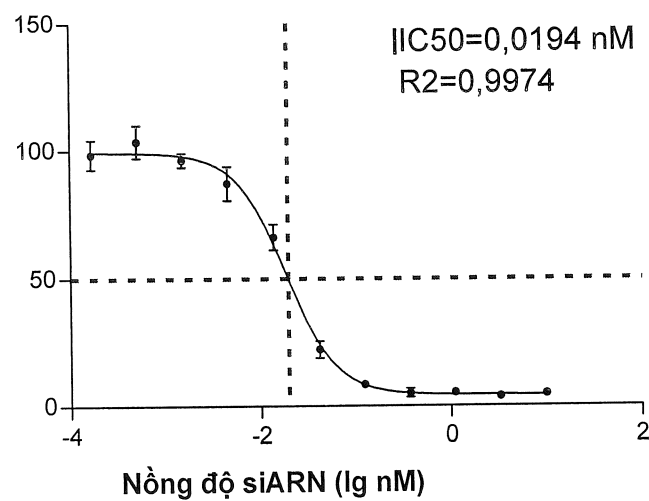


Fig.1D

Hoạt tính còn lại
tương đối của
Renilla (%)

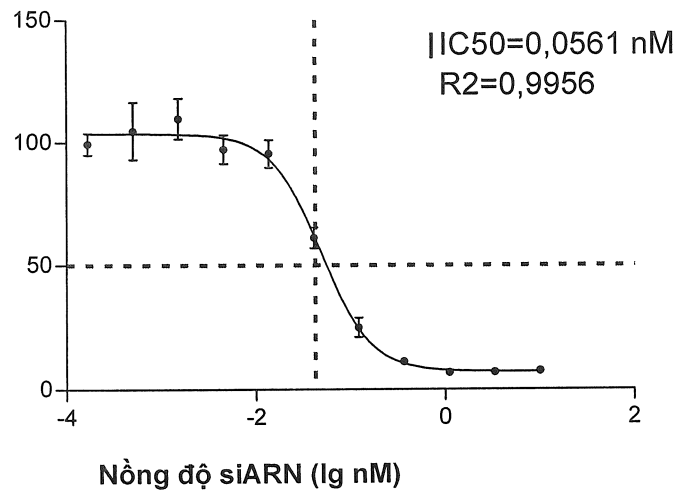


Fig.1E

Hoạt tính còn lại
tương đối của
Renilla (%)

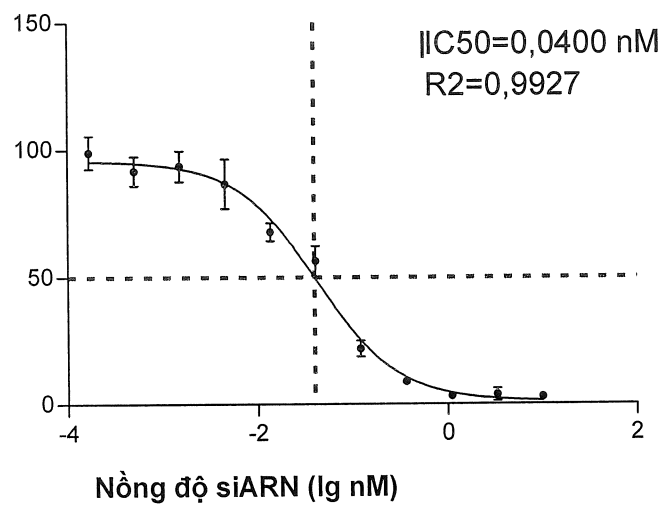


Fig.1F

Lượng protein PCSK9 đã
chuẩn hóa (% , được
chuẩn hóa trước khi sử
dụng)

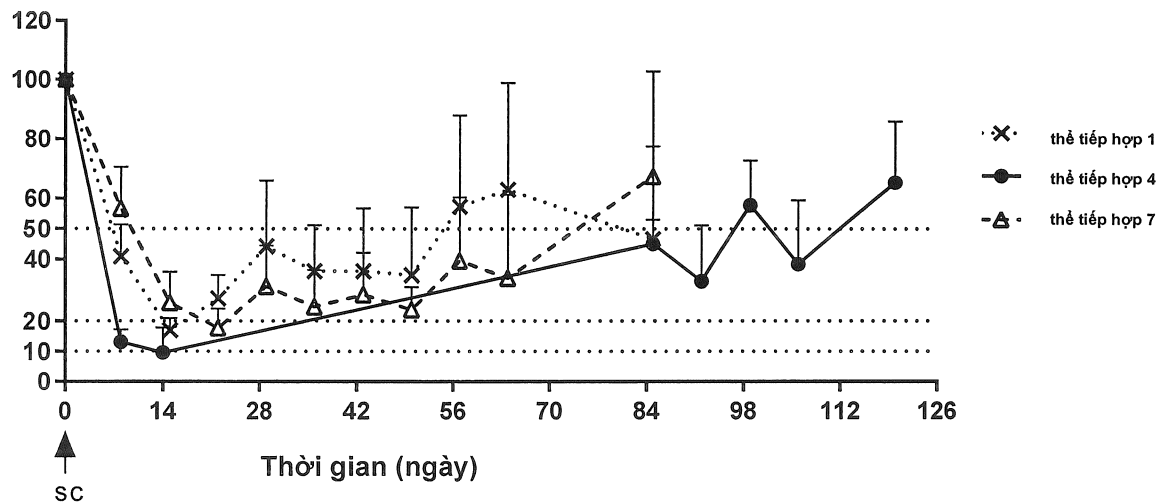


Fig.2

Lượng LDL-c được
chuẩn hóa (% , được
chuẩn hóa trước khi
sử dụng)

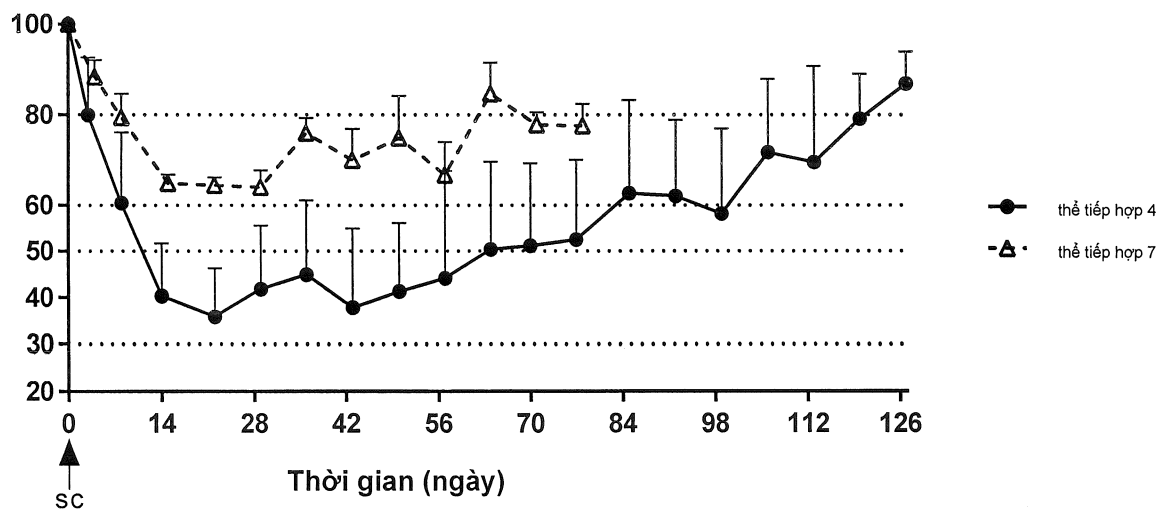


Fig.3

Lượng CHO được
chuẩn hóa (% , được
chuẩn hóa trước khi
sử dụng)

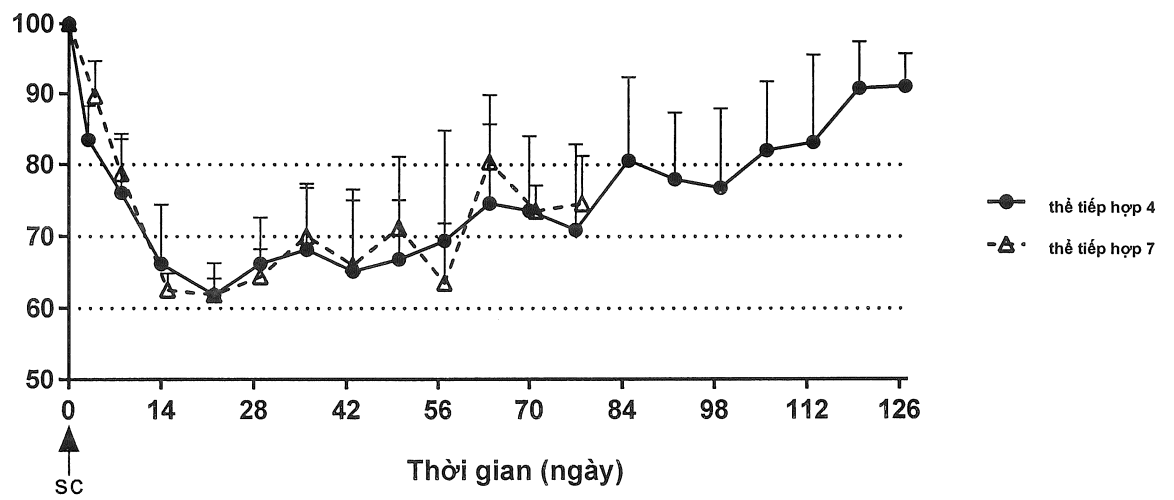


Fig.4