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

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

(11) **1-0052561**

(51)[7] **A61K 31/713**

(13) **B**

(21) 1-2017-01700 (22) 09/10/2015
(86) PCT/US2015/054881 09/10/2015 (87) WO 2016/057893 14/04/2016
(30) 62/062,751 10/10/2014 US; 62/147,976 15/04/2015 US; 62/214,602 04/09/2015 US
(45) 27/10/2025 451 (43) 25/05/2018 362A
(73) ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. (US)
300 Third Street, Cambridge, MA 02142, United States of America
(72) QUERBES, William (US); FITZGERALD, Kevin (US); BETTENCOURT, Brian (US); LIEBOW, Abigail (US); ERBE, David, V. (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHẤT CAN THIỆP ARN (RNAI) SỢI KÉP CÓ TÁC DỤNG ỨC CHẾ SỰ BIỂU HIỆN GEN HAO1 (HYDROXYAXIT OXIDAZA 1 (GLYCOLAT OXIDAZA)), CHẾ PHẨM VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ

(21) 1-2017-01700

(57) Sáng chế đề cập đến tác nhân ARNi, ví dụ tác nhân ARNi sợi kép, có tác dụng ức chế sự biểu hiện gen HAO1 (hydroxyaxit oxidaza 1 (glycolat oxidaza)). Tác nhân ARNi theo sáng chế có gần như tất cả các nucleotit được biến đổi có tác dụng ức chế gen HAO1 trong tế bào, chẳng hạn như tế bào ở đối tượng, ví dụ, động vật có vú, chẳng hạn như người mắc rối loạn có liên quan đến HAO1. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm và dược phẩm chứa tác nhân ARNi nêu trên.

(SEQ ID NO:1).
>gi|11184232|ref|NM_017545.2| Hyđroyaxit oxiđaza (glycolat oxiđaza) 1 (HAO1)Homo sapiens, mARN
CTGGGATAGCAATAACCTGTGAAAATGCTCCCCCGGCTAATTTGTATCAATGATTATGAACAACATGCTA
AATCAGTACTTCCAAAGTCTATATATGACTATTACAGGTCTGGGGCAAATGATGAAGAAACTTTGGCTGA
TAATATTGCAGCATTTTCCAGATGGAAGCTGTATCCAAGGATGCTCCGGAATGTTGCTGAAACAGATCTG
TCGACTTCTGTTTTAGGACAGAGGGTCAGCATGCCAATATGTGTGGGGGCTACGGCCATGCAGCGCATGG
CTCATGTGGACGGCGAGCTTGCCACTGTGAGAGCCTGTCAGTCCCTGGGAACGGGCATGATGTTGAGTTC
CTGGGCCACCTCCTCAATTGAAGAAGTGGCGGAAGCTGGTCCTGAGGCACTTCGTTGGCTGCAACTGTAT
ATCTACAAGGACCGAGAAGTCACCAAGAAGCTAGTGCGGCAGGCAGAGAAGATGGGCTACAAGGCCATAT
TTGTGACAGTGGACACACCTTACCTGGGCAACCGTCTGGATGATGTGCGTAACAGATTCAAACTGCCGCC
ACAACTCAGGATGAAAAATTTTGAAACCAGTACTTTATCATTTTCTCCTGAGGAAAATTTTGGAGACGAC
AGTGGACTTGCTGCATATGTGGCTAAAGCAATAGACCCATCTATCAGCTGGGAAGATATCAAATGGCTGA
GAAGACTGACATCATTGCCAATTGTTGCAAAGGGCATTTTGAGAGGTGATGATGCCAGGGAGGCTGTTAA
ACATGGCTTGAATGGGATCTTGGTGTCGAATCATGGGGCTCGACAACTCGATGGGGTGCCAGCCACTATT
GATGTTCTGCCAGAAATTGTGGAGGCTGTGGAAGGGAAGGTGGAAGTCTTCCTGGACGGGGGTGTGCGGA
AAGGCACTGATGTTCTGAAAGCTCTGGCTCTTGGCGCCAAGGCTGTGTTTGTGGGGAGACCAATCGTTTG
GGGCTTAGCTTTCCAGGGGGAGAAAGGTGTTCAAGATGTCCTCGAGATACTAAAGGAAGAATTCCGGTTG
GCCATGGCTCTGAGTGGGTGCCAGAATGTGAAAGTCATCGACAAGACATTGGTGAGGAAAAATCCTTTGG
CCGTTTCCAAGATCTGACAGTGCACAATATTTTCCCATCTGTATTATTTTTTTTCAGCATGTATTACTTG
ACAAAGAGACACTGTGCAGAGGGTGACCACAGTCTGTAATTCCCCACTTCAATACAAAGGGTGTCGTTCT
TTTCCAACAAAATAGCAATCCCTTTTATTTCATTGCTTTTGACTTTTCAATGGGTGTCCTAGGAACCTTT
TAGAAAGAAATGGACTTTCATCCTGGAAATATATTAACTGTTAAAAAGAAAACATTGAAAATGTGTTTAG
ACAACGTCATCCCCTGGCAGGCTAAAGTGCTGTATCCTTTAGTAAAATTGGAGGTAGCAAACACTAAGGT
GAAAAGATAATGATCTCATTGTTTATTAACCTGTATTCTGTTTACATGTCTTTAAAACAGTGGTTCTTAA
ATTGTAAGCTCAGGTTCAAAGTGTTGGTAATGCCTGATTCACAACTTTGAGAAGGTAGCACTGGAGAGAA
TTGGAATGGGTGGCGGTAATTGGTGATACTTCTTTGAATGTAGATTTCCAATCACATCTTTAGTGTCTGA
ATATATCCAAATGTTTTAGGATGTATGTTACTTCTTAGAGAGAAATAAAGCATTTTTGGGAAGAAT

HÌNH 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến việc ức chế đặc hiệu sự biểu hiện của gen HAO1. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến tác nhân ARNi sợi kép có tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen HAO1 (hydroxyaxit oxidaza 1 (glycolat oxidaza)). Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm và dược phẩm chứa tác nhân này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chứng tăng oxalat niệu nguyên phát Typ 1 (PH1) là rối loạn lặn nhiễm sắc thể thường của sự chuyển hóa glyoxylat. Sự giải độc glyoxylat ở gan bị suy yếu do sự đột biến của gen AGXT, mà mã hóa cho enzym alanin-glyoxylat aminotransferaza (AGT) ở thể peroxi ở gan. AGT1 là enzym cuối cùng trong sự phá vỡ chuyển hóa của hyđroxyprolin. Sự mất chức năng AGT để biến đổi chất chuyển hóa trung gian glyoxylat thành glyxin gây ra sự tích lũy và sự khử glyoxylat thành glycolat mà được oxy hóa thành oxalat bằng enzym glycolat oxiđaza (GO), còn được gọi là hyđroxyaxit oxiđaza (HAO1).

Sự điều hòa của glyoxylat, tiền chất then chốt của oxalat, xảy ra ở nhiều vị trí trong tế bào bao gồm ty thể, thể peroxi và bào tương. Oxalat dư thừa ở bệnh nhân PH1 không thể được bài tiết hoàn toàn bởi thận dẫn đến sự tạo thành và sự lắng đọng của tinh thể canxi oxalat ở thận và đường tiết niệu. Sự tổn hại thận được gây ra bởi sự kết hợp của độc tố hình ống từ oxalat, chứng nhiễm canxi thận và sự tắc nghẽn thận bởi sỏi. Hơn 30% bệnh nhân tiến tới bệnh thận giai đoạn cuối (ESRD).

Gen HAO1 mã hóa cho enzym Hyđroxyaxit Oxiđaza 1, còn được gọi là Glycolat Oxiđaza ("GO"). Protein HAO1 được biểu hiện chủ yếu ở gan và là 2-hyđroxyaxit oxiđaza có hoạt tính nhất trên glycolat.

Ở mẫu chuột mắc PH1, khi gen AGT1 bị làm khuyết, hàm lượng oxalat trong nước tiểu được giảm đi khi gen HAO1 bị làm khuyết.

PH1, AGXT, và HAO1 được mô tả trong tài liệu dưới đây: Angel L. Pey, Armando Albert, và Eduardo Salido, "Protein Homeostasis Defects of Alanine-Glyoxylate

Aminotransferase: New Therapeutic Strategies in Primary Hyperoxaluria Type I," BioMed Research International, vol. 2013, Bài báo ID 687658, 15 trang, 2013. doi:10.1155/2013/687658; Cochat và Rumsby (2013) NEJM 369:7; Salido và cộng sự (2006) PNAS 103:18249; Baker và cộng sự (2004) American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology Công bố ngày 1 tháng 10 năm 2004 Vol. 287 no. 4, H1771-H1779DOI: 10.1152/ajpheart.00234.2004.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp phần có chứa tác nhân ARNi, *ví dụ*, tác nhân iARN mạch kép, hướng đích HAO1. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sử dụng hợp phần theo sáng chế để ức chế sự biểu hiện HAO1 và để điều trị các rối loạn kết hợp HAO1, *ví dụ*, PH1.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện trình tự nucleotit của mARN HAO1 *Homo sapiens* (SEQ ID NO:1).

Hình 2 thể hiện trình tự nucleotit của mARN HAO1 *Mus musculus* (SEQ ID NO:2).

Hình 3A là biểu đồ với kết quả của việc sàng lọc in vitro của thể liên hợp GalNac-siARN GO (HAO) trong tế bào gan khỉ cynomolgous sơ cấp.

Hình 3B là biểu đồ với đường cong đáp ứng liều lượng của thể liên hợp GalNac-siARN GO (HAO) trong tế bào gan khỉ cynomolgous sơ cấp.

Hình 4A là biểu đồ với kết quả của sự đánh giá in vivo của thể liên hợp GalNac-siARN GO (HAO) ở chuột C57B6 sau liều lượng đơn lẻ.

Hình 4B là biểu đồ với kết quả của sự đánh giá in vivo của thể liên hợp GalNac-siARN GO (HAO) ở chuột C57B6 sau liều lượng lặp lại.

Hình 5A là biểu đồ thể hiện hàm lượng oxalat trong nước tiểu ở chuột bị bất hoạt (KO) AGXT sau khi điều trị bằng thể liên hợp GalNac-siARN GO (HAO).

Hình 5B là biểu đồ thể hiện hàm lượng glycolat trong nước tiểu ở chuột KO AGXT sau khi điều trị bằng thể liên hợp GalNac-siARN GO (HAO).

Hình 6A là biểu đồ thể hiện hàm lượng mARN AGXT ở mẫu chuột nhắt mắc PH1 72 giờ sau liều lượng đơn lẻ của siARN AGXT.

Hình 6B là biểu đồ thể hiện hàm lượng oxalat trong nước tiểu ở mẫu chuột nhắt mắc PH1 72 giờ sau khi điều trị bằng thể liên hợp GalNac-siARN GO (HAO).

Hình 6C là biểu đồ thể hiện hàm lượng oxalat trong nước tiểu ở mẫu chuột nhắt mắc PH1 được theo dõi trong 49 ngày với việc dùng liều lượng hàng tuần liên tục vào ngày 14 và 21 của cả AF-011-63102 và AD-62994 và lấy nước tiểu 24 giờ như được thể hiện.

Hình 6D là biểu đồ thể hiện khoảng thời gian bất hoạt HAO1 ở chuột nhắt. Được thể hiện là hàm lượng mARN một tuần hoặc bốn tuần sau khi kết thúc 4 liều lượng (tương ứng với ngày 28 và 49 trên Hình 6C) và được biểu diễn tương ứng với hàm lượng được phát hiện thấy ở chuột nhắt được điều trị bằng PBS.

Hình 7 thể hiện mạch bổ sung ngược chiều của trình tự nucleotit của mARN HAO1 *Homo sapiens* (SEQ ID NO:3).

Hình 8 thể hiện mạch bổ sung ngược chiều của trình tự nucleotit của mARN HAO1 *Mus musculus* (SEQ ID NO:4).

Hình 9 thể hiện trình tự nucleotit của mARN HAO1 *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO:5).

Hình 10 thể hiện trình tự nucleotit của mARN HAO1 *Rattus norvegicus* (SEQ ID NO:6).

Hình 11 thể hiện mạch bổ sung ngược chiều của trình tự nucleotit của mARN HAO1 *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO:7).

Hình 12 thể hiện mạch bổ sung ngược chiều của trình tự nucleotit của mARN HAO1 *Rattus norvegicus* (SEQ ID NO:8).

Hình 13 thể hiện sự sàng lọc in vivo của thể liên hợp GO GalNAc.

Hình 14 là biểu đồ thể hiện sự đánh giá in vivo của thể liên hợp GO-GalNAc ở chuột.

Hình 15 là biểu đồ thể hiện sự đánh giá đáp ứng liều lượng của thể liên hợp GO-GalNAc ở chuột.

Hình 16 là biểu đồ thể hiện sự đánh giá đáp ứng liều lượng của thể liên hợp GO-GalNAc ở chuột.

Hình 17 là biểu đồ thể hiện sự đánh giá đáp ứng liều lượng ở chuột.

Hình 18 là hai biểu đồ thể hiện mối quan hệ của sự bất hoạt mARN với hàm lượng glycolat trong huyết thanh ở chuột.

Hình 19 là hai biểu đồ thể hiện mối quan hệ của sự bất hoạt mARN với hàm lượng glycolat trong huyết thanh ở chuột nhắt.

Hình 20 là biểu đồ thể hiện sự ức chế phụ thuộc liều lượng của mARN HAO1 bởi ALN-65585 ở tế bào gan cyno sơ cấp.

Hình 21 là hai biểu đồ thể hiện hàm lượng mARN HAO1 và hàm lượng glycolat trong huyết thanh sau khi điều trị liều đơn lẻ bằng ALN-GO1 ở chuột.

Hình 22 là biểu đồ thể hiện khoảng thời gian của việc làm câm mARN HAO1 sau khi điều trị liều lượng đơn lẻ bằng ALN-GO1 ở chuột.

Hình 23 là biểu đồ thể hiện hàm lượng mARN HAO1 và hàm lượng glycolat trong huyết thanh sau khi điều trị liều lượng đơn lẻ bằng ALN-GO1 ở chuột nhắt.

Hình 24 là hai biểu đồ thể hiện các hàm lượng oxalat và glycolat trong nước tiểu ở mẫu chuột mắc chứng tăng oxalat niệu nguyên phát typ I sau liều lượng đơn lẻ của ALN-GO1.

Hình 25A là biểu đồ thể hiện hàm lượng mARN HAO1 ở mẫu chuột nhắt mắc chứng tăng oxalat niệu nguyên phát typ I sau liều lượng đơn lẻ của ALN-GO1.

Hình 25B là biểu đồ thể hiện hàm lượng oxalat trong nước tiểu ở mẫu chuột nhắt mắc chứng tăng oxalat niệu nguyên phát typ I sau liều lượng đơn lẻ của ALN-GO1.

Hình 26 là hai biểu đồ thể hiện mARN HAO1 và hàm lượng oxalat trong nước tiểu ở mẫu chuột nhắt mắc chứng tăng oxalat niệu nguyên phát Typ I sau khi dùng liều lượng lặp lại của ALN-GO1.

Hình 27 là hai biểu đồ thể hiện hàm lượng mARN HAO1 và hàm lượng glycolat trong huyết thanh sau khi dùng liều lượng lặp lại ở động vật linh trưởng không phải là người.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp phần có chứa tác nhân ARNi, *ví dụ*, tác nhân ARNi mạch kép, hướng đích HAO1. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sử dụng hợp phần theo sáng chế để ức chế sự biểu hiện HAO1 và để điều trị các rối loạn kết hợp HAO1.

I. Định nghĩa

Để sáng chế được hiểu rõ hơn, một số thuật ngữ được xác định trước tiên. Ngoài ra, cần lưu ý rằng bất cứ khi nào giá trị hoặc khoảng giá trị của thông số được nêu ra, dự định rằng giá trị và khoảng trung gian cho các giá trị được nêu ra cũng là một phần của sáng chế.

Các mạo từ số ít được sử dụng ở đây để đề cập đến một hoặc nhiều hơn một (*tức là*, ít nhất một) đối tượng ngữ pháp của mạo từ này. Ví dụ, "chi tiết" nghĩa là một chi tiết hoặc nhiều hơn một chi tiết, *ví dụ*, nhiều chi tiết.

Thuật ngữ "bao gồm" được sử dụng ở đây có nghĩa là, và được sử dụng thay đổi với, cụm từ "bao gồm nhưng không giới hạn ở".

Thuật ngữ "hoặc" được sử dụng ở đây có nghĩa là, và được sử dụng thay đổi với, thuật ngữ "và/hoặc," trừ trường hợp có chỉ dẫn rõ ràng khác.

Như được dùng trong bản mô tả này, "HAO1" dùng để chỉ gen mã hóa cho enzym hyđroxyaxit oxiđaza 1. Các tên gen khác bao gồm GO, GOX, GOX1, và HAOX1. Protein này còn được gọi là glycolat oxiđaza và (S)-2-hyđroxy-axit oxiđaza. Mã số truy cập GenBank của mARN HAO1 ở người là NM_017545.2; mARN HAO1 ở khỉ cynomolgous (*Macaca fascicularis)* là XM_005568381.1; mARN HAO1 ở chuột (*Mus musculus)* là NM_010403.2; mARN HAO1 ở chuột nhắt (*Rattus norvegicus)* là XM_006235096.1.

Thuật ngữ "HAO1," như được dùng trong bản mô tả này, còn dùng để chỉ các biến thể trình tự ADN có trong tự nhiên của gen HAO1, chẳng hạn như dạng đa hình nucleotit đơn lẻ (SNP) trong gen HAO1. Các SNP ví dụ có thể được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu các biến thể NCBI dbSNP Short Genetic có sẵn ở www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP.

Như được dùng trong bản mô tả này, "trình tự đích" dùng để chỉ phần liên tục của trình tự nucleotit của phân tử mARN tạo thành trong quá trình phiên mã của gen HAO1, bao gồm mARN mà là sản phẩm của việc xử lý ARN của sản phẩm phiên mã sơ cấp.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sợi chứa trình tự" dùng để chỉ oligonucleotit chứa mạch nucleotit mà được mô tả bởi trình tự được đề cập đến bằng cách sử dụng danh pháp nucleotit chuẩn.

Mỗi "G," "C," "A" và "U" thường biểu thị một nucleotit mà lần lượt chứa guanin, xytosin, ađenin, và uraxil làm bazơ. "T" và "dT" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này và chỉ đeoxyribonucleotit trong đó nucleobazơ này là tymin, ví dụ, đeoxyribotymin, 2'-đeoxytymiđin hoặc tymiđin. Tuy nhiên, sẽ hiểu rằng thuật ngữ "ribonucleotit" hoặc "nucleotit" hoặc "đeoxyribonucleotit" cũng có thể chỉ nucleotit cải biến, như được mô tả thêm dưới đây, hoặc gốc thay thế đại diện. Chuyên gia trong lĩnh vực biết rõ rằng guanin, xytosin, ađenin, và uraxil có thể được thay thế bằng các gốc khác mà hầu như không làm thay đổi đặc tính bắt cặp của bazơ của oligonucleotit chứa nucleotit có gốc thay thế này. Ví dụ, không làm giới hạn sáng chế, nucleotit chứa inosin làm bazơ của nó có thể bắt cặp bazơ với nucleotit chứa ađenin, xytosin, hoặc uraxil. Do đó, nucleotit chứa uraxil, guanin, hoặc ađenin có thể được thay thế trong các trình tự nucleotit theo sáng chế bằng nucleotit chứa, ví dụ, inosin. Các trình tự chứa các gốc thay thế này là các phương án của sáng chế.

Các thuật ngữ "iARN", "tác nhân ARNi," "tác nhân iARN,", "tác nhân cản trở ARN" như được dùng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này, dùng để chỉ tác nhân mà có chứa ARN như khi thuật ngữ đó được xác định trong bản mô tả này, và mà làm trung gian cho sự phân cắt được hướng đích của bản phiên mã ARN *thông qua* con đường phức hợp làm câm cảm ứng ARN (RISC). iARN định hướng sự thoái hóa đặc hiệu trình tự của mARN thông qua quy trình dưới dạng sự cản trở ARN (ARNi). iARN điều biến, *ví dụ,* ức chế, sự biểu hiện của HAO1 trong tế bào, *ví dụ,* tế bào ở đối tượng, chẳng hạn như đối tượng động vật có vú.

Theo một phương án, tác nhân ARNi theo sáng chế bao gồm ARN sợi đơn mà tương tác với trình tự ARN đích, *ví dụ,* trình tự mARN đích HAO1, để định hướng sự phân cắt của ARN đích. Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, tin rằng ARN sợi kép dài được đưa vào tế bào bị phá vỡ thành siARN bằng enđonucleaza Typ III còn gọi là Dicer (Sharp *và cộng sự.* (2001) *Genes Dev*. 15:485). Dicer, enzym giống ribonucleaza-III, xử lý dsARN thành ARN cản trở ngắn có 19-23 cặp bazơ mang đặc điểm hai phần nhô 3' bazơ (Bernstein, *và*

cộng sự., (2001) *Nature* 409:363). Sau đó siARN được kết hợp vào phức hợp làm câm cảm ứng ARN (RISC) trong đó một hoặc nhiều helicaza tháo xoắn cặp đôi siARN, làm cho sợi đối nghĩa bổ sung có thể hướng dẫn sự nhận diện đích (Nykanen, *và cộng sự.*, (2001) *Cell* 107:309). Khi liên kết với mARN đích thích hợp, một hoặc nhiều enđonucleaza trong RISC phân cắt đích để gây ra việc làm câm (Elbashir, *và cộng sự.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Do đó, theo một khía cạnh sáng chế đề cập đến ARN sợi đơn (siARN) được tạo ra trong tế bào và mà thúc đẩy sự tạo thành của phức hợp RISC để đem lại việc làm câm gen đích, *tức là,* gen HAO1. Theo đó, thuật ngữ "siARN" cũng được sử dụng ở đây để chỉ ARNi như được mô tả ở trên.

Theo phương án khác, tác nhân ARNi có thể là sARNi sợi đơn mà được đưa vào tế bào hoặc cơ quan để ức chế mARN đích. Tác nhân ARNi sợi đơn liên kết với RISC enđonucleaza Argonaute 2, enzym này sau đó phân cắt mARN đích. Các sARNi sợi đơn thường có 15-30 nucleotit và được cải biến hóa học. Thiết kế và thử nghiệm của siARN sợi đơn được mô tả trong Sáng chế Mỹ số. 8,101,348 và trong Lima *và cộng sự.*, (2012) *Cell* 150: 883-894, toàn bộ nội dung của mỗi tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo. Trình tự nucleotit đối nghĩa bất kỳ trong số các trình tự nucleotit đối nghĩa được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng dưới dạng siARN sợi đơn như được mô tả trong bản mô tả này hoặc dưới dạng được cải biến hóa học bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu Lima *và cộng sự.*, (2012) *Cell* 150;:883-894.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phân tử oligonucleotit đối nghĩa sợi đơn hướng đích HAO1. "Phân tử oligonucleotit đối nghĩa sợi đơn" bổ sung với trình tự trong mARN đích (*tức là,* HAO1). Phân tử oligonucleotit đối nghĩa sợi đơn có thể ức chế sự dịch mã theo phương thức tỷ lượng bằng cách bắt cặp bazơ với mARN và làm tắc nghẽn theo cách vật lý bộ máy dịch mã, xem Dias, N. *và cộng sự.*, (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. Theo cách khác, phân tử oligonucleotit đối nghĩa sợi đơn ức chế mARN đích bằng cách lai với đích này và phân cắt đích này thông qua sự phân cắt nhờ ARNazaH. Phân tử oligonucleotit đối nghĩa sợi đơn có thể có chiều dài từ 10 đến 30 nucleotit và có trình tự bổ sung với trình tự đích. Ví dụ, phân tử oligonucleotit đối nghĩa sợi đơn có thể có chứa trình tự mà có ít nhất là khoảng 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, hoặc nhiều nucleotit liên tiếp từ trình tự nucleotit đối nghĩa bất kỳ trong số các trình tự nucleotit đối nghĩa được mô tả

trong bản mô tả này, *ví dụ*, các trình tự được nêu trong bảng bất kỳ trong số các Bảng 1 hoặc 2, hoặc liên kết vị trí đích bất kỳ trong số các vị trí đích được mô tả trong bản mô tả này. Phân tử oligonucleotit đối nghĩa sợi đơn có thể gồm ARN, ADN được cải biến, hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo phương án khác, "ARNi" để dùng trong chế phẩm, việc sử dụng, và phương pháp theo sáng chế là ARN sợi kép và được đề cập ở đây là "tác nhân ARNi sợi kép," "phân tử ARN sợi kép (dsARN)," "tác nhân dsARN," hoặc "dsARN". Thuật ngữ "dsARN", dùng để chỉ phức hợp của phân tử axit ribonucleic, có cấu trúc đôi chứa hai các sợi axit nucleic đối song song và về cơ bản bổ sung, được đề cập đến dưới dạng có hướng "có nghĩa" và "đối nghĩa" đối với ARN đích, *tức là,* gen HAO1. Theo một số phương án của sáng chế, ARN sợi kép (dsARN) gây ra sự thoái biến của ARN đích, *ví dụ,* mARN, thông qua cơ chế làm câm gen sau phiên mã được đề cập đến ở đây là ARN tương hỗ hoặc ARNi.

Nói chung, phần lớn nucleotit của mỗi sợi của phân tử dsARN là ribonucleotit, nhưng như được mô tả chi tiết ở đây, mỗi hoặc cả hai sợi còn có thể bao gồm một hoặc nhiều sợi không phải ribonucleotit, *ví dụ*, đeoxyribonucleotit và/hoặc nucleotit cải biến. Ngoài ra, như được sử dụng trong bản mô tả này, "tác nhân ARNi" có thể bao gồm ribonucleotit với các cải biến hóa học; tác nhân ARNi có thể bao gồm các cải biến cơ bản ở nhiều nucleotit. Các cải biến này có thể bao gồm tất cả các loại cải biến được bộc lộ ở đây hoặc được biết đến trong lĩnh vực. Bất kỳ trong số các cải biến này, như được sử dụng trong phân tử loại siARN, được bao gồm trong "tác nhân ARNi" dùng cho phần mô tả và yêu cầu bảo hộ.

Hai sợi tạo thành cấu trúc kép có thể là các phần khác nhau của một phân tử ARN lớn hơn, hoặc chúng có thể là các phân tử ARN riêng biệt. Khi hai sợi là một phần của một phân tử lớn hơn, và do đó được kết nối bởi một chuỗi nucleotit không đứt quãng giữa đầu 3' của một sợi và đầu 5' của sợi còn lại tương ứng tạo thành cấu trúc kép, sợi ARN kết nối được gọi là "vòng ình kẹp tóc." Khi hai sợi được liên kết cộng hóa trị bằng phương pháp khác với chuỗi nucleotit không đứt quãng giữa đầu 3' của một sợi và đầu 5' của sợi tương ứng kia tạo thành cấu trúc kép, cấu trúc liên kết được gọi là "liên kết." Các sợi ARN có thể có số nucleotit giống hoặc khác nhau. Số lượng tối đa của cặp bazơ là số nucleotit trong sợi

ngắn nhất của dsARN trừ đi bất kỳ phần nhô nào có mặt trong cấu trúc kép. Ngoài cấu trúc kép, tác nhân ARNi có thể có một hoặc nhiều đầu nucleotit nhô ra.

Theo một phương án, tác nhân ARNi theo sáng chế là dsARN có 24-30 nucleotit mà tương tác với trình tự ARN đích, ví dụ, trình tự mARN đích HAO1, để định hướng sự phân cắt của ARN đích. Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, ARN sợi kép dài được đưa vào tế bào bị phá vỡ thành siARN bằng enđonucleaza Typ III còn gọi là Dicer (Sharp và cộng sự. (2001) Genes Dev. 15:485). Dicer, enzym giống ribonucleaza-III, xử lý dsARN thành ARN cản trở ngắn có 19-23 cặp bazơ mang đặc điểm hai phần nhô 3' bazơ (Bernstein, và cộng sự., (2001) Nature 409:363). Sau đó siARN được kết hợp vào phức hợp làm câm cảm ứng ARN (RISC) trong đó một hoặc nhiều helicaza tháo xoắn cặp đôi siARN, làm cho sợi đối nghĩa bổ sung có thể hướng dẫn sự nhận diện đích (Nykanen, và cộng sự., (2001) Cell 107:309). Khi liên kết với mARN đích thích hợp, một hoặc nhiều enđonucleaza trong RISC phân cắt đích để gây ra việc làm câm (Elbashir, và cộng sự., (2001) Genes Dev. 15:188).

Như được sử dụng ở đây, "đoạn nucleotit nhô" chỉ nucleotit hoặc các nucleotit không bắt cặp mà nhô ra từ cấu trúc sợi kép của tác nhân ARNi khi đầu 3' của một sợi tác nhân ARNi kéo dài ra xa khỏi đầu 5' của sợi còn lại, hoặc ngược lại. "Cụt" hoặc "đầu cụt" nghĩa là không có nucleotit không được bắt cặp ở đầu đó của tác nhân ARNi sợi kép, tức là, không có đoạn nucleotit nhô. Tác nhân ARNi "có đầu cụt" là dsARN mà là sợi kép trên toàn bộ chiều dài của nó, tức là, không có đoạn nucleotit nhô ở cả hai đầu của phân tử này. Tác nhân ARNi theo sáng chế bao gồm tác nhân ARNi có phần nhô nucleotit ở một đầu (*cụ thể là*, các tác nhân có phần nhô ở một đầu và một đầu cụt) hoặc có phần nhô nucleotit ở cả hai đầu.

Thuật ngữ "sợi đối nghĩa" dùng để chỉ sợi của tác nhân ARNi sợi kép mà bao gồm vùng mà về cơ bản bổ sung với trình tự đích (*ví dụ*, mARN HAO1 ở người). Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vùng bổ sung với một phần của mARN mã hóa cho HAO1" dùng để chỉ vùng trên sợi đối nghĩa mà về cơ bản bổ sung với một phần của trình tự mARN HAO1. Trong đó vùng bổ trợ này không bổ sung hoàn toàn với trình tự đích, các vị trí không bắt cặp chủ yếu là nằm ở các vùng tận cùng và, nếu có, thường ở vùng hoặc các vùng tận cùng, *ví dụ*, trong 6, 5, 4, 3, hoặc 2 nucleotit của các đầu tận cùng 5' và/hoặc 3'.

Thuật ngữ "sợi có nghĩa," như được sử dụng ở đây, chỉ sợi dsARN mà bao gồm vùng mà gần như bổ sung với vùng sợi đối nghĩa.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vùng phân cắt" đề cập đến vùng mà nằm ngay cạnh vị trí phân cắt. Vị trí phân cắt là vị trí trên đích mà ở đó xảy ra sự phân cắt. Theo một số phương án, vùng phân cắt bao gồm ba bazơ trên một đầu, và ngay cạnh, vị trí phân cắt. Theo một số phương án, vùng phân cắt bao gồm hai bazơ trên một đầu, và ngay cạnh, vị trí phân cắt. Theo một số phương án, vị trí phân cắt thường xảy ra ở vị trí liên kết bởi các nucleotit 10 và 11 của sợi đối nghĩa, và vùng phân cắt bao gồm các nucleotit 11, 12 và 13.

Như được sử dụng ở đây, và trừ khi được định nghĩa khác đi, thuật ngữ "bổ sung," khi được sử dụng để mô tả trình tự nucleotit thứ nhất liên quan đến trình tự nucleotit thứ hai, đề cập đến khả năng của oligonucleotit hoặc polynucleotit chứa trình tự nucleotit thứ nhất để lai và tạo ra cấu trúc kép dưới các điều kiện nhất định với oligonucleotit hoặc polynucleotit chứa trình tự nucleotit thứ hai, sẽ được hiểu bởi chuyên gia trong lĩnh vực. Các điều kiện này có thể, ví dụ, là các điều kiện nghiêm ngặt, trong đó các điều kiện nghiêm ngặt có thể bao gồm: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES độ pH 6,4, 1 mM EDTA, 50°C hoặc 70°C trong 12-16 giờ tiếp theo là rửa. Các điều kiện khác, như các điều kiện sinh lý phù hợp như có thể thấy bên trong cơ thể, có thể áp dụng. Ví dụ, trình tự bổ sung đủ để cho phép chức năng phù hợp của axit nucleic để thực hiện, *ví dụ,* ARNi. Chuyên gia trong lĩnh vực có thể xác định tập hợp các điều kiện thích hợp nhất để thử nghiệm tính bổ sung của hai trình tự tương ứng với áp dụng cơ sở của nucleotit được lai.

Các trình tự có thể là "bổ sung hoàn toàn" với nhau khi có việc bắt cặp bazơ của các nucleotit của trình tự nucleotit thứ nhất với các nucleotit của trình tự nucleotit thứ hai trên toàn bộ chiều dài của các trình tự nucleotit thứ nhất và thứ hai này. Tuy nhiên, nếu trình tự thứ nhất được nói đến là "gần như bổ sung" với trình tự thứ hai trong bản mô tả này, các trình tự thứ hai này có thể là bổ sung hoàn toàn, hoặc chúng có thể tạo ra một hoặc nhiều, nhưng không quá 4, 3 hoặc 2 cặp bazơ không bắt cặp khi lai, trong khi duy trì khả năng lai trong các điều kiện phù hợp nhất cho ứng dụng cuối cùng của chúng. Tuy nhiên, khi hai oligonucleotit được thiết kế để tạo thành, nhờ quá trình lai, một hoặc nhiều phần nhô sợi đơn, phần nhô này sẽ không bị coi là không hớp khi xác định tính bổ sung. Ví dụ, dsARN chứa một oligonucleotit dài 21 nucleotit và một oligonucleotit khác dài 23 nucleotit, trong

đó oligonucleotit dài hơn này bao gồm trình tự có 21 nucleotit mà bổ sung hoàn toàn với oligonucleotit ngắn hơn này, có thể còn được gọi là "bổ sung hoàn toàn" cho các mục đích được mô tả ở đây.

Các trình tự "bổ sung", như được sử dụng ở đây, có thể còn bao gồm, hoặc hoàn toàn được tạo ra từ, các cặp bazơ không phải Watson-Crick và/hoặc các cặp bazơ tạo ra từ các nucleotit không tự nhiên và cải biến, miễn là thỏa mãn các yêu cầu nêu trên đối với khả năng lai của chúng. Các cặp bazơ không-Watson-Crick này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cặp bazơ G:U Wobble hoặc Hoogstein.

Các thuật ngữ "bổ sung," "bổ sung hoàn toàn" và "gần như bổ sung" ở đây có thể được sử dụng liên quan đến việc khớp bazơ giữa sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa dsARN, hoặc giữa sợi đối nghĩa dsARN và trình tự đích, như sẽ được hiểu từ ngữ cảnh sử dụng chúng.

Như được dùng trong bản mô tả này, polynucleotit mà "về cơ bản bổ sung với ít nhất một phần của" ARN thông tin (mARN) dùng để chỉ polynucleotit mà về cơ bản bổ sung với phần liên tục của mARN quan tâm (*ví dụ*, mARN mã hóa cho HAO1) bao gồm 5' UTR, khung đọc mở (ORF), hoặc 3' UTR. Ví dụ, polynucleotit bổ sung với ít nhất một phần của mARN HAO1 nếu trình tự này về cơ bản bổ sung với phần không bị ngắt quãng của mARN mã hóa cho HAO1.

Thuật ngữ "ức chế," như được sử dụng ở đây, được sử dụng luân phiên với "làm giảm," "làm câm," "điều hòa giảm," "kìm hãm" và các thuật ngữ tương tự, và bao gồm mức ức chế bất kỳ.

Cụm từ "ức chế sự biểu hiện của HAO1," như được dùng trong bản mô tả này, bao gồm sự ức chế của sự biểu hiện của gen HAO1 bất kỳ (chẳng hạn như, *ví dụ*, gen HAO1 ở chuột, gen HAO1 ở chuột nhắt, gen HAO1 ở khỉ, hoặc gen HAO1 ở người) cũng như là các biến thể, (*ví dụ,* các biến thể có trong tự nhiên), hoặc các thể đột biến của gen HAO1. Do đó, gen HAO1 có thể là gen HAO1 kiểu dại, gen HAO1 đột biến, hoặc gen HAO1 chuyển gen trong trường hợp tế bào, nhóm tế bào, hoặc sinh vật được thao tác di truyền.

"Ức chế sự biểu hiện của gen HAO1" bao gồm mức độ bất kỳ của sự ức chế của gen HAO1, *ví dụ*, ít nhất sự triệt tiêu một phần của sự biểu hiện của gen HAO1, chẳng hạn như sự ức chế bằng ít nhất là khoảng 5%, ít nhất là khoảng 10%, ít nhất là khoảng 15%, ít nhất

là khoảng 20%, ít nhất là khoảng 25%, ít nhất là khoảng 30%, ít nhất là khoảng 35%,ít nhất là khoảng 40%, ít nhất là khoảng 45%, ít nhất là khoảng 50%, ít nhất là khoảng 55%, ít nhất là khoảng 60%, ít nhất là khoảng 65%, ít nhất là khoảng 70%, ít nhất là khoảng 75%, ít nhất là khoảng 80%, ít nhất là khoảng 85%, ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%. ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, hoặc ít nhất là khoảng 99%.

Sự biểu hiện của gen HAO1 có thể được đánh giá dựa trên hàm lượng của biến số bất kỳ có liên quan tới sự biểu hiện gen HAO1, *ví dụ*, hàm lượng mARN HAO1 hoặc hàm lượng protein HAO1, trong, ví dụ, mô và/hoặc hàm lượng oxalat trong nước tiểu. Sự ức chế có thể được đánh giá bằng sự giảm ở mức tuyệt đối hoặc tương đối của một hoặc nhiều trong số các biến đổi này so với mức đối chứng. Mức đối chứng có thể là loại mức đối chứng bất kỳ được sử dụng trong lĩnh vực này, *ví dụ*, đường cơ sở trước khi dùng liều, hoặc mức được xác định từ đối tượng, tế bào hoặc mẫu tương tự không được xử lý hoặc được xử lý bằng đối chứng (như, *ví dụ*, đối chứng chỉ là dung dịch đệm hoặc đối chứng là tác nhân không hoạt tính).

Cụm từ "cho tế bào tiếp xúc với tác nhân ARNi sợi kép," như được sử dụng ở đây, bao gồm việc cho tế bào tiếp xúc bằng phương tiện có thể có bất kỳ. Cho tế bào tiếp xúc với tác nhân ARNi sợi kép bao gồm cho tế bào tiếp xúc *in vitro* với tác nhân ARNi hoặc cho tế bào tiếp xúc *in vivo* với tác nhân ARNi. Việc tiếp xúc có thể được thực hiện trực tiếp hoặc gián tiếp. Do đó, ví dụ, tác nhân ARNi có thể được cho tiếp xúc vật lý với tế bào bởi cá nhân thực hiện phương pháp này, hoặc ngoài ra, tác nhân ARNi có thể được đặt vào một tình huống mà sẽ cho phép hoặc gây ra điều đó để sau đó tiếp xúc với tế bào.

Việc cho tế bào tiếp xúc *in vitro* có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách ủ tế bào với tác nhân ARNi. Cho tế bào tiếp xúc *in vivo* có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách tiêm tác nhân ARNi vào trong hoặc gần mô trong đó chứa tế bào, hoặc tiêm tác nhân ARNi vào vùng khác, dòng máu hoặc khoảng không dưới da, sao cho tác nhân này sau đó sẽ tới mô trong đó chứa tế bào cần được cho tiếp xúc. Ví dụ, tác nhân ARNi có thể chứa và/hoặc được nối với phối tử, *ví dụ*, phối tử GalNAc3, mà hướng tác nhân ARNi đến vị trí mong muốn, ví dụ, gan. Tổ hợp của các phương pháp tiếp xúc i*n vitro* và *in vivo* cũng có thể thực hiện. Liên

quan đến các phương pháp theo sáng chế, tế bào cũng có thể được cho tiếp xúc *in vitro* với tác nhân ARNi và sau đó được cấy ghép vào đối tượng.

Như được sử dụng ở đây, "đối tượng" bao gồm người hoặc đông vật không phải người, tốt hơn là động vật có xương sống, và tốt hơn nữa là động vật có vú. Đối tượng có thể bao gồm sinh vật chuyển gen. Tốt nhất là, đối tượng là người, chẳng hạn như người mắc hoặc có khả năng phát triển rối loạn có kết hợp với HAO1.

"Bệnh nhân" hoặc "đối tượng," như được sử dụng ở đây, được hiểu bao gồm cả người và động vật không phải người, tốt hơn là động vật có vú, *ví dụ*, người hoặc khỉ. Tốt nhất, đối tượng hoặc bệnh nhân là người.

"Rối loạn có kết hợp với HAO1", như được dùng trong bản mô tả này, được dự định là bao gồm rối loạn bất kỳ mà có thể được điều trị hoặc được ngăn ngừa, hoặc các triệu chứng mà có thể được làm nhẹ bớt, bằng cách ức chế sự biểu hiện của HAO1. Các ví dụ bao gồm nhưng không giới hạn ở Chứng tăng oxalat niệu Nguyên phát 1 (PH1).

"Lượng hữu hiệu để điều trị," như được dùng trong bản mô tả này, được dự định là bao gồm lượng của tác nhân ARNi mà, khi được dùng cho bệnh nhân để điều trị bệnh kết hợp HAO1, đủ để đem lại sự điều trị cho bệnh (*ví dụ*, bằng cách làm giảm bớt, làm cải thiện hoặc duy trì bệnh hiện tại hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh). "Lượng hữu hiệu để điều trị" có thể thay đổi tùy thuộc vào tác nhân ARNi, tác nhân này được dùng như thế nào, bệnh và độ nghiêm trọng của nó và tiền sử, tuổi, khối lượng, tiền sử gia đình, cấu trúc di truyền, giai đoạn của quy trình bệnh lý qua trung gian sự biểu hiện HAO1, các loại điều trị từ trước hoặc đồng thời, nếu có, và các đặc điểm cá thể khác của bệnh nhân cần điều trị.

"Lượng hữu hiệu để phòng bệnh," như được dùng trong bản mô tả này, được dự định là bao gồm lượng của tác nhân ARNi mà, khi được dùng cho đối tượng chưa trải qua hoặc biểu hiện triệu chứng của bệnh kết hợp HAO1, nhưng là người có thể khả năng mắc bệnh, đủ để ngăn ngừa hoặc cải thiện bệnh hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh. Cải thiện bệnh bao gồm làm chậm quá trình phát triển bệnh hoặc làm giảm mức nghiêm trọng của giai đoạn hậu phát triển bệnh. "Lượng có hiệu quả phòng bệnh" có thể thay đổi tùy thuộc vào tác nhân ARNi, cách sử dụng tác nhân này, mức độ nguy hiểm của bệnh, và tiền sử, độ tuổi, cân nặng và tiền sử gia đình, cấu trúc gen, các kiểu điều trị trước hoặc đồng thời, nếu có, và các đặc tính cá nhân khác của bệnh nhân cần điều trị.

"Lượng có hiệu quả chữa bệnh" hoặc "lượng có hiệu quả phòng bệnh " còn bao gồm lượng tác nhân ARNi mà tạo ra một số hiệu quả cục bộ hoặc toàn thân mong muốn ở tỉ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý áp dụng được cho phép điều trị bất kỳ. Các tác nhân ARNi được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể có thể được dùng với lượng đủ để tạo ra tỷ lệ lợi ích/rủi ro chấp nhận được có thể áp dụng cho phép điều trị này.

Thuật ngữ "mẫu," như được sử dụng ở đây, bao gồm tập hợp dịch, tế bào hoặc mô tương tự phân lập từ đối tượng, cũng như dịch, tế bào hoặc mô có trong đối tượng. Ví dụ về các dịch sinh học bao gồm máu, huyết thanh và dịch màng ối, huyết tương, dịch não tủy, dịch mắt, bạch huyết, nước tiểu, nước bọt, và các loại tương tự. Mẫu mô có thể bao gồm mẫu từ các mẫu mô, bộ phận hoặc các vùng được chọn. Ví dụ, các mẫu thử có thể được lấy từ các bộ phận đặc biệt, một phần của các bộ phận đó, hoặc chất lỏng hoặc các tế bào của các bộ phận đó. Theo một số phương án, mẫu có thể được lấy từ gan (*ví dụ*, toàn bộ gan hoặc một số phần của gan hoặc một số loại tế bào trong gan, như, *ví dụ*, tế bào gan). Theo một số phương án, "mẫu có nguồn gốc từ đối tượng" dùng để chỉ máu hoặc huyết tương được rút ra từ đối tượng. Theo các phương án khác, "mẫu có nguồn gốc từ đối tượng" chỉ mô gan (hoặc các thành phần phụ của nó) có nguồn gốc từ đối tượng.

II. Tác nhân iARN dsARN theo sáng chế

Được mô tả trong bản mô tả này là tác nhân ARNi mạch kép mà ức chế sự biểu hiện của gen HAO1 trong tế bào, chẳng hạn như tế bào ở đối tượng, *ví dụ*, động vật có vú, chẳng hạn như người mắc rối loạn có kết hợp với HAO1, và việc sử dụng tác nhân ARNi mạch kép này.

Theo đó, sáng chế đề xuất tác nhân ARNi mạch kép có các cải biến hóa học có khả năng ức chế sự biểu hiện của gen đích (*tức là*, gen HAO1) *in vivo*.

Như được mô tả chi tiết hơn dưới đây, theo các khía cạnh nhất định theo sáng chế, về cơ bản tất cả các nucleotit của iARN theo sáng chế được cải biến. Theo các phương án khác theo sáng chế, tất cả các nucleotit của ARNi theo sáng chế được cải biến. Các ARNi theo sáng chế trong đó "gần như tất cả các nucleotit được cải biến" lớn hơn nhưng không cải biến hoàn toàn và có thể bao gồm không nhiều hơn 5, 4, 3, 2, hoặc 1 nucleotit không được cải biến.

Tác nhân ARNi bao gồm sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa. Mỗi sợi của tác nhân ARNi có thể có chiều dài nằm trong khoảng 12-30 nucleotit. Ví dụ, mỗi sợi có thể có chiều dài từ 14-30 nucleotit, 17-30 nucleotit, 19-30 nucleotit, 25-30 nucleotit, 27-30 nucleotit, 17-23 nucleotit, 17-21 nucleotit, 17-19 nucleotit, 19-25 nucleotit, 19-23 nucleotit, 19-21 nucleotit, 21-25 nucleotit, hoặc 21-23 nucleotit.

Mỗi sợi có thể có chiều dài 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,25, 26, 27, 28, 29, hoặc 30 nucleotit. Mỗi sợi của tác nhân ARNi có thể có cùng chiều dài hoặc có thể có chiều dài khác nhau.

Sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa chủ yếu tạo thành ARN sợi kép ("dsARN"), còn được đề cập đến trong bản mô tả này là "tác nhân ARNi." Vùng kép của tác nhân ARNi có thể có chiều dài 12-30 cặp nucleotit. Ví dụ, vùng kép có thể có thể có chiều dài nằm trong khoảng 14-30 cặp nucleotit, chiều dài nằm trong khoảng 17-30 cặp nucleotit, chiều dài nằm trong khoảng 27-30 cặp nucleotit, chiều dài nằm trong khoảng 17-23 cặp nucleotit, chiều dài nằm trong khoảng 17-21 cặp nucleotit, chiều dài nằm trong khoảng 17-19 cặp nucleotit, chiều dài nằm trong khoảng 19-25 cặp nucleotit, chiều dài nằm trong khoảng 19-23 cặp nucleotit, chiều dài nằm trong khoảng 19-21 cặp nucleotit, chiều dài nằm trong khoảng 21-25 cặp nucleotit, hoặc chiều dài nằm trong khoảng 21-23 cặp nucleotit. Trong ví dụ khác, vùng cặp đôi có chiều dài được chọn từ 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, và 27 cặp nucleotit.

Theo một phương án, tác nhân ARNi có thể chứa một hoặc nhiều vùng nhô và/hoặc nhóm mũ ở đầu 3', đầu 5', hoặc cả hai đầu của một hoặc cả hai sợi. Phần nhô có thể có chiều dài 1-6 nucleotit, ví dụ có chiều dài 2-6 nucleotit, có chiều dài 1-5 nucleotit, có chiều dài 2-5 nucleotit, có chiều dài 1-4 nucleotit, có chiều dài 2-4 nucleotit, có chiều dài 1-3 nucleotit, có chiều dài 2-3 nucleotit, hoặc có chiều dài 1-2 nucleotit. Phần nhô có thể là do một sợi dài hơn sợi kia, hoặc do hai sợi dài như nhau bị chéo nhau. Phần nhô có thể tạo ra sự không cân xứng với mARN đích hoặc có thể bổ sung cho các trình tự gen được nhắm đến hoặc có thể là các trình tự khác. Các sợi thứ nhất và thứ hai còn có thể được nối, *ví dụ*, bởi bazơ bổ sung để tạo cấu trúc kẹp tóc, hoặc bởi liên kết không bazơ khác.

Theo một phương án, mỗi nucleotit trong vùng nhô của tác nhân ARNi có thể độc lập là nucleotit được cải biến hoặc không được cải biến bao gồm, nhưng không giới hạn ở 2'-

đường được cải biến, chẳng hạn như, 2-F, 2'-O-metyl, tymiđin (T), 2`-O-metoxyetyl-5-metyluriđin (Teo), 2`-O-metoxyetylađenosin (Aeo), 2`-O-metoxyetyl-5-metylxytiđin (m5Ceo), và dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Ví dụ, TT có thể là trình tự nhô cho một trong các đầu trên một trong các sợi. Phần nhô có thể tạo ra sự không cân xứng với mARN đích hoặc có thể bổ sung cho các trình tự gen được nhắm đến hoặc có thể là các trình tự khác.

Phần nhô 5' hoặc 3' ở sợi có nghĩa, sợi đối nghĩa hoặc cả hai sợi của tác nhân ARNi có thể được phosphoryl hóa. Theo một số phương án, (các) vùng nhô chứa nucleotit có phosphorothioat giữa hai nucleotit, khi hai nucleotit có thể giống hoặc khác nhau. Theo một phương án, phần nhô có mặt ở đầu 3' của sợi có nghĩa, sợi đối nghĩa, hoặc cả hai sợi. Theo một phương án, đầu nhô 3' có mặt ở sợi đối nghĩa. Theo một phương án, đầu nhô 3' có mặt ở sợi có nghĩa.

Tác nhân ARNi có thể chứa chỉ một đầu nhô, mà có thể làm tăng hoạt tính tương hỗ của ARNi, mà không ảnh hưởng đến sự ổn định toàn bộ. Ví dụ, phần nhô sợi đơn có thể có thể nằm ở đầu 3' của sợi có nghĩa hoặc, tùy ý, ở đầu 3' của sợi đối nghĩa. ARNi có thể còn có đầu cụt, nằm ở đầu 5' của sợi đối nghĩa (hoặc đầu 3' của sợi có nghĩa) hoặc *ngược lại*. Thông thường, sợi đối nghĩa của ARNi có nucleotit nhô ở đầu 3', và đầu 5' là cụt. Ngoài phạm vi lý thuyết, đầu cụt không đối xứng ở đầu 5' của sợi đối nghĩa và phần nhô ở đầu 3' của sợi đối nghĩa giúp sợi dẫn hướng nạp vào trong quá trình RISC.

Tổng hợp và cải biến

Axit nucleic bất kỳ trong số các axit nucleic, ví dụ, ARNi, được mô tả trong sáng chế có thể được tổng hợp và/hoặc được cải biến bằng phương pháp đã được thiết lập rõ trong lĩnh vực, chẳng hạn như các phương pháp được mô tả trong tài liệu "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. *và cộng sự*. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, mà được kết hợp ở đây để tham khảo. Các cải biến bao gồm, ví dụ, các cải biến đầu, *ví dụ*, các cải biến ở đầu 5' (cầu nối phosphoryl hóa, liên hợp, đảo ngược) hoặc các cải biến ở đầu 3' (cầu nối liên hợp, nucleotit ADN, đảo ngược, *v.v.*); các cải biến bazơ, *ví dụ*, thay thế bằng các bazơ làm ổn định, bazơ gây bất ổn định, hoặc bazơ mà bắt cặp bazơ với mục mở rộng của đối tác, loại bỏ bazơ (nucleotit mất đi), hoặc bazơ liên hợp; các cải biến đường (*ví dụ*, ở vị trí 2' hoặc 4') hoặc thay thế đường; và/hoặc các cải biến mạch chính, bao gồm cải biến hoặc thay thế của cầu nối phosphođieste. Các ví dụ cụ thể của các hợp

chất ARNi hữu dụng theo các phương án được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở các ARN chứa mạch chính được cải biến hoặc cầu nối liên nucleosit không tự nhiên. Các ARN có mạch chính được cải biến bao gồm, trong số các cái khác, mà không có nguyên tử phospho trong mạch chính. Cho mục đích của sáng chế này, và đôi khi được đề cập trong lĩnh vực kỹ thuật, các ARN được cải biến mà không có nguyên tử phospho trong mạch chính liên nucleosit của chúng còn có thể được coi là oligonucleosit. Theo một số phương án, ARNi được cải biên sẽ có nguyên tử phospho trong mạch chính liên nucleosit của nó.

Mạch chính ARN được cải biến bao gồm, ví dụ, phosphorothioat, phosphorothioat không đối xứng, phosphorođithioat, phosphotrieste, aminoalkylphosphotrieste, metyl và alkyl phosphonat khác bao gồm 3'-alkylen phosphonat và phosphonat không đối xứng, phosphinat, phosphoramiđat bao gồm 3'-amino phosphoramiđat và aminoalkylphosphoramiđat, thionophosphoramiđat, thionoalkylphosphonat, thionoalkylphosphotrieste, và boranophosphat có cầu nối thường ở đầu 3'-5', chất tương tự được liên kết ở đầu 2'-5' của chúng, và chúng có cực đảo ngược trong đó các cặp đơn vị nucleosit liền nhau được liên kết 3'-5' với 5'-3' hoặc 2'-5' với 5'-2'. Nhiều muối, các muối được trộn và dạng không có axit là cũng được bao gồm.

Các bằng sáng chế Mỹ đại diện mà hướng dẫn việc điều chế các cầu nối chứa phospho nêu trên bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Sáng chế Mỹ số 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,195; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,316; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050; 6,028,188; 6,124,445; 6,160,109; 6,169,170; 6,172,209; 6, 239,265; 6,277,603; 6,326,199; 6,346,614; 6,444,423; 6,531,590; 6,534,639; 6,608,035; 6,683,167; 6,858,715; 6,867,294; 6,878,805; 7,015,315; 7,041,816; 7,273,933; 7,321,029; và bằng sáng chế Mỹ RE39464, toàn bộ nội dung của mỗi tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo.

Mạch chính ARN được cải biến mà không bao gồm nguyên tử phospho ở đây có mạch chính mà được tạo ra bởi alkyl chuỗi ngắn hoặc cầu nối liên nucleosit xycloalkyl, dị nguyên tử được trộn và alkyl hoặc cầu nối liên nucleosit xycloalkyl, hoặc một hoặc nhiều cầu nối liên nucleosit dị nguyên tử hoặc dị vòng chuỗi ngắn. Chúng bao gồm các chất có cầu nối morpholino (được tạo một phần từ phần đường của nucleosit); khung chính siloxan;

khung chính sulfua, sulfoxit và sulfon; khung chính formaxetyl và thioformaxetyl; khung chính metylen formaxetyl và thioformaxetyl; khung chính chứa alken; chứa khung chính sulfamat; khung chính metylenimino và metylenhyđrazino; khung chính sulfonat và sulfonamit; khung chính amit; và các khung chính khác có các thành phần N, O, S và CH_2.

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

Theo các phương án khác, dạng bắt chước ARN thích hợp được dự tính để dùng trong các ARNi, trong đó cả cầu nối đường và liên nucleosit, *cụ thể là*, khung chính, của các đơn vị nucleotit được thay thế bởi các nhóm mới. Các đơn vị bazơ được giữ để lai với hợp chất nhắm đến axit nucleic thích hợp. Một hợp chất oligomeric này, dạng bắt chước ARN mà được thể hiện đặc tính lai xuất sắc, được đề cập đến là axit nucleic peptit (PNA). Trong hợp chất PNA, mạch chính đường của ARN được thay thế bởi mạch chính chứa amit, cụ thể là mạch chính aminoetylglyxin. Nucleobazơ được giữ lại và liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với nguyên tử aza nitơ của phần amit của mạch chính. Sáng chế Mỹ tiêu biểu bộc lộ quy trình điều chế hợp chất PNA bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Sáng chế Mỹ số 5,539,082; 5,714,331; và 5,719,262, toàn bộ nội dung của mỗi tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo. Các hợp chất PNA khác thích hợp để sử dụng trong các iARN theo sáng chế được mô tả trong, ví dụ, trong Nielsen *và cộng sự.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Một số phương án được đặc trưng theo sáng chế bao gồm các ARN với khung chính phosphorothioat và oligonucleosit với khung chính dị nguyên tử, và cụ thể là --CH_2--NH--CH_2-, --CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--[được biết đến là khung chính metylen (metylimino) hoặc MMI], --CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--, --CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2-- và --N(CH_3)--CH_2--CH_2--[trong đó khung chính phosphođieste tự nhiên được thể hiện là --O--P--O--CH_2--] của bằng sáng chế Mỹ được đề cập ở trên số 5,489,677, và khung chính amit của bằng sáng chế Mỹ số 5,602,240 được đề cập ở trên. Theo một số phương án, các ARN được mô tả ở đây có các cấu trúc mạch chính morpholino theo Sáng chế Mỹ số 5,034,506 được đề cập ở trên.

Các ARN được cải biến còn có thể chứa một hoặc nhiều gốc đường được thế. Các ARNi, *ví dụ*, các dsARN, được mô tả ở đây có thể bao gồm một trong số các hợp chất sau đây ở vị trí 2': OH; F; O-, S-, hoặc N-alkyl; O-, S-, hoặc N-alkenyl; O-, S- hoặc N-alkynyl; hoặc O-alkyl-O-alkyl, trong đó alkyl, alkenyl và alkynyl có thể được thế hoặc không được thế C_1 đến C_{10} alkyl hoặc C_2 đến C_{10} alkenyl và alkynyl. Các cải biến ví dụ thích hợp bao gồm $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, và $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3)]_2$, trong đó n và m là từ 1 đến 10. Theo các phương án khác, các dsARN bao gồm một trong số các hợp chất sau đây ở vị trí 2': C_1 đến C_{10} alkyl được thế, alkyl bậc thấp được thế, alkaryl, aralkyl, O-alkaryl hoặc O-aralkyl, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, heteroxycloalkyl, heteroxycloalkaryl, aminoalkylamino, polyalkylamino, silyl được thế, nhóm phân cắt ARN, nhóm báo cáo, nhóm chèn, nhóm làm tăng đặc tính dược động học của ARNi, hoặc nhóm làm tăng đặc tính dược lực học của ARNi, và nhóm thế khác có đặc tính tương tự. Theo một số phương án, sự cải biến bao gồm 2'-metoxyetoxy (2'-O--$CH_2CH_2OCH_3$, còn được gọi là 2'-O-(2-metoxyetyl) hoặc 2'-MOE) (Martin *và cộng sự.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504) *tức là*, nhóm alkoxy-alkoxy. Cải biến ví dụ khác là 2'-đimetylaminooxyetoxy, *cụ thể là*, nhóm $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, còn gọi là 2'-DMAOE, như được mô tả trong các ví dụ dưới đây, và 2'-đimetylaminoetoxyetoxy (còn được biết đến trong lĩnh vực là 2'-O-đimetylaminoetoxyetyl hoặc 2'-DMAEOE), *cụ thể là*, 2'-O--CH_2--O--CH_2--$N(CH_2)_2$.

Các cải biến khác bao gồm 2'-metoxy (2'-OCH_3), 2'-aminopropoxy (2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$) và 2'-flo (2'-F). Các cải biến tương tự còn có thể được thực hiện ở các vị trí khác trên ARN của ARNi, đặc biệt là vị trí 3' của đường trên nucleotit đầu 3' hoặc ở các dsARN liên kết 2'-5' và vị trí 5' của nucleotit đầu 5'. Các ARNi còn có thể có nhóm bắt chước đường như gốc xyclobutyl ở vị trí của đường pentofuranosyl. Các bằng sáng chế Mỹ đại diện mà hướng dẫn việc điều chế của cấu trúc đường được cải biến này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Sáng chế Mỹ số. 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; và 5,700,920, các bằng sáng chế nhất định trong số chúng được sở hữu chung với đơn sáng chế này. Toàn bộ nội dung của mỗi tài liệu nêu trên được kết hợp ở đây để tham khảo.

ARNi còn có thể bao gồm các cải biến hoặc thay thế nucleobazơ (thường được đề cập đến trong lĩnh vực đơn giản là "bazơ"). Như được sử dụng ở đây, nucleobazơ "không được cải biến" hoặc "tự nhiên" bao gồm bazơ purin ađenin (A) và guanin (G), và bazơ pyrimiđin tymin (T), xytosin (C) và uraxil (U). Các nucleobazơ được cải biến bao gồm các nucleobazơ tự nhiên và tổng hợp khác như đeoxy-tymin (dT), 5-metylxytosin (5-me-C), 5-hyđroxymetyl xytosin, xanthin, hypoxanthin, 2-aminoađenin, 6-metyl và các dẫn xuất alkyl khác của ađenin và guanin, 2-propyl và các dẫn xuất alkyl khác của ađenin và guanin, 2-thiouraxil, 2-thiotymin và 2-thioxytosin, 5-halouraxil và xytosin, 5-propynyl uraxil và xytosin, 6-azo uraxil, xytosin và tymin, 5-uraxil (pseudouraxil), 4-thiouraxil, 8-halo, 8-amino, 8-thiol, 8-thioalkyl, 8-hyđroxyl anal other 8-được thế ađenin và guanin, 5-halo, cụ thể là 5-bromo, 5-triflometyl và uraxil được thế ở vị trí 5 khác và xytosin, 7-metylguanin và 7-metylađenin, 8-azaguanin và 8-azaađenin, 7-đeazaguanin và 7-đaazaađenin và 3-đeazaguanin và 3-đeazaađenin. Các nucleobazơ khác bao gồm các nucleobazơ được bộc lộ trong Sáng chế Mỹ số 3,687,808, các hợp chất được bộc lộ trong Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; các hợp chất được bộc lộ trong The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, trang 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, các hợp chất được bộc lộ bởi Englisch *và cộng sự*., Angewandte Chemie, Bản quốc tế, 1991, 30, 613, và các hợp chất được bộc lộ bởi Sanghvi, Y S., Chương 15, dsRNA Research and Applications, trang 289-302, Crooke, S. T. và Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Một số trong các nucleobazơ này đặc biệt là hữu dụng để làm tăng ái lực liên kết của các hợp chất oligome được đặc trưng theo sáng chế. Các hợp chất này bao gồm 5-được thế pyrimiđin, 6-azapyrimiđin và N-2, N-6 và 0-6 được thế purin, bao gồm 2-aminopropylađenin, 5-propynyluraxil và 5-propynylxytosin. Các sự thế 5-metylxytosin đã được thể hiện để làm tăng độ ổn định cặp đôi axit nucleic lên 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. và Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, trang 276-278) và là các sự thế bazơ ví dụ, cụ thể hơn nữa khi được kết hợp với sự cải biến đường 2'-O-metoxyetyl.

Các bằng sáng chế Mỹ đại diện mà hướng dẫn việc điều chế của các nucleobazơ được cải biến nhất định đã nêu ở trên cũng như là các nucleobazơ được cải biến khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Sáng chế Mỹ số. 3,687,808, 4,845,205; 5,130,30; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711;

5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; 5,750,692; 6,015,886; 6,147,200; 6,166,197; 6,222,025; 6,235,887; 6,380,368; 6,528,640; 6,639,062; 6,617,438; 7,045,610; 7,427,672; và 7,495,088, đã nêu ở trên toàn bộ nội dung của mỗi tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo.

ARN của ARNi còn có thể được cải biến để bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic khóa (LNA). Axit nucleic khóa là nucleotit có gốc riboza được cải biến trong đó gốc riboza bao gồm kết nối thêm nối các cacbon 2' và 4'. Cấu trúc này "khóa" một cách hiệu quả riboza trong thể cấu tạo nội cấu trúc 3'. Việc bổ sung axit nucleic khóa vào siARN đã được chứng tỏ là làm tăng độ ổn định siARN trong huyết thanh, và làm giảm hiệu quả lệch đích (Elmen, J. *và cộng sự.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *và cộng sự.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *và cộng sự.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193).

Sáng chế Mỹ tiêu biểu bộc lộ quy trình điều chế axit nucleic khóa nucleotit bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các bằng sáng chế sau đây: Sáng chế Mỹ số. 6,268,490; 6,670,461; 6,794,499; 6,998,484; 7,053,207; 7,084,125; và 7,399,845, toàn bộ nội dung của mỗi tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo.

Các cải biến làm ổn định tiềm năng cho các đầu của phân tử ARN có thể bao gồm N-(axetylaminocaproyl)-4-hyđroxyprolinol (Hyp-C6-NHAc), N-(caproyl-4-hyđroxyprolinol (Hyp-C6), N-(axetyl-4-hyđroxyprolinol (Hyp-NHAc), tymiđin-2'-0-đeoxytymiđin (ete), N-(aminocaproyl)-4-hyđroxyprolinol (Hyp-C6-amino), 2-đocosanoyl-uriđin-3"- phosphat, dT bazơ đảo ngược (idT) và các hợp chất khác. Bộc lộ của cải biến này có thể tìm thấy trong Công bố đơn PCT số WO 2011/005861.

Các iARN được cải biến chứa các môtip theo sáng chế

Theo các khía cạnh nhất định của sáng chế, tác nhân ARNi mạch kép theo sáng chế bao gồm các tác nhân có các cải biến hóa học như được bộc lộ, ví dụ, trong Đơn tạm thời Mỹ số 61/561,710, nộp ngày 18 tháng 11 năm 2011, hoặc trong PCT/US2012/065691, nộp ngày 16 tháng 11 năm 2012, và được công bố dưới dạng WO2013075035 A1, toàn bộ nội dung của mỗi tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo.

Như được thể hiện ở đây và trong đơn tạm thời số 61/561,710, có thể thu được kết quả tốt hơn bằng cách đưa vào một hoặc nhiều môtip của ba dạng cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp vào sợi có nghĩa và/hoặc sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi, đặc biệt là ở hoặc gần vị trí phân cắt. Theo một số phương án, sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi có thể còn được cải biến hoàn toàn. Việc đưa các kiểu này vào làm gián đoạn bản mẫu cải biến, nếu có, của sợi có nghĩa và/hoặc sợi đối nghĩa. Tác nhân ARNi có thể tùy ý liên hợp với phối tử dẫn xuất GalNAc, ví dụ trên sợi có nghĩa. Tác nhân ARNi thu được thể hiện hoạt tính gen câm cao.

Cụ thể hơn, đã bất ngờ phát hiện ra rằng khi sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi mạch kép được cải biến để có một hoặc nhiều môtip của ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp ở hoặc ở gần vị trí phân cắt của ít nhất một sợi của tác nhân ARNi, hoạt tính làm câm gen của tác nhân ARNi được tăng cường nhiều hơn.

Theo một phương án, tác nhân ARNi là đoạn cụt đầu đôi có chiều dài 19 nucleotit, trong đó sợi có nghĩa chứa ít nhất một kiểu trong ba cải biến 2'-F trên ba nucleotit liên tiếp ở các vị trí 7, 8, 9 từ đầu 5'. Sợi đối nghĩa chứa ít nhất một kiểu trong ba cải biến ở 2'-O-metyl trên ba nucleotit liên tiếp ở các vị trí 11, 12, 13 từ đầu 5'.

Theo phương án khác, tác nhân ARNi là đoạn cụt đầu đôi có chiều dài 20 nucleotit, trong đó sợi có nghĩa chứa ít nhất một kiểu trong ba cải biến 2'-F trên ba nucleotit liên tiếp ở các vị trí 8, 9, 10 từ đầu 5'. Sợi đối nghĩa chứa ít nhất một kiểu trong ba cải biến ở 2'-O-metyl trên ba nucleotit liên tiếp ở các vị trí 11, 12, 13 từ đầu 5'.

Theo phương án khác nữa, tác nhân ARNi là đoạn cụt đầu đôi có chiều dài 21 nucleotit, trong đó sợi có nghĩa chứa ít nhất một kiểu trong ba cải biến 2'-F trên ba nucleotit liên tiếp ở các vị trí 9, 10, 11 từ đầu 5'. Sợi đối nghĩa chứa ít nhất một kiểu trong ba cải biến ở 2'-O-metyl trên ba nucleotit liên tiếp ở các vị trí 11, 12, 13 từ đầu 5'.

Theo một phương án, tác nhân ARNi bao gồm sợi có nghĩa có 21 nucleotit và sợi đối nghĩa có 23 nucleotit, trong đó sợi có nghĩa chứa ít nhất một kiểu trong ba cải biến 2'-F trên ba nucleotit liên tiếp ở các vị trí 9, 10, 11 từ đầu 5'; sợi đối nghĩa chứa ít nhất một kiểu trong ba cải biến ở 2'-O-metyl trên ba nucleotit liên tiếp ở các vị trí 11, 12, 13 từ đầu 5', trong đó một đầu của tác nhân ARNi là cụt, trong khi đầu còn lại có 2 nucleotit nhô. Tốt hơn là, 2 nucleotit nhô là ở đầu 3' của sợi đối nghĩa. Khi 2 nucleotit nhô là ở đầu 3' của sợi

đối nghĩa, có thể có hai kết nối phosphorothioat liên nucleotit giữa ba nucleotit đầu, trong đó hai trong ba nucleotit là nucleotit nhô, và nucleotit thứ ba là nucleotit bắt cặp tiếp theo nucleotit nhô. Theo một phương án, tác nhân ARNi còn có hai kết nối phosphorothioat liên nucleotit giữa ba nucleotit đầu ởa ả đầu 5' của sợi có nghĩa và ở đầu 5' của sợi đối nghĩa. Theo một phương án, mỗi nucleotit trong sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi, bao gồm nucleotit là một phần của kiểu là nucleotit cải biến. Theo một phương án mỗi đuôi độc lập được cải biến bằng 2'-O-metyl hoặc 3'-flo, *ví dụ,* theo môtip xen kẽ. Tùy ý, tác nhân ARNi còn bao gồm phối tử (tốt hơn là $GalNAc_3$).

Theo một phương án, tác nhân ARNi có chứa sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa, trong đó tác nhân ARNi có chứa sợi thứ nhất có chiều dài bằng ít nhất là 25 và nhiều nhất là 29 nucleotit và sợi thứ hai có chiều dài nhiều nhất là 30 nucleotit có ít nhất một môtip của ba cải biến 2'-O-metyl trên ba nucleotit liên tiếp ở vị trí 11, 12, 13 từ đầu 5'; trong đó đầu 3' của sợi thứ nhất và đầu 5' của sợi thứ hai tạo thành đầu cụt và sợi thứ hai dài hơn 1-4 nucleotit ở đầu 3' của nó so với sợi thứ nhất, trong đó vùng cặp đôi mà có chiều dài ít nhất là 25 nucleotit, và sợi thứ hai bổ sung đủ với mARN đích dọc theo ít nhất là 19 nucleotit của chiều dài sợi thứ hai làm giảm sự biểu hiện gen đích khi tác nhân ARNi được đưa vào tế bào động vật có vú, và trong đó sự phân cắt dicer của tác nhân ARNi tốt hơn là tạo ra siARN chứa đầu 3' của sợi thứ hai, bằng cách đó làm giảm sự biểu hiện của gen đích ở động vật có vú. Tùy ý, tác nhân ARNi còn bao gồm phối tử.

Theo một phương án, sợi có nghĩa của tác nhân ARNi chứa ít nhất một kiểu trong số ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp, khi một trong các kiểu xảy ra ở vị trí phân cắt trong sợi có nghĩa.

Theo một phương án, sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi còn có thể chứa ít nhất một kiểu trong số ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp, khi một trong số các kiểu xảy ra trên hoặc gần vị trí phân cắt trong sợi đối nghĩa.

Đối với tác nhân ARNi có vùng cặp đôi có chiều dài là 17-23 nucleotit, vị trí phân cắt của sợi đối nghĩa thường vào khoảng 10, 11 và 12 vị trí từ đầu 5'. Do đó một môtip trong ba cải biến giống nhau có thể xuất hiện ở các vị trí 9, 10, 11; các vị trí 10, 11, 12; các vị trí 11, 12, 13; các vị trí 12, 13, 14; hoặc các vị trí 13, 14, 15 của sợi đối nghĩa, tính từ nucleotit thứ nhất từ đầu 5' của sợi đối nghĩa, hoặc, tính từ nucleotit bắt cặp thứ nhất trong vùng sợi

kép từ đầu 5' của sợi đối nghĩa. Vị trí phân cắt trong sợi đối nghĩa có thể còn có thể thay đổi theo chiều dài của vùng kép của ARNi từ đầu 5'.

Sợi có nghĩa của tác nhân ARNi có thể chứa ít nhất một kiểu trong số ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp ở vị trí phân cắt của sợi; và sợi đối nghĩa có thể có ít nhất một kiểu trong số ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp ở hoặc gần vị trí phân cắt của sợi. Khi sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa tạo thành dsARN kép, sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa có thể sắp thẳng hàng sao cho một môtip trong số ba nucleotit trên sợi có nghĩa và một môtip trong số ba nucleotit trên sợi đối nghĩa có ít nhất một trùng lặp nucleotit, *cụ thể là*, ít nhất một trong số ba nucleotit của môtip trong sợi có nghĩa tạo thành cặp bazơ với ít nhất một trong số ba nucleotit của môtip trong sợi đối nghĩa. Tùy ý, ít nhất hai nucleotit có thể trùng lặp, hoặc cả ba nucleotit có thể trùng lặp.

Theo một phương án, sợi có nghĩa của tác nhân ARNi có thể chứa nhiều hơn một kiểu trong số ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp. Kiểu thứ nhất có thể xảy ra ở hoặc gần vị trí phân cắt của sợi và kiểu còn lại có thể là cải biến cánh. Thuật ngữ "cải biến cánh" ở đây đề cập đến kiểu xảy ra ở phần khác của sợi mà tách biệt với kiểu ở hoặc gần vị trí phân cắt của cùng sợi. Sự cải biến cánh ở liền kề với môtip thứ nhất hoặc được tách biệt bởi ít nhất một hoặc nhiều nucleotit. Khi các môtip nằm ngay kề nhau thì hóa học của các môtip phân biệt với nhau và khi các môtip được phân tách bởi một hoặc nhiều nucleotit thì hóa học có thể giống nhau hoặc khác nhau. Hai hoặc nhiều cải biến cánh có thể có mặt. Ví dụ, khi hai cải biến cánh có mặt, mỗi cải biến cánh có thể xảy ra ở một đầu so với kiểu thứ nhất mà ở hoặc gần vị trí phân cắt hoặc trên một trong các bên của kiểu dẫn.

Giống như sợi có nghĩa, sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi có thể chứa nhiều hơn một kiểu của ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp, với ít nhất một trong số các kiểu xảy ra ở hoặc gần vị trí phân cắt của sợi. Sợi đối nghĩa này có thể còn chứa một hoặc nhiều cải biến cánh trong xếp hàng tương tự với cải biến cánh có thể có mặt trên sợi có nghĩa.

Theo một phương án, cải biến cánh trên sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi thường không bao gồm một hoặc hai nucleotit đầu thứ nhất ở đầu 3', đầu 5' hoặc cả hai đầu của sợi.

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

Khi mỗi sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi chứa ít nhất một cải biến cánh, cải biến cánh có thể ở trên cùng đầu của vùng kép, và có trùng lặp của một, hai hoặc ba nucleotit.

Khi mỗi sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi chứa ít nhất hai cải biến cánh, sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa có thể sắp thẳng hàng sao cho một trong hai cải biến từ một sợi ở trên một đầu của vùng kép, có trùng lặp của một, hai hoặc ba nucleotit; một trong hai cải biến từ một sợi ở trên đầu còn lại của vùng kép, có trùng lặp của một, hai hoặc ba nucleotit; hai cải biến từ một sợi ở trên mỗi bên của kiểu dẫn, có trùng lặp của một, hai hoặc ba nucleotit trong vùng kép.

Theo một phương án, mỗi nucleotit trong sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của tác nhân ARNi, bao gồm nucleotit mà một phần của kiểu, có thể được cải biến. Mỗi nucleotit có thể được cải biến bằng cải biến giống hoặc khác nhau mà có thể bao gồm một hoặc nhiều thay thế của một hoặc cả hai oxy phosphat không liên kết và/hoặc của một hoặc nhiều oxy phosphat liên kết; thay thế thành phần của đường riboza, *ví dụ*, của 2′ hyđroxyl trên đường riboza; toàn bộ thay thế của gốc phosphat với các liên kết "đephospho"; cải biến hoặc thay thế bazơ có trong tự nhiên; và thay thế hoặc cải biến khung chính riboza-phosphat.

Khi axit nucleic là polyme của các dưới đơn vị, nhiều cải biến xảy ra ở vị trí mà được lặp lại trong axit nucleic, ví dụ, sự cải biến của bazơ, hoặc gốc phosphat, hoặc O không liên kết của gốc phosphat. Trong một số trường hợp cải biến sẽ xảy ra ở tất cả các vị trí đối tượng trong axit nucleic nhưng trong nhiều trường hợp sẽ không như vậy. Ví dụ như, sự cải biến có thể chỉ xảy ra ở vị trí đầu tận cùng 3' hoặc 5', có thể chỉ xảy ra ở vùng đầu tận cùng, ví dụ, ở vị trí trên nucleotit đầu tận cùng hoặc ở 2, 3, 4, 5, hoặc 10 nucleotit cuối cùng của sợi. Cải biến có thể xảy ra trong vùng sợi kép, vùng sợi đơn, hoặc trong cả hai. Cải biến có thể xảy ra chỉ trong vùng sợi kép của ARN hoặc có thể chỉ xảy ra trong vùng sợi đơn của ARN. Ví dụ, sự cải biến phosphorothioat ở O không liên kết vị trí có thể chỉ xảy ra ở một hoặc cả hai đầu tận cùng, có thể chỉ xảy ra ở vùng đầu tận cùng, ví dụ, ở vị trí trên nucleotit đầu tận cùng hoặc trong 2, 3, 4, 5, hoặc 10 nucleotit cuối cùng của sợi, hoặc có thể xảy ra ở

vùng sợi kép và vùng sợi đơn, cụ thể là ở đầu tận cùng. Các đầu hoặc đầu 5' có thể được phosphoryl hóa.

Có thể là, ví dụ, làm tăng cường độ ổn định, bao gồm các bazơ cụ thể ở phần nhô, hoặc bao gồm các nucleotit được cải biến hoặc chất thay thế nucleotit, ở phần nhô sợi đơn, ví dụ, ở phần nhô 5' hoặc 3', hoặc ở cả hai. Ví dụ, có thể mong muốn chứa purin nucleotit trong các phần nhô. Theo một số phương án tất cả hoặc một số bazơ ở phần nhô 3' hoặc 5' có thể được cải biến, ví dụ, bằng sự cải biến được mô tả trong bản mô tả này. Cải biến có thể bao gồm, ví dụ, việc sử dụng cải biến ở vị trí 2' của đường riboza với sự cải biến mà đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, việc sử dụng đeoxyribonucleotit,, 2'-đeoxy-2'-floro (2'-F) hoặc 2'-O-metyl được cải biến thay vì đường ribo của nucleobazơ, và sự cải biến ở nhóm phosphat, ví dụ, sự cải biến phosphorothioat. Các phần nhô cần phải tương đồng với trình tự đích.

Theo một phương án, mỗi phần dư của sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa độc lập được cải biến với LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxyetyl, 2'- O-metyl, 2'-O-alyl, 2'-C- alyl, 2'-khử oxy, 2'-hyđroxyl, hoặc 2'-flo. Các sợi có thể chứa nhiều hơn một cải biến. Theo một phương án, mỗi phần dư của sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa độc lập được cải biến với 2'- O-metyl hoặc 2'-flo.

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

Theo một phương án, N_a và/hoặc N_b bao gồm các cải biến của bản mẫu thay thế. Thuật ngữ "bản mẫu thay thế" như được sử dụng ở đây đề cập đến kiểu có một hoặc nhiều cải biến, mỗi cải biến xảy ra trên các nucleotit thay thế của một sợi. Nucleotit thay thế có thể đề cập đến một trên mỗi nucleotit khác hoặc một trên mỗi ba nucleotit, hoặc mẫu tương tự. Ví dụ, nếu A, B và C lần lượt thể hiện một loại cải biến nucleotit, mẫu thay thế có thể là "ABABABABABAB…," "AABBAABBAABB…," "AABAABAABAAB…," "AAABAAABAAAB…," "AAABBBAAABBB…," hoặc "ABCABCABCABC…," v.v.

Loại của các cải biến có chứa trong mẫu thay thế có thể giống hoặc khác nhau. Ví dụ, nếu A, B, C, D lần lượt thể hiện một loại cải biến trên nucleotit, kiểu xen kẽ, *cụ thể là*, các cải biến trên mỗi nucleotit khác, có thể là giống nhau, nhưng mỗi sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa có thể được chọn từ một vài khả năng của các cải biến trong môtip xen kẽ như "ABABAB…", "ACACAC…" "BDBDBD…" hoặc "CDCDCD…," v.v.

Theo một phương án, tác nhân ARNi theo sáng chế bao gồm cải biến bản mẫu cho mẫu xen kẽ trên sợi có nghĩa so với cải biến bản mẫu cho mẫu xen kẽ trên sợi đối nghĩa được thay đổi. Việc thay đổi có thể với nhóm được cải biến như vậy của nucleotit của sợi có nghĩa tương ứng với nhóm được cải biến khác của các nucleotit của sợi đối nghĩa và *ngược lại*. Ví dụ, sợi có nghĩa khi bắt cặp với sợi đối nghĩa trong dsARN kép, mẫu xen kẽ trong sợi có nghĩa có thể bắt đầu với "ABABAB" từ 5'-3' của sợi và mẫu xen kẽ trong sợi đối nghĩa có thể bắt đầu với "BABABA" từ 5'-3'của sợi trong vùng kép. Một ví dụ khác là, môtip luân phiên trong sợi có nghĩa có thể bắt đầu với "AABBAABB" từ 5'-3' của sợi và môtip luân phiên trong sợi đối nghĩa có thể bắt đầu với "BBAABBAA" từ 5'-3' của sợi trong vùng cặp đôi, sao cho có sự dịch chuyển hoàn toàn hoặc một phần của mô hình cải biến giữa sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa.

Theo một phương án, tác nhân ARNi bao gồm kiểu của môtip xen kẽ của cải biến 2'-O-metyl và cải biến 2'-F trên sợi có nghĩa ban đầu có thay đổi so với kiểu của môtip xen kẽ của cải biến 2'-O-metyl và cải biến 2'-F trên sợi đối nghĩa ban đầu, *cụ thể là*, 2'-O-metyl nucleotit cải biến trên sợi có nghĩa cặp bazơ với 2'-F nucleotit cải biến trên sợi đối nghĩa và ngược lại. Vị trí 1 của sợi có nghĩa có thể bắt đầu với cải biến ở 2'-F, và vị trí 1 của sợi đối nghĩa có thể bắt đầu với cải biến 2'- O-metyl.

Sự xuất hiện của một hoặc nhiều kiểu của ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp với sợi có nghĩa và/hoặc sợi đối nghĩa làm gián đoạn bản mẫu cải biến ban đầu có mặt trong sợi có nghĩa và/hoặc sợi đối nghĩa. Sự ngắt quãng này của mô hình cải biến của sợi có nghĩa và/hoặc sợi đối nghĩa bằng cách đưa một hoặc nhiều môtip của ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp vào sợi có nghĩa và/hoặc sợi đối nghĩa làm tăng cường một cách đáng ngạc nhiên hoạt tính làm câm gen cho gen đích.

Theo một phương án, khi môtip của ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp được đưa vào sợi bất kỳ, sự cải biến của nucleotit ở gần môtip này là sự cải biến khác với sự cải biến của môtip này. Ví dụ, phần của trình tự chứa môtip là "…N_aYYYN_b…," khi "Y" thể hiện cải biến của môtip ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp, và "N_a" và "N_b" thể hiện cải biến cho nucleotit tiếp theo môtip "YYY" khác với cải biến của Y, và khi N_a và N_b có thể là các cải biến giống hoặc khác nhau. Theo cách khác, N_a và/hoặc N_b có thể có mặt hoặc vắng mặt khi có sự cải biến cánh.

Tác nhân ARNi có thể còn bao gồm ít nhất một kết nối phosphorothioat hoặc metylphosphonat liên nucleotit. Cải biến cầu nối phosphorothioat hoặc metylphosphonat liên nucleotit có thể xảy ra trên nucleotit bất kỳ của sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa hoặc cả hai sợi ở vị trí bất kỳ của sợi. Ví dụ, cải biến kết nối liên nucleotit có thể xảy ra trên mỗi nucleotit trên sợi có nghĩa và/hoặc sợi đối nghĩa; mỗi cải biến kết nối liên nucleotit có thể xảy ra trong bản mẫu xen kẽ trên sợi có nghĩa và/hoặc sợi đối nghĩa; hoặc sợi có nghĩa hoặc sợi đối nghĩa có thể chứa cả cải biến kết nối liên nucleotit trong bản mẫu xen kẽ. Bản mẫu xen kẽ của cải biến kết nối liên nucleotit trên sợi có nghĩa có thể giống hoặc khác nhau so với sợi đối nghĩa, và bản mẫu xen kẽ của cải biến kết nối liên nucleotit trên sợi có nghĩa có thể có thay đổi so với bản mẫu xen kẽ của cải biến kết nối liên nucleotit trên sợi đối nghĩa.

Theo một phương án, ARNi bao gồm cải biến kết nối phosphorothioat hoặc metylphosphonat liên nucleotit trong vùng nhô. Ví dụ, vùng nhô có thể chứa hai nucleotit có kết nối phosphorothioat hoặc metylphosphonat liên nucleotit giữa hai nucleotit. Cải biến kết nối liên nucleotit còn có thể dùng để liên kết nucleotit nhô với nucleotit bắt cặp đầu trong vùng kép. Ví dụ, ít nhất 2, 3, 4, hoặc tất cả nucleotit nhô có thể được liên kết thông qua kết nối phosphorothioat hoặc metylphosphonat liên nucleotit, và tùy ý, có thể là kết nối phosphorothioat hoặc metylphosphonat liên nucleotit bổ sung liên kết nucleotit nhô với nucleotit bắt cặp mà tiếp theo nucleotit nhô. Ví dụ, có thể là ít nhất hai kết nối phosphorothioat liên nucleotit giữa ba nucleotit đầu, trong đó hai trong số ba nucleotit là nucleotit nhô, và nucleotit thứ ba là nucleotit bắt cặp tiếp theo nucleotit nhô. Ba nucleotit đầu này có thể là ở đầu 3' của sợi đối nghĩa, đầu 3' của sợi có nghĩa, đầu 5' của sợi đối nghĩa, và/hoặc đầu 5' của sợi đối nghĩa.

Theo một phương án, 2 nucleotit nhô là ở đầu 3' của sợi đối nghĩa, và có hai kết nối phosphorothioat liên nucleotit giữa ba nucleotit đầu, trong đó hai trong số ba nucleotit là nucleotit nhô, và nucleotit thứ ba là nucleotit bắt cặp tiếp theo nucleotit nhô. Tùy ý, tác nhân ARNi có thể có thêm hai kết nối phosphorothioat liên nucleotit giữa ba nucleotit đầu ở cả đầu 5' của sợi có nghĩa và ở đầu 5' của sợi đối nghĩa.

Theo một phương án, tác nhân ARNi bao gồm (các) sự bắt cặp nhầm với đích, trong cấu trúc kép, hoặc tổ hợp của chúng. Sự bắt cặp nhầm có thể xảy ra trong vùng nhô hoặc vùng cặp đôi. Cặp bazơ có thể được xếp loại dựa trên xu hướng thúc đẩy phân tách hoặc

nóng chảy của chúng (*ví dụ*, trên năng lượng tự do của liên kết hoặc phân tách của cụ thể bắt cặp, tiếp cận đơn giản nhất là thẩm định các cặp trên cơ sở cặp đơn, qua phân tích cặp bên cạnh hoặc tương tự còn có thể được sử dụng). Liên quan đến thúc đẩy phân tách: A:U được ưu tiên so với G:C; G:U được ưu tiên so với G:C; và I:C được ưu tiên so với G:C (I=inosin). Sự bắt cặp nhầm, *ví dụ*, bắt cặp không chuẩn tắc hoặc khác chuẩn tắc (như được mô tả đâu đó trong bản mô tả này) được ưu tiên so với bắt cặp chuẩn tắc (A:T, A:U, G:C); và bắt cặp mà bao gồm bazơ chung được ưu tiên so với bắt cặp chuẩn tắc.

Theo một phương án, tác nhân ARNi bao gồm ít nhất một của 1, 2, 3, 4, hoặc 5 cặp bazơ thứ nhất trong vùng kép từ đầu 5' của sợi đối nghĩa độc lập được chọn từ: A:U, G:U, I:C, và các cặp bắt cặp nhầm, *ví dụ*, bắt cặp không chuẩn tắc hoặc không phải chuẩn tắc hoặc sự bắt cặp mà bao gồm bazơ chung, để thúc đẩy sự phân ly của sợi đối nghĩa ở đầu 5' của kép.

Theo một phương án, nucleotit ở 1 vị trí trong vùng kép từ đầu 5' trong sợi đối nghĩa được chọn từ nhóm gồm có A, dA, dU, U, và dT. Tùy ý, ít nhất một trong số 1, 2 hoặc 3 cặp bazơ thứ nhất trong vùng kép từ đầu 5' của sợi đối nghĩa là cặp bazơ AU. Ví dụ, cặp bazơ thứ nhất trong vùng kép từ đầu 5' của sợi đối nghĩa là cặp bazơ AU.

Theo một phương án, trình tự sợi có nghĩa có thể được thể hiện bởi công thức (I):

$$5'\ n_p\text{-}N_a\text{-}(X\,X\,X)_i\text{-}N_b\text{-}Y\,Y\,Y\text{-}N_b\text{-}(Z\,Z\,Z)_j\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3' \qquad (I)$$

trong đó:

mỗi i và j độc lập bằng 0 hoặc 1;

mỗi p và q độc lập bằng 0-6;

mỗi N_a độc lập tượng trưng cho trình tự oligonucleotit chứa 0-25 nucleotit cải biến, mỗi trình tự chứa ít nhất hai nucleotit được cải biến theo cách khác nhau;

mỗi N_b độc lập tượng trưng cho trình tự oligonucleotit bao gồm 0-10 nucleotit cải biến;

mỗi n_p và n_q độc lập có phần nucleotit nhô ra;

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

mỗi XXX, YYY và ZZZ mỗi độc lập thể hiện một kiểu trong số ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp. Tốt hơn là tất cả YYY là 2'-F nucleotit cải biến.

Theo một phương án, N_a và/hoặc N_b bao gồm các cải biến theo kiểu xen kẽ.

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

Theo một phương án, i bằng 1 và j bằng 0, hoặc i bằng 0 và j bằng 1, hoặc cả i và j đều bằng 1. Do đó sợi có nghĩa có thể được thể hiện bởi công thức sau:

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

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

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

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

Khi sợi có nghĩa được biểu diễn dưới dạng công thức (Ic), N_b thể hiện trình tự oligonucleotit bao gồm 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 hoặc 0 nucleotit cải biến. Mỗi N_a có thể độc lập tượng trưng cho trình tự oligonucleotit bao gồm 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

Khi sợi có nghĩa được biểu diễn dưới dạng công thức (Id), mỗi N_b độc lập tượng trưng cho trình tự oligonucleotit bao gồm 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 hoặc 0 nucleotit cải biến. Tốt hơn là, N_b là 0, 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 mỗi N_a có thể độc lập thể hiện trình tự oligonucleotit bao gồm 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

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

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

5' n_p-N_a-YYY- N_a-n_q 3' (Ia).

Nếu sợi có nghĩa được biểu diễn bởi công thức (Ia), mỗi N_a độc lập có thể tượng trưng cho trình tự oligonucleotit chứa 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

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

5' $n_{q'}$-N_a'-$(Z'Z'Z')_k$-N_b'-$Y'Y'Y'$-N_b'-$(X'X'X')_l$-N'_a-n_p' 3' (II)

trong đó:

mỗi k và l độc lập bằng 0 hoặc 1;

mỗi p' và q' độc lập bằng 0-6;

mỗi N_a' độc lập tượng trưng cho trình tự oligonucleotit chứa 0-25 nucleotit cải biến, mỗi trình tự chứa ít nhất hai nucleotit được cải biến theo cách khác nhau;

mỗi N_b' độc lập tượng trưng cho trình tự oligonucleotit bao gồm 0-10 nucleotit cải biến;

mỗi n_p' và n_q' độc lập có phần nucleotit nhô ra;

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

và

X'X'X', Y'Y'Y' và Z'Z'Z' mỗi độc lập thể hiện một kiểu trong số ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp.

Theo một phương án, N_a' và/hoặc N_b' bao gồm các cải biến theo kiểu xen kẽ.

Kiểu Y'Y'Y' xảy ra trên hoặc gần vị trí phân cắt của sợi đối nghĩa. Ví dụ, khi tác nhân ARNi có vùng cặp đôi có chiều dài là 17-23 nucleotit, môtip Y'Y'Y' có thể xảy ra ở vị trí 9, 10, 11;10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14 ; hoặc 13, 14, 15 của sợi đối nghĩa, bắt đầu đếm từ nucleotit thứ nhất, từ đầu 5'; hoặc một cách tùy ý, bắt đầu đếm từ nucleotit được bắt cặp thứ nhất trong vùng cặp đôi, từ đầu 5'. Tốt hơn là, kiểu Y'Y'Y' xảy ra ở các vị trí 11, 12, 13.

Theo một phương án, tất cả kiểu Y'Y'Y' là nucleotit cải biến 2'-OMe.

Theo một phương án, k bằng 1 và l bằng 0, hoặc k bằng 0 và l bằng 1, hoặc cả k và l đều bằng 1.

Do đó sợi đối nghĩa có thể được thể hiện bởi công thức sau:

5' $n_{q'}$-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-$n_{p'}$ 3' (IIb);

5' $n_{q'}$-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-$n_{p'}$ 3' (IIc); hoặc

5' $n_{q'}$-N_a'- Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'- X'X'X'-N_a'-$n_{p'}$ 3' (IId).

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

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

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

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

5' $n_{p'}$-$N_{a'}$-Y'Y'Y'- $N_{a'}$-$n_{q'}$ 3' (Ia).

Khi sợi đối nghĩa được thể hiện là công thức (IIa), mỗi N_a' độc lập thể hiện trình tự oligonucleotit bao gồm 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

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

Mỗi nucleotit của sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa có thể độc lập được cải biến với LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxyetyl, 2'-O-metyl, 2'-O-alyl, 2'-C- alyl, 2'-hyđroxyl, hoặc 2'-flo. Ví dụ, mỗi nucleotit của sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa độc lập được cải biến với 2'-O-metyl hoặc 2'-flo. Mỗi X, Y, Z, X', Y' và Z', cụ thể là, có thể thể hiện cải biến ở 2'-O-metyl hoặc cải biến ở 2'-flo.

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

Theo một phương án sợi đối nghĩa có thể chứa kiểu Y′Y′Y′ xảy ra ở các vị trí 11, 12, 13 của sợi, bắt đầu tính từ nucleotit thứ nhất từ đầu 5', hoặc tùy ý, bắt đầu tính từ nucleotit bắt cặp thứ nhất trong vùng kép, từ đầu 5'; và Y′ thể hiện cải biến ở 2'-O-metyl. Sợi đối nghĩa có thể còn chứa kiểu X′X′X′ hoặc kiểu Z′Z′Z′ làm cải biến cánh ở đầu đối diện của vùng kép; và mỗi X′X′X′ và Z′Z′Z′ độc lập thể hiện cải biến ở 2'-OMe hoặc cải biến ở 2'-F.

Sợi có nghĩa được thể hiện bởi công thức bất kỳ trong số các công thức nêu trên (Ia), (Ib), (Ic), và (Id) tạo thành cặp đôi với sợi đối nghĩa lần lượt được thể hiện bởi công thức bất kỳ trong số các công thức (IIa), (IIb), (IIc), và (IId).

Theo đó, các tác nhân ARNi dùng trong phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa, mỗi sợi có từ 14 đến 30 nucleotit, ARNi kép được thể hiện bởi công thức (III):

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

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

(III)

trong đó:

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

mỗi p, p′, q, và q′ độc lập bằng 0-6;

mỗi N_a và N_a' độc lập thể hiện trình tự oligonucleotit chứa 0-25 nucleotit được cải biến, mỗi trình tự chứa ít nhất hai nucleotit được cải biến khác nhau;

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

trong đó

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

mỗi XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', và Z'Z'Z' mỗi độc lập thể hiện một kiểu trong số ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp.

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

Tổ hợp ví dụ về sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa tạo thành ARNi kép có công thức dưới đây:

5' n_p - N_a -Y Y Y -N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y' -$N_a'n_q'$ 5'

(IIIa)

5' n_p -N_a -Y Y Y -N_b -Z Z Z -N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-$N_a'n_q'$ 5'

(IIIb)

5' n_p-N_a- X X X -N_b -Y Y Y - N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q' 5'

(IIIc)

5' n_p -N_a -X X X -N_b-Y Y Y -N_b- Z Z Z -N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a-n_q' 5'

(IIId)

Khi tác nhân ARNi được thể hiện bởi công thức (IIIa), mỗi N_a độc lập thể hiện trình tự oligonucleotit bao gồm 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

Khi tác nhân ARNi được thể hiện bởi công thức (IIIb), mỗi N_b độc lập thể hiện trình tự oligonucleotit bao gồm 1-10, 1-7, 1-5 hoặc 1-4 nucleotit cải biến. Mỗi N_a độc lập thể hiện trình tự oligonucleotit bao gồm 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

Khi tác nhân ARNi được thể hiện là công thức (IIIc), mỗi N_b, N_b' độc lập thể hiện trình tự oligonucleotit bao gồm 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 hoặc 0 nucleotit cải biến. Mỗi N_a độc lập thể hiện trình tự oligonucleotit bao gồm 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit cải biến.

Khi tác nhân ARNi được thể hiện là công thức (IIId), mỗi N_b, N_b' độc lập thể hiện trình tự oligonucleotit bao gồm 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 hoặc 0 nucleotit cải biến. Mỗi N_a, N_a' độc lập thể hiện trình tự oligonucleotit chứa 2-20, 2-15, hoặc 2-10 nucleotit được cải biến. Mỗi N_a, N_a', N_b và N_b' độc lập có chứa sự cải biến của mô hình luân phiên.

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

Khi tác nhân ARNi được thể hiện bởi công thức (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), và (IIId), ít nhất một trong số nucleotit Y có thể tạo thành cặp bazơ với một trong số nucleotit Y′. Tùy ý, ít nhất hai trong số nucleotit Y tạo thành cặp bazơ với nucleotit Y′ tương ứng; hoặc cả ba nucleotit Y đều tạo thành cặp bazơ với nucleotit Y′ tương ứng.

Khi tác nhân ARNi được thể hiện bởi công thức (IIIb) hoặc (IIId), ít nhất một trong số nucleotit Z có thể tạo thành cặp bazơ với một trong số nucleotit Z’. Tùy ý, ít nhất hai trong số nucleotit Z tạo thành cặp bazơ với tương ứng nucleotit Z’; hoặc cả ba nucleotit Z đều tạo thành cặp bazơ với tương ứng nucleotit Z’.

Khi tác nhân ARNi được thể hiện là công thức (IIIc) hoặc (IIId), ít nhất một của nucleotit X có thể tạo thành cặp bazơ với một trong số nucleotit X′. Tùy ý, ít nhất hai trong số nucleotit X tạo thành cặp bazơ với tương ứng nucleotit X′; hoặc cả ba nucleotit X đều tạo thành cặp bazơ với tương ứng nucleotit X′.

Theo một phương án, cải biến trên nucleotit Y khác với cải biến trên Y' nucleotit, cải biến trên nucleotit Z khác với cải biến trên nucleotit Z’, và/hoặc cải biến trên nucleotit X khác với cải biến trên X' nucleotit.

Theo một phương án, khi tác nhân ARNi được thể hiện bởi công thức (IIId), các cải biến N_a là các cải biến ở 2′-O-metyl hoặc 2′-flo. Theo phương án khác, khi tác nhân ARNi được thể hiện bởi công thức (IIId), các cải biến N_a là các cải biến ở 2′-O-metyl hoặc 2′-flo và $n_p' > 0$ và ít nhất một n_p' liên kết với nucleotit bên cạnh thông qua kết nối phosphorothioat. Theo phương án khác nữa, nếu tác nhân ARNi được biểu thị bằng công thức (IIId), các cải biến N_a là các cải biến 2′-O-metyl hoặc 2′-flo, $n_p' > 0$ và ít nhất một n_p' được liên kết với nucleotit bên cạnh thông qua liên kết phosphothioat, và sợi có nghĩa được liên hợp với một hoặc nhiều dẫn xuất GalNAc được gắn thông qua liên kết nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba. Theo phương án khác, khi tác nhân ARNi được thể hiện bởi công thức (IIId), các cải biến N_a là các cải biến ở 2′-O-metyl hoặc 2′-flo, $n_p' > 0$ và ít nhất một n_p' liên kết với nucleotit bên cạnh thông qua kết nối phosphorothioat, sợi có nghĩa bao gồm ít nhất một kết nối phosphorothioat, và sợi có nghĩa liên hợp với một hoặc nhiều dẫn xuất GalNAc được gắn qua liên kết nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba.

Theo một phương án, khi tác nhân ARNi được thể hiện bởi công thức (IIIa), các cải biến N_a là các cải biến ở 2′-O-metyl hoặc 2′-flo, $n_p' > 0$ và ít nhất một n_p' liên kết với nucleotit bên cạnh thông qua kết nối phosphorothioat, sợi có nghĩa bao gồm ít nhất một kết nối phosphorothioat, và sợi có nghĩa liên hợp với một hoặc nhiều dẫn xuất GalNAc được gắn qua liên kết nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba.

Theo một phương án, tác nhân ARNi là cấu trúc đa chứa ít nhất hai các cấu trúc kép được thể hiện bởi công thức (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), và (IIId), trong đó các cấu trúc kép được nối bởi một liên kết. Liên kết có thể là phân cắt được hoặc không phân cắt được. Tùy ý, cấu trúc đa còn bao gồm phối tử. Mỗi trong số các cấu trúc kép có thể nhắm đến gen giống nhau hoặc hai gen khác nhau; hoặc mỗi trong số các cấu trúc kép có thể nhắm đến gen giống nhau ở hai vị trí đích khác nhau.

Theo một phương án, tác nhân ARNi là cấu trúc đa chứa ba, bốn, năm, sáu hoặc nhiều cấu trúc kép được thể hiện bởi công thức (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), và (IIId), trong đó các cấu trúc kép được nối bởi một liên kết. Liên kết có thể là phân cắt được hoặc không phân cắt được. Tùy ý, cấu trúc đa còn bao gồm phối tử. Mỗi trong số các cấu trúc kép có thể nhắm đến gen giống nhau hoặc hai gen khác nhau; hoặc mỗi trong số các cấu trúc kép có thể nhắm đến gen giống nhau ở hai vị trí đích khác nhau.

Theo một phương án, hai tác nhân ARNi được thể hiện bởi công thức (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), và (IIId) được liên kết với nhau ở đầu 5', và một hoặc cả hai đầu 3' và được liên hợp một cách tùy ý với phối tử. Mỗi trong số các tác nhân có thể nhắm đến gen giống nhau hoặc hai gen khác nhau; hoặc mỗi trong số các tác nhân có thể nhắm đến gen giống nhau ở hai vị trí đích khác nhau.

Các công bố khác nhau mô tả tác nhân ARNi đa có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế. Các công bố này bao gồm WO2007/091269, Sáng chế Mỹ số 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 và WO2011/031520 toàn bộ nội dung của mỗi tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo.

Tác nhân ARNi mà chứa các liên hợp của một hoặc nhiều gốc carbohyđrat với tác nhân ARNi có thể tối ưu một hoặc nhiều đặc tính của tác nhân ARNi. Trong nhiều trường hợp, gốc carbohyđrat sẽ được gắn ở nhóm phụ được cải biến của tác nhân ARNi. Ví dụ, đường riboza của một hoặc nhiều nhóm phụ ribonucleotit của tác nhân dsARN có thể được thay thế bằng nhóm khác, *ví dụ*, chất mang không-carbohyđrat (tốt hơn là mạch vòng) mà gắn ở phối tử carbohyđrat. Nhóm phụ ribonucleotit trong đó đường riboza của nhóm phụ thay thế được đề cập đến ở đây là nhóm phụ biến thay thế riboza (RRMS). Chất mang mạch vòng có thể là hệ vòng carboxyclic, *cụ thể là*, tất cả các nguyên tử trên vòng là nguyên tử cacbon, hoặc hệ vòng heteroxyclic, *cụ thể là*, một hoặc nhiều nguyên tử trên vòng có thể là dị nguyên tử, *ví dụ*, nitơ, oxy, lưu huỳnh. Chất mang mạch vòng có thể là hệ đơn vòng, hoặc có thể chứa hai hoặc nhiều vòng, *ví dụ* vòng nóng chảy. Chất mang mạch vòng có thể là hệ vòng bão hòa hoàn toàn, hoặc nó có thể chứa một hoặc nhiều liên kết đôi.

Phối tử có thể là gắn với polynucleotit qua chất mang. Chất mang bao gồm (i) ít nhất một "điểm gắn mạch chính," tốt hơn là hai "điểm gắn mạch chính" và (ii) ít nhất một "Điểm gắn thắt." A "điểm gắn mạch chính" như được sử dụng ở đây đề cập đến nhóm chức, *ví dụ* nhóm hyđroxyl, hoặc thông thường, liên kết để, và thích hợp để đưa chất mang vào mạch chính, *ví dụ*, phosphat, hoặc phosphat được cải biến, *ví dụ*, lưu huỳnh chứa, mạch chính, của riboaxit nucleic. "Điểm gắn thắt" (TAP) theo một số phương án đề cập đến nguyên tử vòng cấu thành của chất mang mạch vòng, *ví dụ*, nguyên tử cacbon hoặc dị nguyên tử (phân biệt với nguyên tử mà tạo ra điểm gắn mạch chính), mà nối với gốc được chọn. Gốc có thể là, *ví dụ*, carbohyđrat, *ví dụ* monosacarit, đisacarit, trisacarit, tetrasacarit, oligosacarit và

polysacarit. Tùy ý, gốc được chọn được nối bởi mối thắt xen kẽ vào chất mang mạch vòng. Do đó, chất mang mạch vòng sẽ thường bao gồm nhóm chức, ví dụ, nhóm amino, hoặc thông thường, tạo ra liên kết, thích hợp để hợp nhất hoặc thắt thể hóa học khác, *ví* dụ, phối tử vào vòng cấu tạo.

Tác nhân ARNi có thể được liên hợp với phối tử *thông qua* chất mang, trong đó chất mang có thể là nhóm mạch vòng hoặc nhóm mạch không vòng; tốt hơn là, nhóm mạch vòng được chọn từ pyroliđinyl, pyrazolinyl, pyrazoliđinyl, imiđazolinyl, imiđazoliđinyl, piperiđinyl, piperazinyl, [1,3]đioxolan, oxazoliđinyl, isoxazoliđinyl, morpholinyl, thiazoliđinyl, isothiazoliđinyl, quinoxalinyl, pyriđazinonyl, tetrahyđrofuryl và đecalin; tốt hơn là, nhóm mạch không vòng được chọn từ khung serinol hoặc khung đietanolamin.

Theo các phương án cụ thể nhất định, tác nhân ARNi để sử dụng trong phương pháp theo sáng chế là tác nhân được chọn từ nhóm gồm các tác nhân được liệt kê trong bảng bất kỳ trong số các Bảng 1 và 2. Theo một phương án, nếu tác nhân là tác nhân được liệt kê trong Bảng 1, tác nhân có thể thiếu dT ở đầu tận cùng.

Sáng chế còn bao gồm tác nhân ARNi mạch kép chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự được liệt kê trong bảng bất kỳ trong số các Bảng 1 hoặc 2 mà có chứa 5' phosphat hoặc giả phosphat trên sợi đối nghĩa (xem, *ví dụ,* Công bố PCT số WO 2011005860). Ngoài ra, sáng chế bao gồm tác nhân ARNi mạch kép chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự được liệt kê trong bảng bất kỳ trong số các Bảng 1 hoặc 2 mà bao gồm nhóm 2'floro thay cho nhóm 2'-OMe ở đầu 5' của sợi có nghĩa.

Môtip bổ sung

Theo các khía cạnh nhất định, tác nhân ARNi mạch kép được mô tả trong bản mô tả này có chứa sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa trong đó sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa này có chứa ít hơn mười một, mười, chín, tám, bảy, sáu, hoặc năm 2'-đeoxyfloro.

Theo các khía cạnh nhất định, tác nhân ARNi mạch kép được mô tả trong bản mô tả này có chứa sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa, trong đó sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa này có chứa ít hơn mười, chín, tám, bảy, sáu, năm, bốn cầu nối giữa các nucleotit phosphorothioat.

Theo các khía cạnh nhất định, tác nhân ARNi mạch kép được mô tả trong bản mô tả này có chứa sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa, trong đó sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa này có chứa ít hơn mười 2'-đeoxyfloro và ít hơn sáu cầu nối giữa các nucleotit phosphorothioat.

Theo các khía cạnh nhất định, tác nhân ARNi mạch kép được mô tả trong bản mô tả này có chứa sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa, trong đó sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa này có chứa ít hơn tám 2'-đeoxyfloro và ít hơn sáu cầu nối giữa các nucleotit phosphorothioat.

Theo các khía cạnh nhất định, tác nhân ARNi mạch kép được mô tả trong bản mô tả này có chứa sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa, trong đó sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa này có chứa ít hơn chín 2'-đeoxyfloro và ít hơn sáu cầu nối giữa các nucleotit phosphorothioat.

Phối tử

Tác nhân ARNi mạch kép theo sáng chế có thể tùy ý được liên hợp với một hoặc nhiều phối tử. Phối tử này có thể được gắn với sợi có nghĩa, sợi đối nghĩa hoặc cả hai sợi, ở đầu 3', đầu 5' hoặc cả hai đầu. Trong trường hợp này, phối tử có thể được liên hợp vào sợi có nghĩa. Theo một số phương án, phối tử được liên hợp với đầu 3' của sợi có nghĩa. Theo một phương án, phối tử là phối tử GalNAc. Cụ thể là theo một số phương án, phối tử là $GalNAc_3$. Phối tử được ghép đôi, tốt hơn là theo cách cộng hóa trị, trực tiếp hoặc gián tiếp *thông qua* dây xen giữa.

Theo một số phương án, phối tử làm thay đổi sự phân bố, sự hướng đích hoặc tuổi thọ của phân tử mà nó được kết hợp vào. Theo một số phương án phối tử tạo ra ái lực được tăng cường đối với đích được chọn, *ví dụ*, phân tử, tế bào hoặc loại tế bào, khoang, thụ thể *ví dụ*, khoang tế bào hoặc cơ quan, mô, cơ quan hoặc vùng của cơ thể, khi, *ví dụ*, so với các loại không có phối tử này. Phối tử tạo ra ái lực tăng cường đối với đích chọn lọc còn được gọi là phối tử hướng đích.

Một số phối tử có thể có các đặc tính nội thẩm thấu. Các phối tử nội thẩm thấu thúc đẩy quá trình làm tan thể nhân và/hoặc vận chuyển chế phẩm theo sáng chế, hoặc các thành phần của nó từ thể nhân đến tế bào chất của tế bào. Phối tử nội thẩm thấu có thể là peptit polyanion hoặc giả peptit thể hiện hoạt tính màng phụ thuộc pH và tính gây dung hợp. Theo một phương án, phối tử nội thẩm thấu giả định cấu hình hoạt động của nó ở pH của thể nhân. Cấu hình "hoạt động" là cấu hình mà đó phối tử nội thẩm thấu thúc đẩy quá trình phân

giải hạt cơ quan nội bào và/hoặc vận chuyển chế phẩm theo sáng chế, hoặc thành phần của nó, từ hạt nội bào đến tế bào chất của tế bào. Phối tử nội thẩm thấu ví dụ bao gồm peptit GALA (Subbarao *và cộng sự.*, *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972), peptit EALA (Vogel *và cộng sự.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586), và dẫn xuất của chúng (Turk *và cộng sự.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68). Theo một phương án, thành phần nội thẩm thấu có thể chứa nhóm hóa học (*ví dụ*, axit amin) sẽ trải qua sự thay đổi về điện tích hoặc phản ứng proton hóa để phản ứng lại với sự thay đổi pH. Thành phần nội thẩm thấu có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh.

Các phối tử có thể cải thiện sự vận chuyển, lai, và các đặc tính đặc biệt và cũng có thể cải thiện tính kháng nucleaza của oligoribonucleotit tự nhiên hoặc được cải biến thu được, hoặc phân tử polyme chứa tổ hợp bất kỳ của các monome được mô tả ở đây và/hoặc ribonucleotit tự nhiên hoặc được cải biến.

Nhìn chung, các phối tử có thể bao gồm các chất cải biến điều trị bệnh, *ví dụ*, để tăng cường hấp thu; các hợp chất chẩn đoán hoặc các nhóm báo cáo *ví dụ*,để kiểm soát sự phân bố; tác nhân liên kết ngang; và các gốc gây ra tính kháng nucleaza. Các ví dụ chung bao gồm lipit, steroit, vitamin, đường, protein, peptit, polyamin, và các chất giả peptit.

Phối tử có thể bao gồm chất có trong tự nhiên, như protein (*ví dụ*, albumin huyết thanh người (HSA), lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL), lipoprotein tỷ trọng cao (HDL), hoặc globulin); carbohyđrat (*ví dụ*, đextran, pululan, chitin, chitosan, inulin, xyclođextrin hoặc axit hyaluronic); hoặc lipit. Phối tử có thể còn là phân tử tái tổ hợp hoặc tổng hợp, như polyme tổng hợp, *ví dụ*, axit polyamino tổng hợp, oligonucleotit (*ví dụ*, aptame). Các ví dụ về các axit polyamino bao gồm axit polyamino là polylysin (PLL), axit poly L-aspartic, axit poly L-glutamic, copolyme của axit styren-maleic anhyđrit, copolyme của poly(L-lactit-co-glycolit), copolyme của đivinyl ete-maleic anhyđrit, copolyme của N-(2-hyđroxypropyl)methacrylamit (HMPA), polyetylen glycol (PEG), rượu polyvinyl (PVA), polyuretan, poly(axit 2-etylacryllic), N-isopropylacrylamit polyme, hoặc polyphosphazin. Ví dụ về polyamin bao gồm: polyetylenimin, polylysin (PLL), xpecmin, xpecmiđin, polyamin, giả peptit-polyamin, polyamin bắt chước peptit, polyamin đenđrime, arginin, amiđin, protamin, cation lipit, cation porphyrin, muối bậc bốn của polyamin, hoặc peptit xoắn alpha.

Phối tử còn có thể bao gồm các nhóm tìm mục tiêu, *ví dụ*, tế bào hoặc mô tác nhân tìm mục tiêu, *ví dụ*, lectin, glycoprotein, lipit hoặc protein, *ví dụ*, kháng thể, mà liên kết với loại tế bào cụ thể như tế bào thận. Nhóm hướng đích có thể là thyrotropin, melanotropin, lectin, glycoprotein, protein A có hoạt tính bề mặt, carbohyđrat dịch nhày, lactoza đa trị, galactoza đa trị, N-axetyl-galactosamin, manoza đa trị N-axetyl-gulucosamin, fucoza đa trị, polyaminoaxit glycosylat, galactoza đa trị, transferin, bisphosphonat, polyglutamat, polyaspartat, lipit, cholesterol, steroit, axit mật, folat, vitamin B12, biotin, peptit RGD, chất giả peptit RGD hoặc aptame.

Các ví dụ khác về phối tử bao gồm chất nhuộm, tác nhân xen kẽ (*ví dụ*, acriđin), chất liên kết chéo (*ví dụ*, psoralen, mitomyxin C), porphyrin (TPPC4, texaphyrin, Sapphyrin), hyđrocacbon thơm đa vòng (*ví dụ*, phenazin, đihyđrophenazin), enđonucleaza nhân tạo hoặc chất càng hóa (*ví dụ*, EDTA), phân tử ưa lipit, *ví dụ*, cholesterol, axit cholic, axit axetic ađamantan, 1-pyren axit butyric, đihyđrotestosteron, 1,3-Bis-O(hexađexyl)glyxerol, nhóm geranyloxyhexyl, hexađexylglyxerol, borneol, tinh dầu bạc hà, 1,3-propanđiol, nhóm heptađexyl, axit palmitic, axit myristic, axit O3-(oleoyl)lithocholic, axit O3-(oleoyl)cholenic, đimetoxytrityl, hoặc phenoxazin) và thể liên hợp peptit (*ví dụ*, peptit antennapeđia, peptit Tat), tác nhân alkyl hóa, phosphat, amino, mercapto, PEG (*ví dụ*, PEG-40K), MPEG, $[MPEG]_2$, polyamino, alkyl, alkyl được thế, chất chỉ thị được đánh dấu phóng xạ, enzym, hapten (*ví dụ*, biotin), chất làm thuận tiện cho sự vận chuyển/hấp thụ (*ví dụ*, aspirin, vitamin E, axit folic), ribonucleaza tổng hợp (*ví dụ*, imiđazol, bisimiđazol, histamin, cụm imiđazol, thể liên hợp acriđin-imiđazol, phức hợp Eu3+ của vòng lớn tetraaza), đinitrophenyl, HRP, hoặc AP.

Các phối tử có thể là protein, *ví dụ*, glycoprotein, hoặc peptit, *ví dụ*, các phân tử có ái lực đặc hiệu với đồng phối tử, hoặc các kháng thể *ví dụ*, kháng thể mà liên kết với loại tế bào cụ thể như tế bào ung thư, tế bào màng trong, hoặc tế bào xương. Phối tử có thể còn bao gồm các hormon và thụ thể của hormon. Chúng có thể còn bao gồm các loại không phải peptit, như lipit, lectin, carbohyđrat, vitamin, thừa số bổ trợ, lactoza đa trị, galactoza đa trị, N-axetyl-galactosamin, N-axetyl-gulucosamin manoza đa trị, fucoza đa trị, hoặc aptame. Phối tử có thể là, ví dụ, lipopolysacarit, chất kích hoạt của p38 MAP kinaza, hoặc chất kích hoạt của NF-κB.

Phối tử có thể là một chất, *ví dụ*, thuốc, mà có thể làm gia tăng sự hấp thu của tác nhân ARNi vào trong tế bào, ví dụ, bằng cách phá vỡ bộ khung tế bào của tế bào, *ví dụ*, bằng cách phá vỡ các vi cấu trúc hình ống của tế bào, các vi sợi, và/hoặc các sợi trung. Thuốc có thể là, ví dụ, taxon, vincristin, vinblastin, xytochalasin, nocođazol, japlakinolit, latrunculin A, phalloidin, swinholit A, inđanoxin, hoặc myoservin.

Phối tử có thể làm tăng sự hấp thu oligonucleotit trong tế bào bằng cách, ví dụ, hoạt hóa phản ứng viêm. Ví dụ về các phối tử có các tác dụng này bao gồm yêu tố hoại tử mô alpha (TNFalpha), interleukin-1 beta, hoặc gamma interferon.

Theo một khía cạnh, phối tử là lipit hoặc phân tử trên cơ sở lipit. Lipit hoặc phân tử trên cơ sở lipit như vậy tốt hơn là gắn huyết thanh protein, *ví dụ*, albumin huyết thanh của người (HSA). Phối tử liên kết HSA cho phép phân phối chất liên hợp đến mô mục tiêu, *ví dụ*, mô đích không phải là thận của cơ thể. Ví dụ, mô mục tiêu có thể là gan, bao gồm tế bào nhu mô của gan. Các phân tử khác mà có thể liên kết HSA còn có thể được sử dụng như các phối tử. Ví dụ, naproxen hoặc aspirin có thể được sử dụng. Phối tử lipit hoặc cơ sở lipit có thể () gia tăng sự kháng việc suy thoái của liên hợp, (b) gia tăng việc nhắm hoặc vận chuyển vào trong tế bào đích hoặc màng tế bào, và/hoặc (c) có thể được sử dụng để điều chỉnh liên kết với huyết thanh protein, *ví dụ*, HSA.

Phối tử trên cơ sở lipit có thể được sử dụng đển điều biến, *ví dụ*, kiểm soát liên kết của phức với mô đích. Ví dụ, lipit hoặc phối tử cơ sở lipit mà liên kết với HSA mạnh mẽ hơn sẽ ít có khả năng bị nhắm đến thận và do đó ít có khả năng bị xóa khỏi cơ thể. Lipit hoặc phối tử cơ sở lipit mà liên kết với HSA yếu hơn có thể được sử dụng nhắm đến liên hợp thận.

Theo một phương án, phối tử gốc lipit liên kết HSA. Tốt hơn là, nó liên kết với HSA với ái lực đủ mà liên hợp sẽ được phân phối tốt hơn là đến một mô không phải thận. Theo một phương án, ái lực phù hợp để cho sự liên kết phối tử HSA có thể được đảo ngược. Theo phương án khác, phối tử gốc lipit liên kết HSA yếu hoặc không liên kết, sao cho thể liên hợp tốt hơn là sẽ được phân phối cho thận. Các gốc khác mà nhắm đến tế bào thận còn có thể được sử dụng ở vị trí hoặc ngoài ra với phối tử cơ sở lipit.

Theo khía cạnh khác, phối tử là gốc, *ví dụ*, vitamin, mà được hấp thụ bởi tế bào đích, *ví dụ*, tế bào phát triển hạt nhân. Các phối tử này đặc biệt hữu dụng để điều trị các rối loạn

được đặc trưng bởi quá trình tăng sinh tế bào không mong muốn, *ví dụ*, loại ác tính hoặc không ác tính, *ví dụ*, tế bào ung thư. Ví dụ về vitamin bao gồm vitamin A, E, và K. Ví dụ khác về vitamin bao gồm vitamin B, *ví dụ*, axit folic, B12, riboflavin, biotin, pyriđoxal hoặc vitamin khác hoặc các chất dinh dưỡng được tế bào ung thư hấp thụ. Các chất này còn bao gồm HAS, lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL) và lipoprotein tỷ trọng cao (HDL).

Theo khía cạnh khác, phối tử là tác nhân thẩm thấu tế bào, tốt hơn là tác nhân thẩm thấu tế bào xoắn. Tốt hơn là, tác nhân là lưỡng tính. Tác nhân mẫu mực là peptit như tat hoặc antennopeđia. Nếu tác nhân là peptit, nó có thể được cải biến, bao gồm peptidylmimetic, invertome, kết nối không-peptit hoặc giả-peptit, và việc sử dụng của D-axit amin. Tác nhân xoắn ốc thì tốt hơn là tác nhân xoắn ốc alpha, mà tốt hơn là có pha ưa lipit và kỵ lipit.

Phối tử có thể là peptit hoặc chất bắt chước peptit. Chất bắt chước peptit (cũng được đề cập đến ở đây như chất bắt chước oligopeptit) là phân tử có khả năng gập thành cấu trúc ba chiều tương tự như peptit tự nhiên. Peptit hoặc chất bắt chước peptit gốc có thể là dài khoảng 5-50 axit amin, *ví dụ*, dài khoảng 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, hoặc 50 axit amin. Peptit hoặc giả peptit có thể là, ví dụ, peptit thấm qua tế bào, peptit tích điện dương, peptit lưỡng cực, hoặc peptit kỵ nước (*ví dụ*, chủ yếu chứa Tyr, Trp hoặc Phe). Gốc peptit có thể là peptit đenđrime, peptit giới hạn hoặc peptit liên kết chéo. Theo cách khác, gốc peptit có thể bao gồm trình tự chuyển vị màng (MTS) kỵ nước. Peptit chứa MTS kỵ nước ví dụ là RFGF có trình tự axit amin AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 9). Chất tương tự RFGF (*ví dụ*, trình tự axit amin AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 10)) chứa MTS kỵ nước cũng có thể là gốc hướng đích. Gốc peptit có thể là peptit "vận chuyển", mà có thể mang các phân tử có cực lớn bao gồm peptit, oligonucleotit, và protein qua tế bào các màng tế bào. Ví dụ, các trình tự từ protein Tat của HIV (GRKKRRQRRRPPQ) (SEQ ID NO: 11) và protein Antennapedia của Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK) (SEQ ID NO: 12) được thấy rằng có khả năng hoạt tính như peptit vận chuyển. Peptit hoặc chất bắt chước peptit có thể được mã hóa bởi trình tự ngẫu nhiên của ADN, chẳng hạn như peptit được nhận dạng từ thư viện biểu hiện pha gơ, hoặc thư viện tổ hợp một-hạt-một-hợp chất (OBOC) (Lam *và cộng sự.*, *Nature*, 354:82-84, 1991). Tốt hơn là peptit hoặc chất bắt chước peptit được nối với tác nhân iARN qua đơn vị monome đưa vào là peptit hướng đích tế bào như peptit axit arginin-

glyxin-aspartic (RGD)-peptit, hoặc chất bắt chước RGD. Gốc peptit có thể có chiều dài khoảng từ 5 axit amin đến 40 axit amin. Các gốc peptit có thể có cấu trúc cải biến, như làm tăng tính tính ổn định hoặc đặc tính hình thái trực tiếp. Bất kỳ cấu trúc các cải biến được mô tả dưới đây có thể được sử dụng. Gốc peptit RGD có thể được dùng để hướng đích tế bào khối u, chẳng hạn như tế bào khối u nội mạc hoặc tế bào khối u ung thư vú (Zitzmann *và cộng sự.*, *Cancer Res.*, 62:5139-43, 2002). Peptit RGD có thể làm thuận tiện cho việc hướng đích của tác nhân iARN vào khối u của nhiều loại mô khác, bao gồm phổi, thận, lách, hoặc gan (Aoki *và cộng sự.*, *Cancer Gene Therapy* 8:783-787, 2001). Tốt hơn là, peptit RGD sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho việc hướng đích của tác nhân iARN đến thận. Peptit RGD có thể mạch thẳng hoặc mạch vòng, và có thể được cải biến, *ví dụ*, được glycosyl hóa hoặc metylat hóa để tạo thuận lợi cho sự hướng đích đến các mô cụ thể. Ví dụ, peptit RGD được glycosyl hóa có thể phân phối tác nhân iARN đến tế bào khối u biểu hiện $\alpha_V\beta_3$ (Haubner *và cộng sự.*, *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001). Peptit mà các dấu chuẩn đích được làm giàu trong tế bào đang tăng sinh có thể được sử dụng. Ví dụ, RGD chứa peptit và giả peptit có thể hướng đích đến tế bào ung thư, cụ thể là tế bào biểu hiện integrin. Do đó, chuyên gia trong lĩnh vực có thể sử dụng peptit RGD, peptit vòng chứa RGD, peptit RGD mà bao gồm D-axit amin, cũng như giả RGD tổng hợp. Ngoài RGD, chuyên gia trong lĩnh vực có thể sử dụng các gốc khác hướng đích đến phối tử của integrin. Nhìn chung, phối tử này có thể được dùng để kiểm soát tế bào tăng sinh và sự hình thành mạch. Một số thể liên hợp thuộc loại này của phối tử hướng đích PECAM-1, VEGF, hoặc gen ung thư khác, *ví dụ*, gen ung thư khác được mô tả trong bản mô tả này.

"Peptit thẩm thấu tế bào" có thể thẩm thấu qua tế bào, *ví dụ*, tế bào vi sinh vật, như vi khuẩn hoặc tế bào nấm, hoặc tế bào động vật có vú, như tế bào của người. Peptit thẩm thấu tế bào vi khuẩn có thể là, ví dụ, peptit mạch thẳng xoắn α (*ví dụ*, LL-37 hoặc Ceropin P1), peptit chứa liên kết đisulfua(*ví dụ*, α -đefensin, β-đefensin hoặc bactenexin), hoặc peptit chỉ chứa một hoặc hai axit amin trội (*ví dụ*, PR-39 hoặc inđolixiđin). Peptit thẩm thấu tế bào còn có thể bao gồm tín hiệu định vị nhân (NLS). Ví dụ, peptit thẩm thấu tế bào có thể là peptit lưỡng tính hai nhánh, chẳng hạn như MPG, mà có nguồn gốc từ miền peptit dung hợp của gp41 HIV-1 và NLS của kháng nguyên T lớn SV40 (Simeoni và cộng sự., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

Theo một phương án, peptit hướng đích có thể là peptit lưỡng cực xoắn ốc α. Ví dụ về peptit lưỡng cực xoắn ốc α bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xecropin, lycotoxin, parađaxin, buforin, CPF, peptit tương tự bombinin (BLP), cathelixiđin, xeratotoxin, peptit S. clava, peptit kháng vi khuẩn ở ruột cá mút đá myxin (HFIAPs), magainin, brevinin-2, đermaseptin, melittin, pleuroxiđin, peptit H_2A, peptit Xenopus, esculentinis-1, và caerin. Tốt hơn, một số yếu tố sẽ được xem xét để duy trì tính toàn vẹn của độ ổn định chuỗi xoắn. Ví dụ, số lượng tối đa gốc làm ổn định chuỗi xoắn sẽ được sử dụng (*ví dụ*, leu, ala, hoặc lys), và số lượng tối thiểu gốc khử ổn định chuỗi xoắn được sử dụng (*ví dụ*, prolin, hoặc đơn phân monome mạch vòng. Gốc gắn mũ sẽ được xem xét (ví dụ Gly là ví dụ về gốc gắn mũ N và/hoặc amit hòa đầu tận cùng C có thể được sử dụng để tạo ra liên kết H biên ngoài để làm ổn định chuỗi xoắn. Sự tạo thành cầu nối muối giữa gốc có điện tích trái dấu, được phân tách bởi các vị trí i ± 3, hoặc i ± 4 có thể tạo ra tính ổn định. Ví dụ, gốc tích điện dương như lysin, arginin, homo-arginin, ornithin hoặc histiđin có thể tạo cầu nối muối với gốc anion glutamat hoặc aspartat.

Phối tử peptit và giả peptit bao gồm các peptit có trong tự nhiên hoặc peptit được cải biến, *ví dụ*, peptit D hoặc L; peptit α, β, hoặc γ; peptit N-metyl; azapeptit; peptit có một hoặc nhiều amit, *tức là*, peptit, các liên kết được thay thế bằng một hoặc nhiều liên kết urê, thiourê, carbamat, hoặc sulfonyl urê; hoặc peptit mạch vòng.

Phối tử hướng đích có thể là phối tử bất kỳ mà có khả năng hướng đích đến thụ thể cụ thể. Các ví dụ là: folat, GalNAc, galactoza, manoza, manoza-6P, cụm đường chẳng hạn như cụm GalNAc, cụm manoza, cụm galactoza, hoặc aptame. Nhóm là tổ hợp gồm hai hoặc nhiều tiểu phần đường. Các phối tử hướng đích cũng bao gồm các phối tử thụ thể integrin, các phối tử thụ thể chemokin, transferin, biotin, các phối tử thụ thể serotonin, PSMA, enđothelin, GCPII, somatostatin, các phối tử LDL và HDL. Phối tử cũng có thể dược trên axit nucleic, *ví dụ*, aptame. Aptame có thể không được cải biến hoặc có tổ hợp bất kỳ của các cải biến được bộc lộ ở đây.

Các tác nhân giải phóng thể hạt bao gồm imiđazol, poly hoặc oligoimiđazol, PEI, peptit, peptit tạo dung hợp, polycaboxylat, polyatích điện dương, oligo che giấu hoặc poly tích điện dương hoặc anion, axetal, polyaxetal, ketal/polyketyal, orthoester, polyme có thay

đổi tích điện dương hoặc anion được che giấu hoặc không được che giấu, đenđrime có thay đổi tích điện dương hoặc anion được che giấu hoặc không được che giấu.

Các chất điều biến PK là tên viết tắt của chất điều biến dược động học. Các chất điều biến PK bao gồm chất ưa lipit, axit mật, steroit, chất tương tự phospholipit, peptit, chất liên kết protein, PEG, vitamin v.v. Các chất điều biến PK ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cholesterol, axit béo, axit cholic, axit lithocholic, đialkylglyxerit, điaxylglyxerit, phospholipit, sphingolipit, naproxen, ibuprofen, vitamin E, biotin v.v. Oligonucleotit mà có chứa một số lượng các liên kết phosphorothioat còn được biết là liên kết với protein huyết thanh, do đó oligonucleotit ngắn, *ví dụ*, oligonucleotit có khoảng 5 bazơ, 10 bazơ, 15 bazơ hoặc 20 bazơ, chứa nhiều liên kết phosphorothioat trong khung cũng có thể tuân theo sáng chế làm phối tử (*ví dụ*, làm phối tử điều biến PK).

Ngoài ra, aptame mà liên kết với các thành phần trong huyết thanh (*ví dụ*, protein trong huyết thanh) cũng có thể làm phối tử điều biến PK theo sáng chế.

Các liên hợp phối tử khác theo sáng chế được mô tả các đơn sáng chế Mỹ USSN: 10/916,185, nộp ngày 10 tháng 8 năm 2004; USSN: 10/946,873, nộp ngày 21 tháng 9 năm 2004; USSN: 10/833,934, nộp ngày 3 tháng 8 năm 2007; USSN: 11/115,989 nộp ngày 27 tháng 4 năm 2005 và USSN: 11/944,227 nộp ngày 21 tháng 11 năm 2007, được kết hợp ở đây chỉ nhằm mục đích tham khảo.

Khi có mặt hai hoặc nhiều phối tử, các phối tử này có thể có tất cả các đặc tính giống nhau, tất cả các đặc tính khác nhau hoặc một số phối tử có các đặc tính giống nhau trong khi một số khác lại có đặc tính khác nhau. Ví dụ, phối tử có thể có các đặc tính hướng đích, có hoạt tính nội thẩm thấu hoặc có đặc tính điều biến PK. Theo một phương án, tất cả các phối tử có các tính chất khác nhau.

Các phối tử có thể được nối với oligonucleotit ở các vị trí khác nhau, ví dụ, đầu 3', đầu 5', và/hoặc ở vị trí giữa. Theo một số phương án, phối tử được gắn vào oligonucleotit *thông qua* dây xen giữa, *ví dụ*, chất mang được mô tả trong bản mô tả này. Phối tử hoặc phối tử được nối có thể có mặt trên monome nếu monome này được kết hợp vào sợi đang được tổng hợp. Theo một số phương án, phối tử có thể được kết hợp nhờ nối với "tiền tố" monome sau khi "tiền tố" monome này đã được đưa vào sợi đang phát triển. Ví dụ, monome có, *ví dụ*, dây được kết thúc bởi amin (*tức là*, không có phối tử kết hợp), *ví dụ*, TAP-

$(CH_2)_nNH_2$ có thể được kết hợp vào sợi oligonucleotit phát triển. Trong công đoạn tiếp theo, *tức là*, sau khi kết hợp tiền tố monome vào sợi, phối tử có nhóm ái điện tử, *ví dụ*, nhóm pentaflophenyl este hoặc alđehyt, sau đó có thể gắn vào tiền tố monome bằng cách nối nhóm ái điện tử này của phối tử với nhóm ái nhân ở đầu tận cùng của mối nối của tiền tố monome.

Trong một ví dụ khác, monome có nhóm hóa học thích hợp để tham gia phản ứng hóa học Click có thể được kết hợp, *ví dụ*, đoạn nối/liên kết tận cùng là azit hoặc alkyne. Trong hoạt động tiếp theo, *tức là*, sau khi kết hợp monome tiền chất vào sợi, phối tử có nhóm hóa học bổ sung, *ví dụ* alkyne hoặc azit có thể được gắn vào monome tiền chất bằng cách cặp đôi alkyne và azit với nhau.

Theo một số phương án, phối tử có thể được liên hợp với nucleobazơ, gốc đường, hoặc liên kết internucleosiđic của các phân tử axit nucleic. Sự liên hợp với nucleobazơ purin hoặc dẫn xuất của nó có thể xảy ra ở vị trí bất kỳ bao gồm, các nguyên tử trong vòng hoặc ngoài vòng. Theo một số phương án, các vị trí 2, 6, 7, hoặc 8 của nucleobazơ purin được gắn với gốc liên hợp. Sự liên hợp với nucleobazơ pyrimiđin hoặc dẫn xuất của nó cũng có thể xảy ra ở vị trí bất kỳ. Theo một số phương án, các vị trí 2, 5, và 6 của nucleobazơ pyrimiđin có thể được thế bằng gốc liên hợp. Sự liên hợp với các gốc đường của nucleosit có thể xảy ra nguyên tử cacbon bất kỳ. Ví dụ về nguyên tử cacbon của gốc đường có thể được gắn vào gốc liên hợp bao gồm nguyên tử cacbon ở vị trí 2', 3', và 5'. Vị trí 1' cũng có thể được gắn với gốc liên hợp, như trong gốc không bazơ. Liên kết giữa các nucleosit cũng có thể mang gốc liên hợp. Đối với liên kết chứa phospho (*ví dụ*, phosphođieste, phosphothioat, phosphorodithiotat, phosphoroamiđat, và liên kết tương tự), gốc liên hợp có thể được gắn trực tiếp vào nguyên tử phospho hoặc vào nguyên tử O, N, hoặc S được liên kết với nguyên tử phospho. Đối với liên kết giữa nucleosit chứa amin hoặc amit (*ví dụ*, PNA), gốc liên hợp có thể được gắn vào nguyên tử nitơ của amin hoặc amit hoặc vào nguyên tử cacbon bên cạnh.

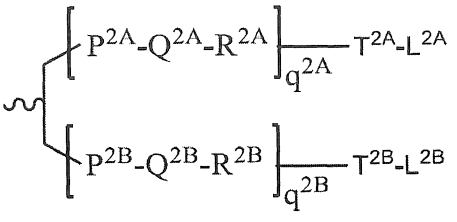
Phối tử GalNAc và cầu nối

Theo một số phương án, siARN hướng đích vào gen HAO1 được liên hợp với carbohyđrat *ví dụ* monosacarit (chẳng hạn như GalNAc), đisacarit, trisacarit, tetrasacarit, polysacarit. Theo một số phương án, siARN được liên hợp với phối tử N-

axetylgalactosamin (GalNAc). Tăng cường sự phân phối hiệu quả đến tế bào gan sau khi dùng dưới da. Phương pháp kết hợp carbohyđrat, ví dụ, N-axetylgalactosamin, với, ví dụ, siARN đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Các ví dụ có thể được tìm thấy trong US8,106,022 và WO2014/025805.

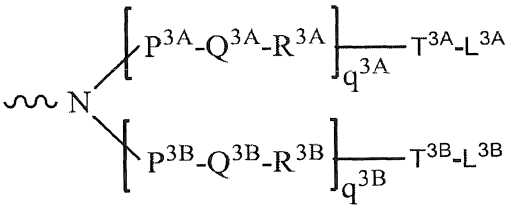
Theo một số phương án, siARN hướng đích gen HAO1 được liên hợp với phối tử, ví dụ, với GalNac, thông qua cầu nối. Ví dụ, phối tử có thể là một hoặc nhiều dẫn xuất GalNAc (*N*-axetylglucosamin) được gắn thông qua cầu nối nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba.

Theo một phương án, dsARN theo sáng chế được liên hợp với cầu nối nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba bao gồm các cấu trúc được thể hiện trong công thức bất kỳ trong số các công thức (IV) – (VII):



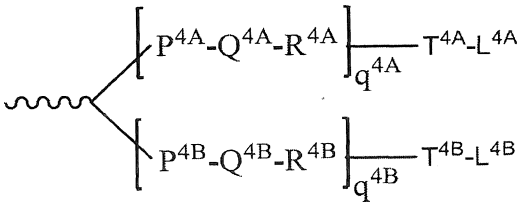
Công thức (IV)

,



Công thức (V)

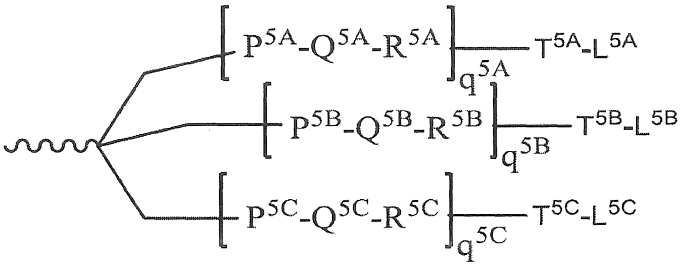
,



Công thức (VI)

,,

hoặc



Công thức (VII) ;

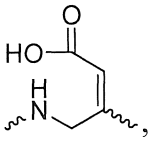
trong đó:

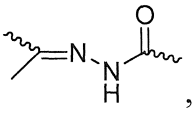
q^{2A}, q^{2B}, q^{3A}, q^{3B}, $q4^{A}$, q^{4B}, q^{5A}, q^{5B} và q^{5C} độc lập biểu thị cho mỗi lần xuất hiện của 0-20 và trong đó đơn vị lặp có thể giống hoặc khác nhau;

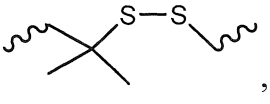
mỗi P^{2A}, P^{2B}, P^{3A}, P^{3B}, P^{4A}, P^{4B}, P^{5A}, P^{5B}, P^{5C}, T^{2A}, T^{2B}, T^{3A}, T^{3B}, T^{4A}, T^{4B}, T^{4A}, T^{5B}, T^{5C} độc lập là đối với mỗi lần lặp lại vắng mặt, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH_2, CH_2NH hoặc CH_2O;

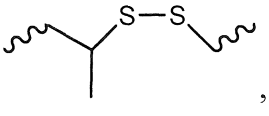
Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C} độc lập là đối với mỗi sự không có mặt, alkylen, alkylen được thế trong đó một hoặc nhiều metylen có thể bị ngắt quãng hoặc bị kết thúc bởi một hoặc nhiều O, S, S(O), SO_2, $N(R^N)$, C(R')=C(R''), C≡C hoặc C(O);

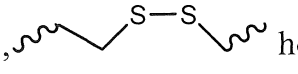
mỗi R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C} độc lập là đối với mỗi lần lặp lại vắng mặt, NH, O, S, CH_2, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,



,


,


,


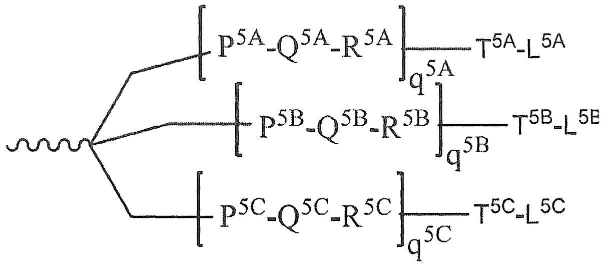
,


hoặc heteroxyclyl;

L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B} và L^{5C} biểu thị phối tử; *tức là* mỗi nhóm độc lập cho mỗi lần xuất hiện monosacarit (như GalNAc), đisacarit, trisacarit, tetrasacarit, oligosacarit, hoặc polysacarit; và

R^a là H hoặc chuỗi axit amin bên.

Dẫn xuất GalNAc liên hợp hóa trị ba là đặc biệt hữu dụng để sử dụng với tác nhân ARNi để ức chế sự biểu hiện của gen đích, như các dẫn xuất có công thức (VII):

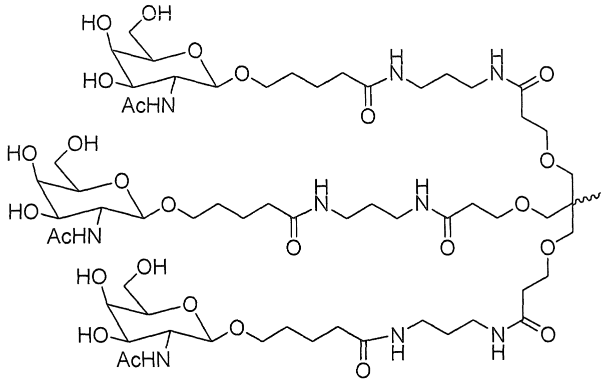


Công thức (VII)

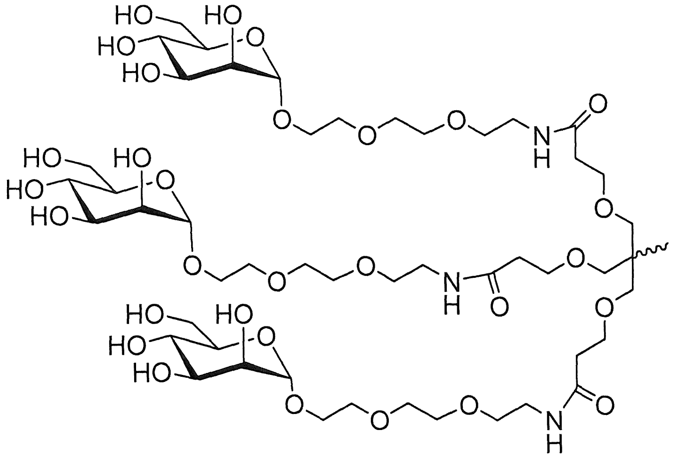
,

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

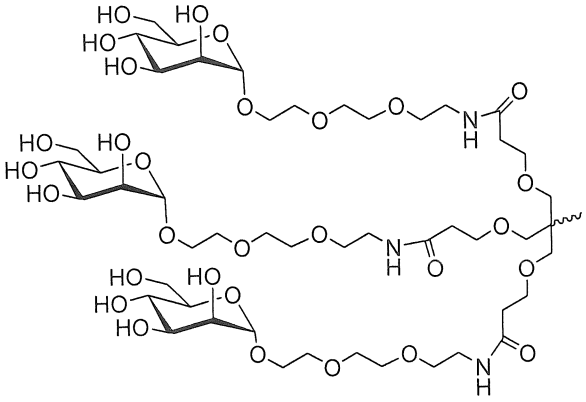
Ví dụ về các nhóm liên kết nhánh hóa trị hai và hóa trị ba phù hợp liên hợp với dẫn xuất GalNAc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hợp chất sau:



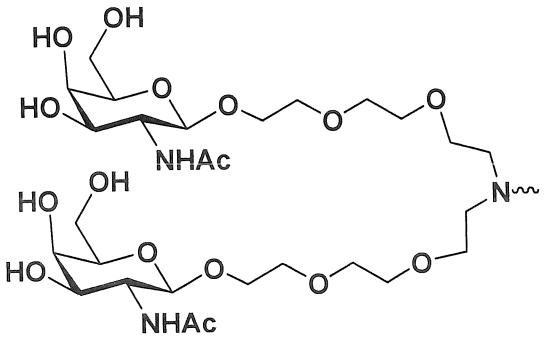
,



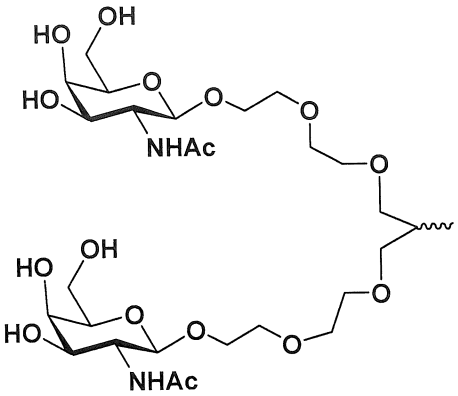
,



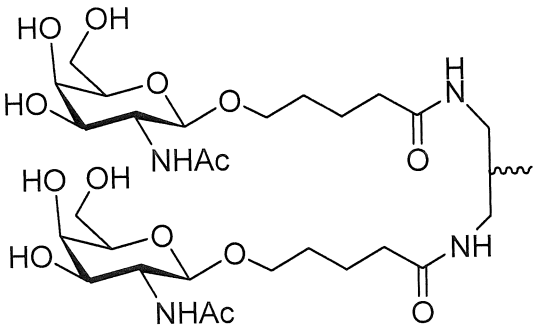
,



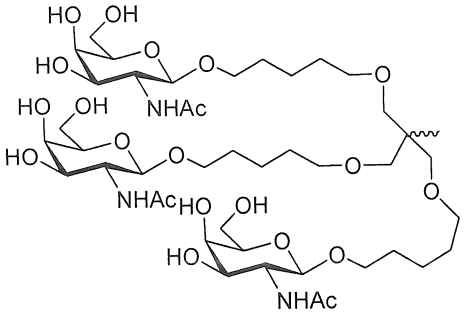
,

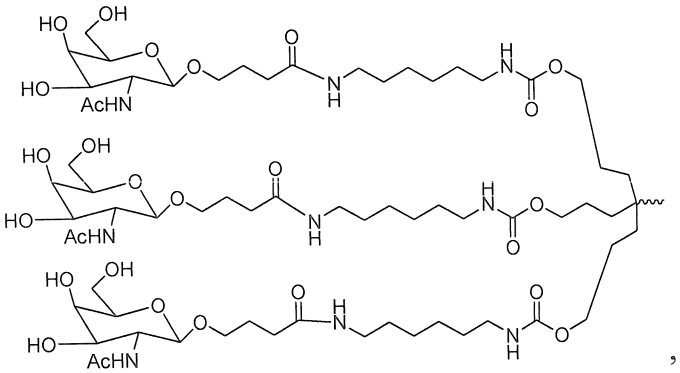


,

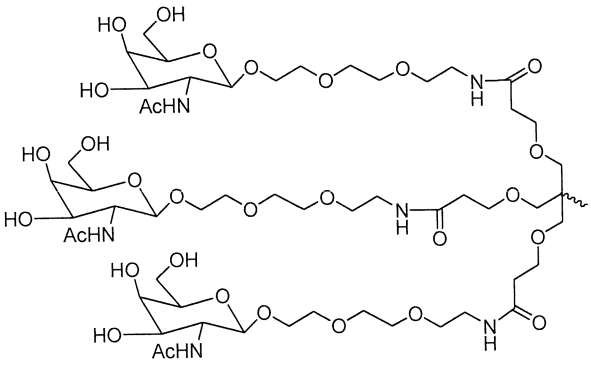


,

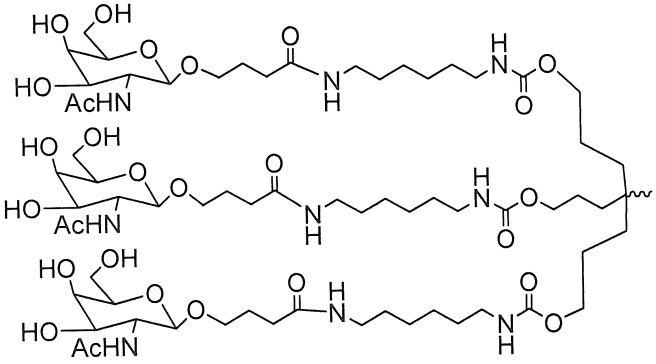




,



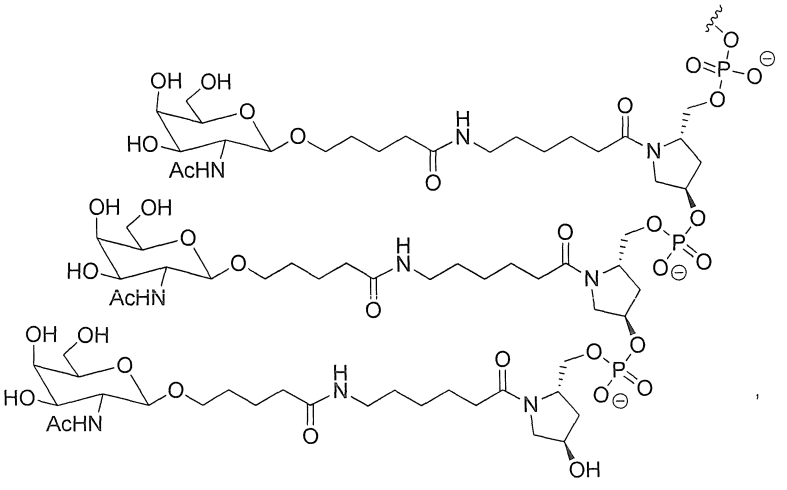
, hoặc

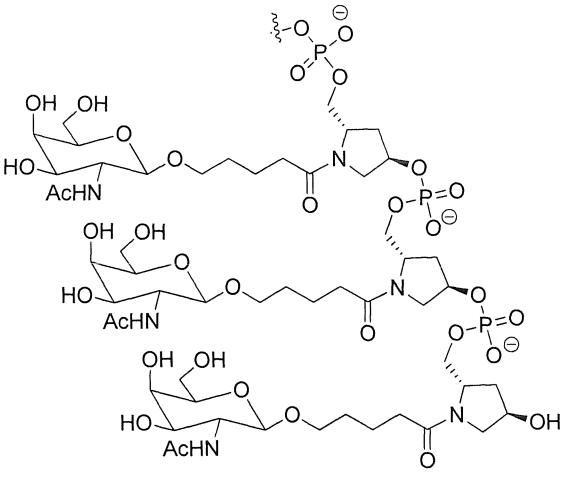


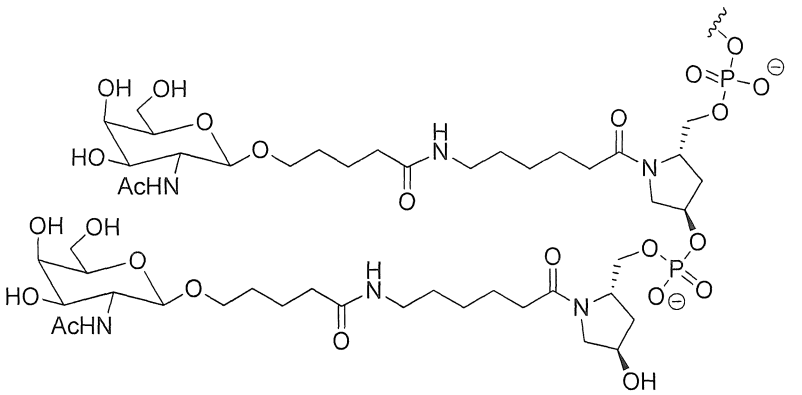
,

Các phối tử khác

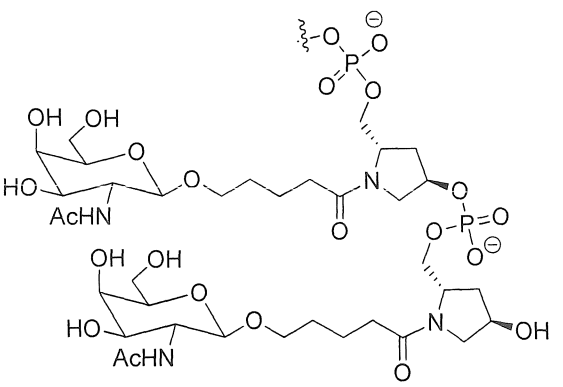
Theo một số phương án phối tử được chọn từ một trong số các phối tử sau:



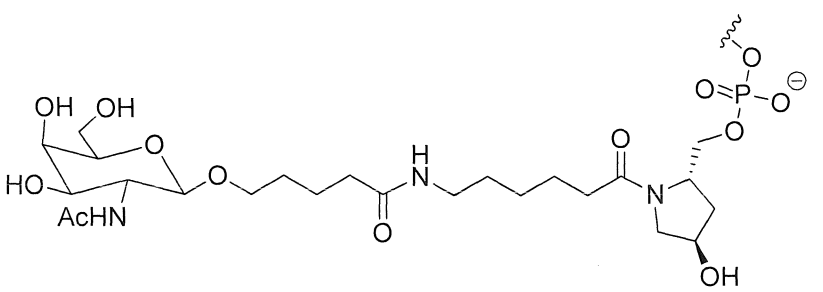




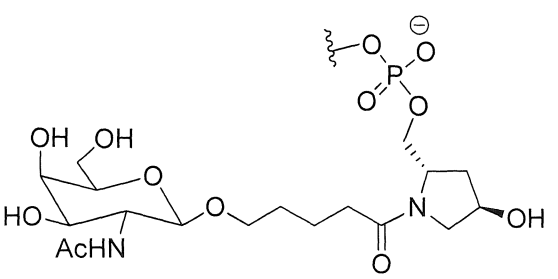
,



,



, and



.

III. Phân phối ARNi theo sáng chế

Sự phân phối tác nhân iARN theo sáng chế cho tế bào *ví dụ,* tế bào ở đối tượng, chẳng hạn như người (*ví dụ,* đối tượng cần chúng, chẳng hạn như đối tượng mắc rối loạn có

kết hợp với HAO1) có thể đạt được theo một số cách khác nhau. Ví dụ, việc phân phối có thể được thực hiện bằng cách cho tế bào tiếp xúc với ARNi theo sáng chế hoặc *trong ống nghiệm* hoặc *trong cơ thể*. Việc phân phối *trong cơ thể* có thể cũng được thực hiện một cách trực tiếp bằng cách sử dụng chế phẩm bao gồm ARNi, *ví dụ,* dsARN, cho đối tượng. Tùy ý, việc phân phối *trong cơ thể* có thể được thực hiện một cách gián tiếp bằng cách sử dụng một hoặc nhiều vật truyền mà mã hóa và định hướng sự biểu hiện của ARNi. Các thay thế này được trình bày dưới đây.

Nhìn chung, phương pháp bất kỳ để phân phối phân tử axit nucleic (*in vitro* hoặc *in vivo*) có thể được làm thích ứng để sử dụng với iARN theo sáng chế (xem ví dụ, Akhtar S. và Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 và WO94/02595, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ). Để phân phối *trong cơ thể* , các yếu tố cần phải xem xét để phân phối một phân tử ARNi bao gồm, ví dụ, tính ổn định sinh học của phân tử được phân phối, sự ngăn chặn của các hiệu ứng không cụ thể, và sự tích tụ của phân tử được phân phối trong mô mục tiêu. Các hiệu ứng không cụ thể của ARNi có thể được tối thiểu hóa bởi việc sử dụng cục bộ, ví dụ, bởi việc tiêm hoặc cấy ghép trực tiếp vào trong mô hoặc sử dụng chế phẩm một cách cục bộ. Việc sử dụng cục bộ lên vị trí điều trị tối đa hóa nồng độ khu vực của tác nhân, hạn chế tiếp xúc của tác nhân đến các mô toàn thân mà có thể bị hại bởi tác nhân hoặc tác nhân có thể làm suy thoái, và cho phép tổng số liều của phân tử ARNi thấp hơn để sử dụng. Một vài nghiên cứu đã thể hiện sự được thể hiện giá thấp thành công sản phẩm gen khi của gen các sản phẩm khi ARNi được sử dụng một cách cục bộ. Ví dụ, việc phân phối trong mắt của VEGF dsARN bằng cách tiêm trong thủy tinh thể ở khỉ cynomolgus (Tolentino, MJ., *và cộng sự* (2004) *Retina* 24:132-138) và tiêm dưới võng mạc ở chuột (Reich, SJ., *và cộng sự* (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) đều được thể hiện là làm ngăn ngừa sự tạo mạch mới ở mẫu thí nghiệm bị thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi tác. Ngoài ra, sự tiêm trong khối u trực tiếp của dsARN ở chuột làm giảm thể tích khối u (Pille, J., *và cộng sự* (2005) *Mol. Ther.*11:267-274) và có thể kéo dài sự sống của con chuột mang khối u (Kim, WJ., *và cộng sự* (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S., *và cộng sự* (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). Sự cản trở ARN cũng được thể hiện là thành công với sự phân phối cục bộ vào CNS bằng cách tiêm trực tiếp (Dorn, G., *và cộng sự.* (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., *và cộng sự* (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., *và cộng sự* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., *và cộng sự* (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker,

ER., *và cộng sự* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya,Y., *và cộng sự* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) và vào phổi bằng cách dùng trong mũi (Howard, KA., *và cộng sự* (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X., *và cộng sự* (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V., *và cộng sự* (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). Để sử dụng ARNi toàn thân để điều trị bệnh, ARN có thể được cải biến hoặc ngoài ra được phân phối sử dụng hệ thống phân phối thuốc; cả hai phương pháp hoạt tính nhằm ngăn chặn sự thoái biến nhanh chóng của dsARN bởi enđo- và exo-nucleaza *trong cơ thể*. Cải biến của ARN hoặc chất mang dược còn có thể cho phép nhắm đến chế phẩm ARNi mô mục tiêu và tránh các hiệu ứng ngoài mục tiêu không mong muốn. Các phân tử ARNi có thể được cải biến bằng cách liên hợp hóa chất với các nhóm ưa lipit như cholesteol để làm tăng sự hấp thu và ngăn chặn sự thoái biến tế bào. Ví dụ, iARN được định hướng chống lại ApoB được liên hợp với gốc cholesterol ưa lipit được tiêm toàn thân vào con chuột và dẫn đến sự bất hoạt của mARN apoB ở cả gan và hỗng tràng (Soutschek, J., *và cộng sự* (2004) *Nature* 432:173-178). Sự liên hợp của iARN với aptame đã được thể hiện là làm ức chế sự phát triển khối u và làm trung gian cho sự thoái biến khối u ở mẫu chuột bị ung thư tuyến tiền liệt (McNamara, JO., *và cộng sự* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). Trong phương án thay thế, ARNi có thể được phân phối sử dụng các hệ thống phân phối thuốc như hệ thống phân phối hạt nano, đenđrime, polyme, liposom, hoặc cation. Các hệ thống phân phối cation tích điện dương tạo điều kiện liên kết của một phân tử ARNi (điện tích âm) và cũng tăng sự tương tác tại màng tế bào điện tích âm để cho phép sự hấp thu hiệu quả của ARNi bởi tế bào. Lipit cation, đenđrime, hoặc polyme có thể được liên kết với iARN, hoặc làm tạo thành túi hoặc vi hạt (xem ví dụ, Kim SH., *và cộng sự* (2008) J*ournal of Controlled Release* 129(2):107-116) mà bọc lấy iARN. Việc tạo thành của bọc hoặc mixen còn ngăn chặn sự thoái biến của ARNi khi được sử dụng toàn thân. Phương pháp sản xuất và dùng phức hợp cation- iARN thuộc khả năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực (xem ví dụ, Sorensen, DR., *và cộng sự* (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN., *và cộng sự* (2003) Clin. *Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS *và cộng sự* (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn một cách toàn bộ). Một số ví dụ không làm giới hạn sáng chế về hệ phân phối thuốc hữu dụng để phân phối toàn thân của iARN bao gồm DOTAP (Sorensen, DR., *và cộng sự* (2003), supra; Verma, UN., *và cộng sự* (2003), *supra*), Oligofectamine, "hạt axit nucleic lipit rắn" (Zimmermann, TS., *và cộng sự* (2006) *Nature*

441:111-114), cardiolipin (Chien, PY., *và cộng sự* (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A., *và cộng sự* (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), polyetylenimin (Bonnet ME., *và cộng sự* (2008) *Pharm. Res.* công bố điện tử ngày 16 tháng 8 trước khi in; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), peptit Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487), và polyamiđoamin (Tomalia, DA., *và cộng sự* (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., *và cộng sự* (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). Theo một số phương án, ARNi tạo thành cấu trúc kép với xyclođextrin để sử dụng toàn thân. Phương pháp để sử dụng và dược phẩm của các ARNi và xyclođextrin có thể tìm thấy trong Sáng chế Mỹ Số. 7,427,605, mà được kết hợp ở đây chỉ để tham khảo.

Vật truyền mã hóa cho iARN theo sáng chế

iARN hướng đích gen HAO1 có thể được biểu hiện từ đơn vị phiên mã được cài xen vào vật truyền ADN hoặc ARN (xem ví dụ, Couture, A, *và cộng sự.*, *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., *và cộng sự.*, Công bố đơn quốc tế PCT số WO 00/22113, Conrad Công bố đơn quốc tế PCT số WO 00/22114, và Conrad, Sáng chế Mỹ số. 6,054,299). Sự biểu hiện có thể là nhanh chóng (trong vòng hàng giờ đến tuần) hoặc kéo dài (hàng tuần đến hàng tháng hoặc lâu hơn), phụ thuộc vào cấu trúc cụ thể được sử dụng và mô hoặc loại tế bào mục tiêu. Các thông tin di truyền có thể được đưa vào như cấu trúc mạch thẳng, plasmit mạch vòng, hoặc vật truyền virut, mà có thể là vật truyền tích hợp hoặc không tích hợp. Gen chuyển có thể còn được tạo cấu trúc để cho phép nó được di truyền dưới dạng plasmit ngoài nhiễm sắc thể (Gassmann, *và cộng sự.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Sợi đơn hoặc các sợi của ARNi có thể được sao mã từ chất tăng xúc tác trên vật truyền biểu hiện. Khi hai riêng biệt sợi được thể hiện để tạo ra, ví dụ, dsARN, hai vật truyền biểu hiện riêng biệt có thể cùng được đưa vào (*ví dụ*, bằng cách biến nạp hoặc chuyển nạp) vào trong tế bào đích. Ngoài ra mỗi sợi đơn của dsARN có thể được sao mã bởi các chất tăng xúc tác cả hai đều nằm trên cùng plasmit biểu hiện. Theo một phương án, dsARN được thể hiện như polynucleotit lặp lại được đảo ngược được nối bởi liên kết trình tự polynucleotit mà dsARN có cấu trúc cành và vòng.

Vật truyền biểu hiện ARNi thường là plasmit ADN hoặc vật truyền virut. vật truyền biểu hiện thích hợp với các tế bào nhân chuẩn, tốt hơn là các chất thích hợp với các tế bào thuộc xương sống, có thể được sử dụng để tạo ra các cấu trúc tái tổ hợp cho sự biểu hiện của

ARNi như được mô tả ở đây. Vật truyền biểu hiện tế bào nhân chuẩn được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực và sẵn có từ nhiều nguồn trên thị trường. Thông thường, vật truyền này được cung cấp chứa các vị trí giới hạn thuận tiện để bổ sung phân khúc axit nucleic mong muốn. Việc phân phối vật truyền biểu hiện ARNi có thể là toàn thân, như bởi việc sử dụng qua tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm bắp, bằng việc sử dụng đối với các tế bào mục tiêu từng lấy từ bệnh nhân sau đó lại đưa vào trong bệnh nhân, hoặc bởi bất kỳ phương pháp khác mà cho phép đưa vào trong tế bào đích mong muốn.

Plasmit biểu hiện ARNi có thể đưa tế bào vào trong tế bào đích như cấu trúc kép với chất mang cation lipit (*ví dụ,* Oligofectamin) hoặc các chất mang không-cation gốc lipit (*ví dụ,* Transit-TKO^{TM}). Việc biến nạp đa lipit cho đột biến do ARNi nhắm đến các vùng khác nhau của ARN đích trong khoảng thời gian một tuần hoặc nhiều hơn cũng thuộc phạm vi sáng chế. Sự đưa thành công vật truyền vào trong tế bào chủ có thể được theo dõi bằng cách sử dụng nhiều phương pháp đã biết. Ví dụ, nhanh chóng được biến nạp có thể là truyền tín hiệu với chất thông báo, như chất đánh dấu huỳnh quang, như Green Fluorescent Protein (GFP). Sự ổn định khi được biến nạp của tế bào *ngoài cơ thể sống* có thể được đảm bảo bằng cách sử dụng chất đánh dấu mà cung cấp tế bào được được biến nạp với sự kháng các yếu tố từ môi trường cụ thể (*ví dụ*, kháng sinh và thuốc), như kháng hygromyxin B.

Các hệ thống vật truyền giống virut mà có thể được sử dụng với các phương pháp và chế phẩm được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, (a) vật truyền ađenovirut; (b) vật truyền retrovirut, bao gồm nhưng không giới hạn ở vật truyền lentivirut, virut bệnh bạch cầu ở chuột moloney, *v.v.*; (c) vật truyền được kết hợp adeno virut; (d) vật truyền virut bệnh gộp da; (e) vật truyền SV 40; (f) vật truyền virut polyoma; (g) vật truyền virut papilloma; (h) vật truyền virut u nhú; (i) vật truyền virut bệnh đậu mùa như orthopox, *ví dụ*, vật truyền virut bệnh đậu mùa hoặc avipox, *ví dụ* virut bệnh gia cầm hoặc virut bệnh từ gà; và (j) ađenovirut yếu hoặc phụ thuộc virut trợ giúp. Các virut sao chép bị lỗi còn có thể là lợi thế. Các vật truyền khác nhau sẽ hoặc sẽ không trở thành hợp nhất vào trong các tế bào gen. Các cấu trúc có thể bao gồm các trình tự virut để được biến nạp, nêu được mong muốn. Ngoài ra, cấu trúc có thể được hợp nhất vào trong vật truyền có khả năng của episome sao chép, *ví dụ* vật truyền EPV và EBV. Các cấu trúc để tái tổ hợp sự biểu hiện của ARNi sẽ thông thường yêu cầu các yếu tố điều chỉnh, *ví dụ*, các chất tăng xúc tác, các chất tăng cường, *v.v*,

để đảm bảo sự biểu hiện của ARNi trong các tế bào mục tiêu. Các khía cạnh khác để xem xét cho vật truyền và các cấu trúc được mô tả thêm dưới đây.

Vật truyền hữu dụng để phân phối ARNi sẽ bao gồm các yếu tố điều chỉnh (chất tăng xúc tác, các chất tăng cường, *v.v.*) đủ cho sự biểu hiện của ARNi trong tế bào hoặc mô đích mong muốn. Các yếu tố điều chỉnh có thể được chọn để cung cấp hoặc là sự biểu hiện cấu trúc hoặc được điều chỉnh/quy nạp.

Sự biểu hiện của iARN có thể được điều hòa chính xác, ví dụ, bằng cách sử dụng trình tự điều hòa cảm ứng mà dễ bị ảnh hưởng đối với các chất điều hòa sinh lý nhất định, *ví dụ*, hàm lượng glucoza tuần hoàn, hoặc hormon (Docherty *và cộng sự.*, 1994, *FASEB J.* 8:20-24). Các hệ thống biểu hiện cảm ứng như vậy, thích hợp để điều khiển sự biểu hiện dsARN trong tế bào hoặc ở động vật có vú bao gồm, ví dụ, quy định bởi ecdyson, bởi estrogen, progesteon, tetraxyclin, thuốc gây cảm ứng hóa học của sự nhị trùng hóa, và isopropyl-beta-D1 -thiogalactopyranosit (IPTG). Người có trình độ trong lĩnh vực sẽ có thể chọn trình tự điều chỉnh/chất tăng xúc tác thích hợp dựa trên ý định sử dụng của ARNi trao đổi thông tin di truyền.

Vật truyền thuộc virut mà chứa các trình tự axit nucleic mã hóa ARNi có thể được sử dụng. Ví dụ, vật truyền retrovirut có thể được dùng (xem Miller *và cộng sự.*, *Meth. Enzymol.* 217:581-599 (1993)). Các vật truyền retrovirut chứa các thành phần cần thiết để đóng gói chính xác gen virut và tích hợp vào trong ADN tế bào chủ. Các trình tự axit nucleic mã hóa ARNi được nhân bản trong một hoặc nhiều vật truyền, mà tạo điều kiện phân phối axit nucleic vào trong bệnh nhân. Chi tiết hơn về vật truyền retrovirut có thể được tìm thấy, ví dụ, trong tài liệu Boesen *và cộng sự.*, *Biotherapy* 6:291-302 (1994), mà mô tả việc sử dụng vật truyền retrovirut để phân phối gen mdr1 cho tế bào gốc tạo máu để làm cho tế bào gốc này kháng hơn đối với hóa trị liệu. Các tài liệu tham khảo khác mô tả việc sử dụng vật truyền retrovirut trong liệu pháp gen là: Clowes *và cộng sự.*, *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994); Kiem *và cộng sự.*, *Blood* 83:1467-1473 (1994); Salmons và Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); và Grossman và Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993). Vật truyền lentivirut được dự tính để sử dụng bao gồm, ví dụ, vật truyền gốc HIV được mô tả trong Sáng chế Mỹ số 6,143,520; 5,665,557; và 5,981,276, mà được kết hợp ở đây để tham khảo.

Các ađenovirut cũng được dự tính để dùng trong việc phân phối các ARNi theo sáng chế. Các ađenovirut là các chất truyền đặc biệt thu hút, *ví dụ*, để phân phối các gen đến biểu mô đường hô hấp. Các ađenovirut xâm nhập vào biểu mô đường hô hấp một cách tự nhiên khi chúng gây ra bệnh nhẹ. Các mục tiêu khác cho các hệ thống phân phối gốc ađenovirut là gan, hệ thống thần kinh trung ương, các tế bào thuộc màng trong, và cơ bắp. Các ađenovirut có lợi thế là có khả năng lây nhiễm các tế bào không chia. Kozarsky và Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) thể hiện tóm tắt về liệu pháp gen trên cơ sở ađenovirut. Bout *và cộng sự.*, *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) chứng minh việc sử dụng vật truyền ađenovirut để chuyển gen vvào biểu mô hô hấp của khỉ rhesus. Các trường hợp khác của việc sử dụng ađenovirut trong liệu pháp gen có thể được tìm thấy trong Rosenfeld *và cộng sự.*, *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld *và cộng sự.*, *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli *và cộng sự.*, *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); Công bố PCT WO94/12649; và Wang, *và cộng sự.*, *Gene Therapy* 2:775-783 (1995). Vật truyền AV thích hợp để biểu hiện iARN được đưa ra trong sáng chế, phương pháp tạo cấu trúc vật truyền AV tái tổ hợp, và phương pháp phân phối vật truyền vào tế bào đích, được mô tả trong Xia H *và cộng sự.* (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010.

Vật truyền virut kết hợp ađeno (AAV) cũng có thể được dùng để phân phối iARN theo sáng chế (Walsh *và cộng sự.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); Sáng chế Mỹ số. 5,436,146). Theo một phương án, ARNi có thể được biểu hiện như hai phần riêng biệt, bổ sung các phân tử ARN sợi đơn từ vật truyền AAV tái tổ hợp có, ví dụ, hoặc các chất tăng xúc tác ARN U6 hoặc H1, hoặc chất tăng xúc tác cytomegalovirut (CMV). Vật truyền AAV thích hợp để biểu hiện dsARN được nêu trong sáng chế, phương pháp tạo cấu trúc vật truyền AV tái tổ hợp, và phương pháp phân phối vật truyền vào tế bào đích được mô tả trong Samulski R *và cộng sự.* (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher K J *và cộng sự.* (1996), *J. Virol*, 70: 520-532; Samulski R *và cộng sự.* (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; Sáng chế Mỹ số. 5,252,479; Sáng chế Mỹ số. 5,139,941; Đơn Sáng Chế Quốc Tế Số WO 94/13788; và Đơn Sáng Chế Quốc Tế Số WO 93/24641, toàn bộ phần bộc lộ của chúng được kết hợp ở đây để tham khảo.

Vật truyền virut khác thích hợp để phân phối iARN theo sáng chế là virut mụn đậu mùa chẳng hạn như virut bệnh đậu mùa, ví dụ bệnh đậu mùa giảm độc lực chẳng hạn như

Virut Ankara được cải biến (MVA) hoặc NYVAC, avipox chẳng hạn như đậu mùa gà hoặc đậu mùa chim hoàng yến.

Ái tính của vật truyền thuộc virut có thể được cải biến bởi làm giả vật truyền với protein bao bọc hoặc đối giống bề mặt khác từ các virut khác, hoặc bởi việc thay thế protein capsit virut khác, thích hợp. Ví dụ, vật truyền lentivirut có thể là làm giả với các protein bề mặt từ virut mụn nước ở miệng (VSV), bệnh dại, Ebola, Mokola, và tương tự. Vật truyền AAV có thể được làm cho hướng đích vào các tế bào khác nhau bằng cách thiết kế vật truyền để biểu hiện các typ huyết thanh protein capsit khác nhau; xem ví dụ, Rabinowitz J E *và cộng sự*. (2002), *J Virol* 76:791-801, toàn bộ phần bộc lộ của chúng được kết hợp ở đây để tham khảo.

Dược phẩm của vật truyền có thể bao gồm vật truyền trong chất pha loãng chấp nhận được, hoặc có thể bao gồm chất nền phát tán chậm trong đó tá dược phân phối gen được nhúng. Ngoài ra, khi vật truyền phân phối gen hoàn toàn có thể được tạo ra nguyên vẹn từ các tế bào tái tổ hợp, *ví dụ*, vật truyền retrovirut, dược phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều tế bào mà tạo ra hệ thống phân phối gen.

IV. Dược phẩm theo sáng chế

Sáng chế còn bao gồm dược phẩm và chế phẩm chứa các ARNi theo sáng chế. Theo một phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa ARNi, như được mô tả ở đây, và chất mang dược dụng. Dược phẩm chứa iARN hữu dụng để điều trị bệnh kết hợp HAO1 hoặc rối loạn. Các dược phẩm nói trên được điều chế dựa trên chế độ phân phối.

Dược phẩm chứa tác nhân ARNi theo sáng chế có thể là, ví dụ, dung dịch có hoặc không có dung dịch đệm, hoặc chế phẩm chứa chất mang dược dụng. Dược phẩm này bao gồm, ví dụ, dược phẩm nước hoặc kết tinh, chế phẩm liposom, chế phẩm mixen, nhũ tương, và vật truyền liệu pháp gen.

Trong các phương pháp theo sáng chế, tác nhân ARNi có thể được dùng trong dung dịch. Tác nhân ARNi tự do có thể được dùng trong dung dịch không được đệm, ví dụ, trong nước muối hoặc trong nước. Theo cách khác, siARN tự do cũng có thể được dùng trong dung dịch đệm thích hợp. Dung dịch đệm có thể bao gồm axetat, xitrat, prolamin, cacbonat, hoặc phosphat, hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Theo một phương án, dung dịch đệm là

nước muối đệm phosphat (PBS). Độ pH và nồng độ mol của dung dịch đệm chứa tác nhân ARNi có thể được điều chỉnh sao cho nó thích hợp để dùng cho đối tượng.

Theo một số phương án, dung dịch đệm còn chứa tác nhân để kiểm soát nồng độ mol của dung dịch, sao cho nồng độ mol được giữ ở trị số mong muốn, *ví dụ*, ở trị số sinh lý của huyết tương người. Các chất hòa tan có thể được bổ sung vào dung dịch đệm để kiểm soát nồng độ mol bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein, peptit, axit amin, các polyme không chuyển hóa, vitamin, ion, đường, các chất chuyển hóa, axit hữu cơ, lipit, hoặc muối. Theo một số phương án, tác nhân để kiểm soát nồng độ mol của dung dịch là muối. Theo một số phương án, tác nhân để kiểm soát nồng độ mol của dung dịch là natri clorua hoặc kali clorua.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng ở liều lượng đủ để ức chế sự biểu hiện của gen HAO1.

Liều lượng

Nhìn chung, liều lượng thích hợp của iARN theo sáng chế sẽ nằm trong khoảng từ khoảng 0,001 đến khoảng 200,0 miligam trong mỗi kilogam khối lượng cơ thể của thể nhận trong mỗi ngày, nhìn chung là nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 đến 10 hoặc từ 1 đến 50 mg trong mỗi kilogam khối lượng cơ thể trong mỗi ngày. Ví dụ, dsARN có thể được dùng ở liều lượng khoảng 0,01 mg/kg, khoảng 0,05 mg/kg, khoảng 0,5 mg/kg, khoảng 1 mg/kg, khoảng 1,5 mg/kg, khoảng 2 mg/kg, khoảng 3 mg/kg, khoảng 4 mg/kg, khoảng 5 mg/kg, khoảng 6 mg/kg, khoảng 7 mg/kg, khoảng 8 mg/kg, khoảng 9 mg/kg khoảng 10 mg/kg, khoảng 20 mg/kg, khoảng 30 mg/kg, khoảng 40 mg/kg, hoặc khoảng 50 mg/kg trong mỗi liều đơn.

Theo phương án khác, tác nhân ARNi, *ví dụ*, dsARN, được dùng ở liều lượng bằng từ khoảng 0,1 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 0,25 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 0,5 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 0,75 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 1 đến khoảng 50 mg/mg, từ khoảng 1,5 đến khoảng 50 mg/kb, từ khoảng 2 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 2,5 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 3 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 3,5 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 4 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 4,5 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 5 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 7,5 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 10 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 15 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 20 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng

20 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 25 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 25 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 30 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 35 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 40 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 45 đến khoảng 50 mg/kg, từ khoảng 0,1 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 0,25 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 0,5 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 0,75 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 1 đến khoảng 45 mg/mg, từ khoảng 1,5 đến khoảng 45 mg/kb, từ khoảng 2 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 2,5 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 3 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 3,5 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 4 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 4,5 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 5 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 7,5 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 10 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 15 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 20 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 20 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 25 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 25 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 30 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 35 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 40 đến khoảng 45 mg/kg, từ khoảng 0,1 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 0,25 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 0,5 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 0,75 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 1 đến khoảng 40 mg/mg, từ khoảng 1,5 đến khoảng 40 mg/kb, từ khoảng 2 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 2,5 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 3 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 3,5 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 4 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 4,5 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 5 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 7,5 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 10 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 15 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 20 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 20 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 25 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 25 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 30 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 35 đến khoảng 40 mg/kg, từ khoảng 0,1 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 0,25 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 0,5 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 0,75 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 1 đến khoảng 30 mg/mg, từ khoảng 1,5 đến khoảng 30 mg/kb, từ khoảng 2 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 2,5 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 3 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 3,5 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 4 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 4,5 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 5 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 7,5 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 10 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 15 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 20 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 20 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 25 đến khoảng 30 mg/kg, từ khoảng 0,1 đến khoảng 20 mg/kg, từ khoảng 0,25 đến khoảng 20 mg/kg, từ khoảng 0,5 đến khoảng 20 mg/kg, từ khoảng 0,75 đến khoảng 20 mg/kg, từ khoảng 1 đến khoảng 20 mg/mg, từ khoảng 1,5 đến khoảng 20

mg/kb, từ khoảng 2 đến khoảng 20 mg/kg, từ khoảng 2,5 đến khoảng 20 mg/kg, từ khoảng 3 đến khoảng 20 mg/kg, từ khoảng 3,5 đến khoảng 20 mg/kg, từ khoảng 4 đến khoảng 20 mg/kg, từ khoảng 4,5 đến khoảng 20 mg/kg, từ khoảng 5 đến khoảng 20 mg/kg, từ khoảng 7,5 đến khoảng 20 mg/kg, từ khoảng 10 đến khoảng 20 mg/kg, hoặc từ khoảng 15 đến khoảng 20 mg/kg. Các giá trị và khoảng làm trung gian cho các giá trị được nêu ra cũng là một phần của sáng chế.

Ví dụ, tác nhân ARNi, *ví dụ*, dsARN, có thể được dùng ở liều lượng bằng khoảng 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, hoặc khoảng 50 mg/kg. Các giá trị và khoảng làm trung gian cho các giá trị được nêu ra cũng là một phần của sáng chế.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, ví dụ, khi tác nhân ARNi mạch kép bao gồm cải biến (*ví dụ,* một hoặc nhiều môtip của ba cải biến giống nhau trên ba nucleotit liên tiếp, bao gồm một môtip ở hoặc ở gần vị trí phân cắt của tác nhân này), sáu phosphorothioat liên kết, và phối tử, tác nhân này được dùng ở liều lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,01 đến khoảng 0,5 mg/kg, từ khoảng 0,01 đến khoảng 0,4 mg/kg, từ khoảng 0,01 đến khoảng 0,3 mg/kg, từ khoảng 0,01 đến khoảng 0,2 mg/kg, từ khoảng 0,01 đến khoảng 0,1 mg/kg, từ khoảng 0,01 mg/kg đến khoảng 0,09 mg/kg, từ khoảng 0,01 mg/kg đến khoảng 0,08 mg/kg, từ khoảng 0,01 mg/kg đến khoảng 0,07 mg/kg, từ khoảng 0,01 mg/kg đến khoảng 0,06 mg/kg, từ khoảng 0,01 mg/kg đến khoảng 0,05 mg/kg, từ khoảng 0,02 đến khoảng 0,5 mg/kg, từ khoảng 0,02 đến khoảng 0,4 mg/kg, từ khoảng 0,02 đến khoảng 0,3 mg/kg, từ khoảng 0,02 đến khoảng 0,2 mg/kg, từ khoảng 0,02 đến khoảng 0,1 mg/kg, từ khoảng 0,02 mg/kg đến khoảng 0,09 mg/kg, từ khoảng 0,02 mg/kg đến khoảng 0,08 mg/kg, từ khoảng 0,02 mg/kg đến khoảng 0,07 mg/kg, từ khoảng 0,02 mg/kg đến khoảng 0,06 mg/kg, từ

khoảng 0,02 mg/kg đến khoảng 0,05 mg/kg, từ khoảng 0,03 đến khoảng 0,5 mg/kg, từ khoảng 0,03 đến khoảng 0,4 mg/kg, từ khoảng 0,03 đến khoảng 0,3 mg/kg, từ khoảng 0,03 đến khoảng 0,2 mg/kg, từ khoảng 0,03 đến khoảng 0,1 mg/kg, từ khoảng 0,03 mg/kg đến khoảng 0,09 mg/kg, từ khoảng 0,03 mg/kg đến khoảng 0,08 mg/kg, từ khoảng 0,03 mg/kg đến khoảng 0,07 mg/kg, từ khoảng 0,03 mg/kg đến khoảng 0,06 mg/kg, từ khoảng 0,03 mg/kg đến khoảng 0,05 mg/kg, từ khoảng 0,04 đến khoảng 0,5 mg/kg, từ khoảng 0,04 đến khoảng 0,4 mg/kg, từ khoảng 0,04 đến khoảng 0,3 mg/kg, từ khoảng 0,04 đến khoảng 0,2 mg/kg, từ khoảng 0,04 đến khoảng 0,1 mg/kg, từ khoảng 0,04 mg/kg đến khoảng 0,09 mg/kg, từ khoảng 0,04 mg/kg đến khoảng 0,08 mg/kg, từ khoảng 0,04 mg/kg đến khoảng 0,07 mg/kg, từ khoảng 0,04 mg/kg đến khoảng 0,06 mg/kg, từ khoảng 0,05 đến khoảng 0,5 mg/kg, từ khoảng 0,05 đến khoảng 0,4 mg/kg, từ khoảng 0,05 đến khoảng 0,3 mg/kg, từ khoảng 0,05 đến khoảng 0,2 mg/kg, từ khoảng 0,05 đến khoảng 0,1 mg/kg, từ khoảng 0,05 mg/kg đến khoảng 0,09 mg/kg, từ khoảng 0,05 mg/kg đến khoảng 0,08 mg/kg, hoặc từ khoảng 0,05 mg/kg đến khoảng 0,07 mg/kg. Các giá trị và khoảng trị số giữa các giá trị được nói đến trên đây cũng được hiểu là một phần của sáng chế, *ví dụ,*, tác nhân ARNi có thể được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,015 mg/kg đến khoảng 0,45 mg/mg.

Ví dụ, tác nhân ARNi, *ví dụ*, tác nhân ARNi trong dược phẩm, có thể được dùng ở liều lượng bằng khoảng 0,01 mg/kg, 0,0125 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,0175 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,0225 mg/kg, 0,025 mg/kg, 0,0275 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,0325 mg/kg, 0,035 mg/kg, 0,0375 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,0425 mg/kg, 0,045 mg/kg, 0,0475 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,0525 mg/kg, 0,055 mg/kg, 0,0575 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,0625 mg/kg, 0,065 mg/kg, 0,0675 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,0725 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,0775 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,0825 mg/kg, 0,085 mg/kg, 0,0875 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,0925 mg/kg, 0,095 mg/kg, 0,0975 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,125 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,175 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,225 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,275 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,325 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,375 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,425 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,475 mg/kg, hoặc khoảng 0,5 mg/kg. Khoảng ở giữa các trị số được đề cập trên đây cũng được dự tính là một phần của sáng chế.

Chế độ điều trị

Dược phẩm có thể được dùng một lần hàng ngày, hoặc ARNi có thể được được dùng như là hai, ba, hoặc nhiều liều phụ trong khoảng thời gian thích hợp trong suốt cả ngày hoặc thậm chí sử dụng truyền liên tục hoặc truyền thông qua một chế phẩm giải phóng có kiểm soát. Trong trường hợp đó, ARNi có chứa trong mỗi liều phụ phải nhỏ hơn tương đối để có thể đạt được liều lượng hàng ngày. Đơn vị liều dùng còn có thể được hợp nhất để phân phối qua một vài ngày, *ví dụ*, sử dụng chế phẩm giải phóng ổn định thông thường mà cung cấp sự giải phóng ổn định của ARNi trong khoảng thời gian vài ngày. Chế phẩm phát tán ổn định được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực và đặc biệt hữu dụng để phân phối các tác nhân tại khu vực cụ thể, như có thể sử dụng với các tác nhân theo sáng chế. Trong phương án này, đơn vị liều dùng chứa nhiều liều hàng ngày tương ứng.

Theo các phương án khác, liều đơn của các dược phẩm có thể là tồn tại lâu, như vậy các liều sau đó được sử dụng không nhiều hơn ở khoảng cách 3, 4, hoặc 5 ngày, hoặc không nhiều hơn ở khoảng cách 1, 2, 3, hoặc 4 tuần. Theo một số phương án của sáng chế, liều đơn của các dược phẩm theo sáng chế được dùng một lần một tuần. Theo các phương án khác theo sáng chế, liều đơn của các dược phẩm theo sáng chế được cho dùng mỗi hai tháng.

Người có trình độ cao sẽ đánh giá các yếu tố nhất định có thể ảnh hưởng đến liều dùng và thời gian yêu cầu để điều trị cho đối tượng một cách hiệu quả, bao gồm nhưng không giới hạn ở một vài bệnh hoặc rối loạn, các điều trị trước, sức khỏe chung và/hoặc tuổi của đối tượng, và các bệnh khác có mặt. Hơn nữa, việc điều trị của đối tượng với lượng điều trị hiệu quả của chế phẩm có thể bao gồm việc điều trị đơn hoặc một loạt các chuỗi điều trị. Ước tính liều lượng hữu hiệu và thời gian bán hủy *in vivo* đối với iARN cụ thể được bao hàm bởi sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp luận thông thường.

Ước tính liều lượng hữu hiệu và thời gian bán hủy *in vivo* đối với iARN cụ thể được bao hàm bởi sáng chế cũng có thể được tạo ra trên cơ sở thử nghiệm *in vivo* bằng cách sử dụng mẫu động vật thích hợp. Ví dụ, các thành tựu trong di truyền chuột đã được tạo ra ở một số lượng các mẫu chuột để nghiên cứu các bệnh ở người khác nhau, chẳng hạn như rối loạn có kết hợp với sự biểu hiện của HAO1. Các mẫu như vậy có thể được sử dụng để thử nghiệm *trong cơ thể* của ARNi, cũng như để xác định liều điều trị hiệu quả. Các mẫu chuột

thích hợp đã biết trong lĩnh vực và bao gồm, ví dụ, các mẫu động vật được mô tả trong bản mô tả này.

Phương pháp sử dụng

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng theo nhiều cách tùy thuộc vào việc điều trị cục bộ hay toàn thân được mong muốn và tùy theo khu vực được điều trị. Việc sử dụng có thể là tại chỗ (*ví dụ*, bởi miếng dán), qua phổi, *ví dụ*, bằng cách hít vào hoặc bơm vào của bột hoặc bình xịt, bao gồm phun sương; trong khí quản, mũi, biểu bì và thẩm thấu qua da, qua đường uống hoặc tiêm. Việc dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm tiêm hoặc truyền trong tĩnh mạch, trong động mạch, dưới da, trong màng bụng hoặc trong cơ; dưới bì, *ví dụ*, *qua* dụng cụ cấy; hoặc trong hộp sọ, *ví dụ*, bằng cách dùng trong mô tuyến tụy, nội tủy mạc hoặc trong tâm thất.

iARN có thể được phân phối theo cách hướng đích vào mô cụ thể, chẳng hạn như gan.

Chế phẩm

Các dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các dung dịch, các nhũ tương, và liposom chứa chế phẩm. Các chế phẩm có thể được tạo ra từ nhiều thành phần mà bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất lỏng hoạt tính, các chất rắn tự nhũ tương hóa và các chất bán rắn tự nhũ tương hóa.

Dược phẩm theo sáng chế, mà có thể thuận lợi là được cho vào trong dạng đơn vị liều dùng, có thể được điều chế bằng kỹ thuật thông thường được biết đến rộng rãi trong ngành công nghiệp dược. Các kỹ thuật như vậy bao gồm bước đưa vào trong hoạt tính kết hợp các nguyên liệu với chất mang dược hoặc tá dược. Nói chung, các chế phẩm được điều chế bởi một cách đồng nhất và sâu sắc vào trong hoạt tính kết hợp các nguyên liệu với lỏng chất mang hoặc chất mang rắn được chia mịn hoặc cả hai, và sau đó, nếu cần thiết, tạo hình cho sản phẩm.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được hình thành trong bất kỳ của nhiều khả năng liều dùng có thể tạo thành, nhưng không giới hạn ở, viên nén, viên nang, gel viên nang, si rô lỏng, gel mềm, viên đạn, và viên thụt. Chế phẩm theo sáng chế còn có thể được hình thành như các huyền phù môi trường có nước, không-có nước hoặc hỗn hợp. Các huyền phù có

nước có thể còn chứa các chất mà làm gia tăng độ nhớt của huyền phù bao gồm, ví dụ, natri carboxymetylxenluloza, sorbitol và/hoặc đextran. Huyền phù còn có thể chứa chất ổn định.

Hợp phần theo sáng chế có thể được tạo chế phẩm để dùng qua đường miệng; dùng ngoài đường tiêu hóa, trong nhu mô (vào não), nội tủy mạc, nội tâm thất hoặc trong gan, và/hoặc dùng tại chỗ.

Chế phẩm và công thức để sử dụng bằng đường miệng bao gồm các bột hoặc các hạt, vi hạt, các hạt nano, các huyền phù hoặc các dung dịch trong môi trường có nước hoặc không-có nước, viên nang, gel viên nang, bọc, viên nén hoặc viên nén nhỏ. Các chất làm đặc, các tác nhân tạo vị, các chất pha loãng, chất nhũ hóa, chất hỗ trợ phân phối hoặc cac chất liên kết có thể được mong muốn. Theo một số phương án, công thức uống mà trong đó các dsARN được đặc trưng theo sáng chế được sử dụng liên kết với một hoặc nhiều chất tăng sự thẩm thấu các chất hoạt tính bề mặt và các chất chelat. Các chất hoạt tính bề mặt thích hợp bao gồm axit béo và/hoặc este hoặc các muối của chúng, axit mật và/hoặc các muối của chúng. Axit/muối mật thích hợp bao gồm axit chenođeoxycholic (CDCA) và axit ursođeoxychenođeoxycholic (UDCA), axit cholic, axit đehyđrocholic, axit đeoxycholic, axit glucholic, axit glycholic, axit glycođeoxycholic, axit taurocholic, axit taurođeoxycholic, natri tauro-24,25-đihyđro-fusiđat và natri glycođihyđrofusiđat. Axit béo thích hợp bao gồm axit arachiđonic, axit unđecanoic, axit oleic, axit lauric, axit caprylic, axit capric, axit myristic, axit palmitic, axit stearic, axit linoleic, axit linolenic, đicaprat, tricaprat, monoolein, đilaurin, glyxeryl 1-monocaprat, 1-đođexylazaxycloheptan-2-on, axylcarnitin, axylcholin, hoặc monoglyxerit, điglyxerit hoặc muối dược dụng của chúng (*ví dụ,* natri). Theo một số phương án, các sự kết hợp của chất tăng cường sự thẩm thấu được sử dụng, ví dụ, axit béo/các muối kết hợp với các axit/muối mật. Một kết hợp mẫu mực là muối natri của axit lauric, axit capric và UDCA. Ngoài ra chất tăng cường sự thẩm thấu bao gồm polyoxyetylen-9-lauryl ete, polyoxyetylen-20-xetyl ete. Các dsARN được đặc trưng theo sáng chế có thể được phân phối qua miệng, trong hạt hình thành bao gồm các hạt khô được phun, hoặc được ghép phân tử để hình thành các hạt micro hoặc nano. Các tác nhân ghép phân tử DsARN bao gồm poly-axit amin; polyimin; polyacrylat; polyalkylacrylat, polyoxetan, polyalkylxyanoacrylat; gelatin hóa tích điện dương, anbumin, tinh bột, acrylat, polyetylenglycol (PEG) và tinh bột; polyalkylxyanoacrylat; polyimin chiết xuất DEAE,

pollulan, xenluloza và tinh bột. Các tác nhân ghép phân tử thích hợp bao gồm chitosan, N-trimetylchitosan, poly-L-lysin, polyhistiđin, polyornithin, polyxpecmin, protamin, polyvinylpyriđin, polythiođietylaminometyletylen P(TDAE), polyaminostyren (*ví dụ,* p-amino), poly(metylxyanoacrylat), poly(etylxyanoacrylat), poly(butylxyanoacrylat), poly(isobutylxyanoacrylat), poly(isohexylxynaoacrylat), DEAE-metacrylat, DEAE-hexylacrylat, DEAE-acrylamit, DEAE-anbumin và DEAE-đextran, polymetylacrylat, polyhexylacrylat, poly(D,L-axit lactic), poly(DL-axit lactic-co-glycolic (PLGA), alginat, và polyetylenglycol (PEG). Công thức dùng qua đường miệng cho các dsARN và chế phẩm của chúng như được mô tả chi tiết trong Sáng chế Mỹ 6,887,906, Công bố đơn Mỹ. Số. 20030027780, và Sáng chế Mỹ số. 6,747,014, lần lượt được kết hợp ở đây để tham khảo.

Chế phẩm và công thức tiêm, sử dụng trong sọ (vào trong não), nội tủy mạc, trong não thất hoặc trong gan có thể bao gồm dung dịch trong nước vô trùng mà còn có thể chứa các chất đệm, các chất pha loãng và các phụ gia thích hợp khác như, nhưng không giới hạn ở, chất tăng cường sự thẩm thấu, chất mang hợp chất và chất mang hoặc tá dược dược dụng khác.

Chế phẩm và công thức dược để sử dụng tại chỗ có thể bao gồm các miếng dán, thuốc mỡ, thuốc nước, kem, gel, thuốc nhỏ, thuốc đạn, thuốc xịt, chất lỏng và bột. Thông thường chất mang dược, có gốc nước, bột hoặc dầu, các chất làm đặc và tương tự có thể là cần thiết hoặc được mong muốn. Bao cao su được phủ, găng tay và vật tương tự cũng có thể hữu ích. Công thức dùng tại chỗ thích hợp bao gồm các chất trong đó các ARNi được đặc trưng theo sáng chế được trộn với các tác nhân phân phối tại chỗ như các lipit, liposom, axit béo, este của axit béo, steroit, các chất chelat hóa và các chất hoạt tính bề mặt. Các lipit và liposom thích hợp bao gồm chất trung tính (*ví dụ,* điioleoylphosphatiđyl DOPE etanolamin, đimyristoylphosphatiđyl cholin DMPC, đistearolyphosphatiđyl cholin) âm tính (*ví dụ,* đimyristoylphosphatiđyl glyxerol DMPG) và cation (*ví dụ,* điioleoyltetrametylaminopropyl DOTAP và điioleoylphosphatiđyl etanolamin DOTMA). Các ARNi được đưa ra theo sáng chế có thể được bọc trong liposom hoặc có thể hình thành các cấu trúc kép, cụ thể là liposom cation. Tùy ý, các ARNi có thể là cấu trúc kép đôi với các lipit, cụ thể là các cation lipit. Axit béo và este thích hợp bao gồm nhưng không giới hạn ở axit arachiđonic, axit oleic, axit eicosanoic, axit lauric, axit caprylic, axit capric, axit myristic, axit palmitic, axit

stearic, axit linoleic, axit linolenic, đicaprat, tricaprat, monoolein, đilaurin, glyxeryl 1-monocaprat, 1-đođexylazaxycloheptan-2-on, axylcarnitin, axylcholin, hoặc C_{1-20} alkyl este (*ví dụ,* isopropylmyristat IPM), monoglyxerit, điglyxerit hoặc muối dược dụng của chúng). Các chế phẩm để dùng tại chỗ như được mô tả chi tiết trong Sáng chế Mỹ số. 6,747,014, được kết hợp ở đây để tham khảo.

Chế phẩm iARN chứa Tổ hợp Phân tử Màng

ARNi để sử dụng trong các hợp chất và các phương pháp theo sáng chế có thể được cấu tạo để phân phối trong một nhóm phân tử màng, *ví dụ*, một liposom hoặc một mixen. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "liposom" đề cập đến một túi bao gồm các lipit lưỡng tính được sắp xếp trong ít nhất một lớp kép, *ví dụ*, một lớp kép hoặc nhiều lớp kép. Liposom bao gồm các túi đơn lớp và đa lớp mà có lớp màng hình thành từ nguyên liệu ưa lipit và nước bên trong. Phần nước có chứa hợp chất ARNi. Nguyên liệu ưa lipit phân tách dung dịch nước bên trong khỏi dung dịch nước bên ngoài, mà không bao gồm hợp chất ARNi, mặc dù trong một số ví dụ, nó có thể có. Liposom hữu dụng cho việc chuyển giao và phân phối các thành phần hoạt tính đến khu vực hoạt tính. Vì màng liposom có cấu trúc tương tự như màng sinh học, khi liposom được đưa vào một mô, lớp kép liposom hòa lẫn với lớp kép của màng tế bào. Là sự kết hợp của liposom và sự tiến triển của tế bào, dung dịch nước bên trong bao gồm ARNi được phân phối đến tế bào nơi mà ARNi có thể che ARN mục tiêu và hòa giải ARNi. Trong một số trường hợp, liposom cũng đ ược nhắm mục tiêu cụ thể, *ví dụ*, để hướng ARNi đến các loại tế bào đặc biệt.

Một liposom chứa một tác nhân ARNi có thể được chuẩn bị bằng nhiều phương pháp khác nhau. Ví dụ, thành phần lipit của liposom được hòa tan trong một chất tẩy rửa để mixen được hình thành với thành phần lipit. Ví dụ, thành phần lipit có thể là một lipit lưỡng tính cation hoặc lipit liên hợp. Chất tẩy rửa có thể chứa hàm lượng mixen cao và có thể là không ion hóa. Các mẫu chất tẩy rửa bao gồm cholat, CHAPS, octylglucosit, đeoxycholat, và lauroyl sarcosin. Chất điều chế ARNi sau đó được thêm vào mixen mà chúng bao gồm cả thành phần lipit. Các nhóm cation về lipit ảnh hưởng tương tác với tác nhân ARNi và cô đọng xung quanh ARNi để tạo ra liposom. Sau khi xem xét sự cô đặc, chất tẩy rửa được loại bỏ, *ví dụ*, bằng cách thẩm tách, để thu được chế phẩm liposom của tác nhân ARNi.

Nếu cần thiết một hợp chất mang hỗ trợ trong việc làm ngưng tụ có thể được bổ sung trong thời gian phản ứng ngưng tụ, *ví dụ*, bằng cách kiểm soát bổ sung. Ví dụ, các hợp chất mang có thể là một polyme khác axit nucleic (*ví dụ*, xpecmin hoặc xpecmiđin). Độ pH còn có thể được điều chỉnh để thích hợp nhất cho sự ngưng tụ.

Các phương pháp để sản xuất chất chuyển phân phối polynucleotit ổn định, mà kết hợp với một lipit kép polynucleotit/cation như thành phần cấu tạo của chất chuyển phân phối, được mô tả kĩ hơn trong, ví dụ, WO 96/37194, toàn bộ nội dung của ví dụ được kết hợp ở đây để tham khảo. Sự tạo thành liposom cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều khía cạnh của phương pháp ví dụ được mô tả trong Felgner, P. L. *và cộng sự., Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8:7413-7417, 1987; Sáng chế Mỹ số. 4,897,355; Sáng chế Mỹ số. 5,171,678; Bangham, *và cộng sự. M. Mol. Biol.* 23:238, 1965; Olson, *và cộng sự. Biochim. Biophys. Acta* 557:9, 1979; Szoka, *và cộng sự. Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4194, 1978; Mayhew, và cộng sự. *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984; Kim, *và cộng sự. Biochim. Biophys. Acta* 728:339, 1983; và Fukunaga, *và cộng sự. Endocrinol.* 115:757, 1984. Các kỹ thuật thường được sử dụng để điều chế khối kết tụ lipit có kích thước phù hợp để sử dụng làm tá dược phân phối bao gồm nghiền bằng siêu âm và kết đông-rã đông cộng với ép đùn (xem ví dụ, Mayer, *và cộng sự. Biochim. Biophys. Acta* 858:161, 1986). Vi hóa lỏng có thể được dùng khi mong muốn khối kết tụ nhỏ một cách thích hợp (từ 50 đến 200 nm) và tương đối đồng nhất (Mayhew, *và cộng sự. Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984). Các phương pháp này đều sẵn sàng thích ứng để tập hợp và đưa các tác nhân ARNi được tạo ra đến liposom.

Liposom rơi vào 2 nhóm rộng. Liposom cation được tích điện dương và tương tác với các phân tử axit nucleic tích điện âm để tạo ra một cấu trúc kép hợp ổn định. Phức hợp axit nucleic/liposom được tích điện dương chắn mặt phẳng tế bào tích điện âm và được tiếp thu trong một hạt cơ quan nội bào. Do độ pH axit trong hạt cơ quan nội bào, liposom bị phá vỡ, giải phóng các chất bên trong nó vào tế bào chất (Wang *và cộng sự., Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

Liposom mà độ nhạy pH hoặc được tích điện âm, chặn lại axit nucleic hơn là cấu trúc kép với nó. Do cả axit nucleic và lipit đều có điện tích giống nhau, giữa chúng xuất hiện lực đẩy chứ không xảy ra phức hợp. Tuy nhiên, một số axit nucleic bị kẹt bên trong dung dịch nước bên trong của các liposom này. Liposom nhạy cảm pH được sử dụng để phân phối axit

nucleic mã hóa cho các gen tymiđin kinaza đến tế bào đơn lớp trong nuôi cấy. Sự biểu hiện của gen ngoại sinh được phát hiện trong tế bào đích (Zhou *và cộng sự.*, *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

Một loại quan trọng trong thành phần liposom bao gồm phospholipit chứ không phải là phosphatiđylcholin được phân phối tự nhiên. Các chế phẩm liposom trung tính, ví dụ, có thể được tạo ra từ đimyristoyl phosphatiđylcholin (DMPC) hoặc đipalmitoyl phosphatiđylcholin (DPPC). Các hợp chất liposom thông thường đều được hình thành từ đimyristoyl phosphatiđylglyxerol, trong khi liposom anion gây dung hợp cơ bản được tạo ta từ đioleoyl phosphatiđyletanolamin (DOPE). Một loại hợp chất liposom khác được cấu tạo từ phosphatiđylcholin (PC) như, ví dụ, PC hạt đậu nành, và PC trứng. Một loại khác được tạo ra từ hỗn hợp giữa phospholipit và/hoặc phosphatiđylcholin và/hoặc cholesterol.

Các ví dụ về các phương pháp phác dểđưa liposom vào tế bào *in vitro* và *in vivo* bao gồm Sáng chế Mỹ số. 5,283,185; Sáng chế Mỹ số. 5,171,678; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Felgner, *J. Biol. Chem.* 269:2550, 1994; Nabel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:11307, 1993; Nabel, *Human Gene Ther.* 3:649, 1992; Gershon, *Biochem.* 32:7143, 1993; và Strauss *EMBO J.* 11:417, 1992.

Các hệ thống liposom không ion hóa cũng đã được kiểm tra để xác định tính hữu dụng trong việc phân phối của thuốc đến da, trong các hệ thống đặc biệt bao gồm chất có hoạt tính bề mặt không ion và cholesterol. Các chế phẩm liposom không ion bao gồm Novasome^{TM} I (glyxeryl đilaurat/cholesteol/polyoxyetylen-10-stearyl ete) và Novasome^{TM} II (glyxeryl đistearat/cholesteol/polyoxyetylen-10-stearyl ete) được sử dụng để phân phối xyclosporin-A đến chân bì của da chuột nhắt. Kết quả chỉ ra rằng hệ liposom không ion này hữu hiệu trong việc làm thuận tiện cho sự lắng đọng của xyclosporin A vào các lớp khác nhau của da (Hu *và cộng sự. S.T.P.Pharma. Sci.*, 1994, 4(6) 466).

Liposom cũng bao gồm liposom "ổn định hóa không gian", một thuật ngữ mà, như được sử dụng ở đây, đề cập đến liposom bao gồm một hoặc nhiều lipit chuyên biệt mà khi kếp hợp vào liposom sẽ giúp tăng cường thời gian tuần hoàn so với liposom thiếu lipit chuyên biệt. Các ví dụ về liposom ổn định hóa không gian là các chất trong đó phần của phần lipit tạo thành bọc của liposom (A) bao gồm một hoặc nhiều các glycolipit, như monosialogangliosit G_{M1}, hoặc (B) là phái sinh hóa với một hoặc nhiều polyme ưa nước,

như gốc polyetylen glycol (PEG). Mặc dù không mong muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết cụ thể bất kỳ, trong lĩnh vực này người ta cho rằng, ít nhất là đối với các liposom được làm ổn định về mặt không gian chứa gangliosit, sphingomyelin, hoặc lipit được tạo dẫn xuất bằng PEG, thời gian bán hủy tuần hoàn đã được tăng cường của các liposom này được làm ổn định về mặt không gian bắt nguồn từ sự hấp thụ vào tế bào giảm của hệ lưới nội mô (RES) (Allen *và cộng sự.*, *FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu *và cộng sự.*, *Cancer Research*, 1993, 53, 3765).

Các liposom khác nhau bao gồm một hoặc nhiều glycolipit được biết đến trong lĩnh vực. Papahadjopoulos *và cộng sự.* (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64) báo cáo khả năng của monosialogangliosit G_{M1}, galactoxerebrosit sulfat và phosphatiđylinositol để cải thiện thời gian bán hủy trong máu của liposom. Các phát hiện này được giải thích chi tiết bởi Gabizon *và cộng sự.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 6949). Sáng chế Mỹ số. 4,837,028 và WO 88/04924, cả hai của Allen *và cộng sự*, bộc lộ liposom chứa (1) sphingomyelin và (2) gangliosit G_{M1} hoặc este của galactoxerebrosit sulfat. Sáng chế Mỹ Số. 5,543,152 (Webb *và cộng sự.*) bộc lộ liposom bao gồm sphingomyelin. Liposom bao gồm 1,2-sn-đimyristoylphosphatiđylcholin được bộc lộ trong WO 97/13499 (Lim *và cộng sự*).

Theo một phương án, liposom cation được sử dụng. Liposom cation có lợi thế là có thể kết hợp với màng tế bào. Liposom không cation, mặc dù không thể kết hợp hiệu quả với các màng huyết tương, được đưa lên bởi các đại thực bào trong cơ thể và có thể được dùng để phân phối các tác nhân ARNi đến các đại thực bào.

Các lợi thế khác của liposom bao gồm: Các liposom thu được từ các phospholipit tự nhiên tương thích sinh học và có thể thoái biến sinh học; các liposom có thể kết hợp nhiều loại thuốc hòa tan trong nước và lipit; các liposom có thể bảo vệ tác nhân ARNi đã được kết nang trong các ngăn bên trong của chúng khỏi bị chuyển hóa và thoái hóa (Rosoff, trong "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Tập 1, trang 245). Điều quan trọng trong việc tạo chế phẩm liposom là mặt phẳng tích điện lipit, kích thước túi và thể tích nước của liposom.

Lipit cation tổng hợp tích điện dương, N-[1-(2,3-đioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimetylamoni clorua (DOTMA) có thể được dùng để tạo thành các liposom nhỏ mà tương

tác tự phát với axit nucleic để tạo thành phức hợp lipit-axit nucleic mà có khả năng dung hợp với lipit tích điện dương của màng tế bào của tế bào nuôi cấy mô, dẫn đến việc phân phối tác nhân ARNi (xem ví dụ, Felgner, P. L. và cộng sự., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 và Sáng chế Mỹ số. 4,897,355 mô tả về DOTMA và sử dụng nó với ADN).

Chất tương tự DOTMA, 1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimetylammonia)propan (DOTAP) có thể được sử dụng kết hợp với phospholipit để tạo ra túi phức ADN. Lipofectin™ Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) là một tác nhân hiệu quả để phân phối lượng lớn anion axit nucleic đến tế bào mô sống được nuôi cấy bao gồm liposom DOTMA tích điện dương mà tương tác tự phát với polynucleotit tích điện âm để hình thành các cấu trúc kép. Khi sử dụng đủ các liposom tích điện dương, điện tích lưới cũng sẽ tích điện dương. Các cấu trúc kép tích điện dương được điều chế bàng cách này một cách ngẫu nhiên được gắn với các bề mặt tế bào điện tích âm, trộn với huyết tương màng, và phân phối một cách hiệu quả axit nucleic chức năng vào, ví dụ, mô cấy các tế bào. Một cation lipit khác có trên thị trường, 1,2-bis(oleoyloxy)-3,3-(trimetylammonia)propan ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) khác với DOTMA mà các gốc oleoyl được liên kết bởi este, chứ không phải là là các liên kết ete.

Các hợp chất lipit cation được báo cáo khác bao gồm các hợp chất mà đã được liên hợp với nhiều loại gốc bao gồm, ví dụ, carboxyspermin mà đã được liên hợp với một trong hai loại lipit và bao gồm các hợp chất chẳng hạn như 5-carboxyspermylglyxin đioctaoleoylamit ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin) và đipalmitoylphosphatiđyletanolamin 5-carboxyspermyl-amit ("DPPES") (xem ví dụ, Sáng chế Mỹ số. 5,171,678).

Thể liên hợp lipit cation khác bao gồm sự tạo dẫn xuất của lipit với cholesterol ("DC-Chol") mà đã đươc tạo chế phẩm thành các liposom kết hợp với DOPE (xem, Gao, X. và Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991). Lipopolylysin, được tạo ra bằng cách liên hợp polylysin với DOPE, đã được báo cáo là hữu hiệu để chuyển nạp trong sự có mặt của huyết thanh (Zhou, X. và cộng sự., *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991). Đối với một số dòng tế bào, các liposom cation lipit liên hợp, đã được cho biết là biểu hiện tính đọc thấp hơn và cung cấp thêm sự được biến nạp hiệu quả hơn DOTMA chứa chế

phẩm. Các sản phẩm lipit cation có sẵn trên thị trường khác bao gồm DMRIE và DMRIE-HP (Vical, La Jolla, California) và Lipofectamin (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Các cation lipit khác thích hợp cho việc phân phối các aligonucleotit được mô tả trong WO 98/39359 và WO 96/37194.

Các chế phẩm liposom đặc biệt thích hợp với việc sử dụng cục bộ, liposom cho thấy một số ưu điểm hơn so với các chế phẩm khác. Các ưu điểm đó bao gồm việc làm giảm tác dụng phụ liên quan đến sự hấp thụ cao có hệ thống của việc sử dụng thuốc, tăng sự tích tụ của các thuốc sử dụng đến mục tiêu mong muốn, và khả năng sử dụng tác nhân ARNi cho da. Theo một số phương án thực hiện, liposom hữu dụng để phân phối tác nhân ARNi đến các tế bào biểu mô và còn tăng cường sự thâm nhập của tác nhân ARNi vào mô bì, ví dụ, vào da. Ví dụ, liposom có thể được sử dụng cục bộ. Việc phân phối tại chỗ của thuốc được tạo chế phẩm dưới dạng các liposom cho da đã được ghi trong tài liệu (xem ví dụ, Weiner *và cộng sự., Journal of Drug Targeting,* 1992, vol. 2,405-410 và du Plessis *và cộng sự., Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. và Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988; Itani, T. *và cộng sự. Gene* 56:267-276. 1987; Nicolau, C. *và cộng sự. Meth. Enz.* 149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. và Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang, C. Y. và Huang, L., P*roc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987).

Các hệ thống liposom không ion hóa cũng đã được kiểm tra để xác định tính hữu dụng trong việc phân phối của thuốc đến da, trong các hệ thống đặc biệt bao gồm chất có hoạt tính bề mặt không ion và cholesterol. Các chế phẩm liposom không ion bao gồm Novasome I (glyxeryl đilaurat/cholesteol/polyoxyetylen-10-stearyl ete) và Novasome II (glyxeryl đistearat/ cholesteol/polyoxyetylen-10-stearyl ete) được sử dụng để phân phối thuốc vào trong hạ bì của da chuột nhắt. Chế phẩm như vậy với tác nhân ARNi là hữu dụng cho điều trị rối loạn ngoài da.

Liposom mà bao gồm ARNi có thể được tạo ra có khả năng biến dạng cao. Tính biến dạng như vậy có thể giúp liposom thẩm thấu qua lỗ chân lông mà nhỏ hơn bán kính trung bình của của liposom. Ví dụ, transferosom là một loại liposom có thể biến dạng. Các transferosom có thể được tạo ra bằng cách cho vào các chất kích hoạt cạnh bề mặt, thường là các chất hoạt tính bề mặt, vào chế phẩm liposomal tiêu chuẩn. Transferosom mà bao gồm

tác nhân ARNi có thể được phân phối, ví dụ, dưới da bằng cách tiêm để phân phối tác nhân ARNi vào tế bào keratin trong da. Để vượt qua da động vật có vú còn nguyên vẹn, các túi lipit phải đi qua một loạt các lỗ chân lông mịn, mỗi túi với đường kính ít hơn 50 nm, dưới sự ảnh hưởng của một độ građien thẩm thấu qua da thích hợp. Ngoài ra, do các tính chất của lipit, các transferosom có thể là tự tối ưu hóa (thích ứng với hình dạng của lỗ chân lông, *ví dụ*, trên da), tự sửa chữa, thường đạt đến mục tiêu của chúng mà không chia mảnh, và thường là tự tải.

Các chế phẩm khác theo như được mô tả trong các Đơn tạm thời Mỹ Số. 61/018,616, nộp ngày 2 tháng 1 năm 2008; 61/018,611, nộp ngày 2 tháng 1 năm 2008; 61/039,748, nộp ngày 26 tháng 3 năm 2008; 61/047,087, nộp ngày 22 tháng 4 năm 2008 và 61/051,528, nộp ngày 8 tháng 5 năm 2008. Đơn PCT số PCT/US2007/080331, nộp ngày 3 tháng 10 năm 2007 cũng mô tả chế phẩm mà tuân theo sáng chế.

Transferosom là loại liposom khác nữa, và là khối kết tụ lipit có thể biến dạng cao mà là ứng viên hấp dẫn đối với tá dược phân phối thuốc. Transferosom có thể được mô tả dưới dạng giọt lipit mà có thể biến dạng cao mà chúng có thể dễ dàng thâm nhập qua các lỗ nhỏ hơn giọt này. Transferosom có thể thích ứng với môi trường mà chúng được sử dụng, *ví dụ,* chúng tự tối ưu hóa (thích ứng với hình dạng của các lỗ trong da), tự sửa chữa, thường xuyên đến được đích của chúng mà không bị phân mảnh, và thường tự tải. Để tạo ra transferosom có thể bổ sung chất hoạt hóa edge bề mặt, thường là chất hoạt động bề mặt, vào hợp phần liposom tiêu chuẩn. Transferosom đã được sử dụng để phân phối albumin huyết thanh cho da. Sự phân phối qua trung gian transferosom của albumin huyết thanh đã được thể hiện là hữu hiệu như sự tiêm dưới da của dung dịch chứa albumin huyết thanh.

Các chất hoạt tính bề mặt tìm thấy ứng dụng rộng rãi trong các chế phẩm như các nhũ tương (bao gồm các vi nhũ tương) và liposom. Cách phổ biến nhất của việc phân loại và xếp hạn tính chất của nhiều loại chất hoạt tính bề mặt khác nhau, cả tự nhiên và tổng hợp, là bằng cách sử dụng tỉ lệ cân bằng chất ưa nước/chất ưa lipit (HLB). Bản chất của nhóm ưa nước (còn được gọi là "đầu") tạo ra phương tiện hữu hiệu nhất để phân loại các chất hoạt động bề mặt khác nhau dùng trong chế phẩm (Rieger, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, trang 285).

Nếu chất hoạt tính bề mặt phân tử là không ion hóa, nó được phân loại là chất hoạt tính bề mặt không ion. Các chất hoạt tính bề mặt không ion có khả năng áp dụng rộng rãi trong các sản phẩm dược và mỹ phẩm và sử dụng được với giá trị độ pH trải dài. Nói chung giá trị HLB của chúng từ 2 đến 18 tùy thuộc vào cấu trúc. Các chất hoạt tính bề mặt không ion bao gồm este không ion như este của etylen glycol, este của propylen glycol, este của glyxeryl, este của polyglyxeryl, este của sorbitan, este ủa sucroza, và este được etoxyl hóa. Alkanolamit không ion và ete như các etoxylat rượu béo, rượu propoxylat, và polyme khối được etoxyl hóa/propoxyl hóa cũng được bao gồm trong lớp này. Các chất hoạt tính bề mặt polyoxyetylen là các chất quan trọng nhất của lớp chất hoạt tính bề mặt không ion.

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

Nếu chất hoạt tính bề mặt phân tử mang tích điện dương khi nó được hòa tan hoặc phân tán trong nước, thì chất hoạt tính bề mặt được phân loại là cation. Các chất hoạt tính bề mặt cation bao gồm các muối amoni bậc bốn và các amin được etoxyl hóa. Các muối amoni bậc bốn là các chất được sử dụng nhiều nhất của lớp này.

Nếu chất hoạt tính bề mặt phân tử có khả năng mang hoặc tích điện dương hoặc âm, chất hoạt tính bề mặt được phân loại là chất lưỡng tính. Các chất hoạt tính bề mặt lưỡng tính bao gồm axit acrylic phái sinh, alkylamit được thế, N-alkylbetain và phosphatit.

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

ARNi dùng trong phương pháp theo sáng chế còn có thể được cung cấp dưới dạng các chế phẩm mixen. "Các mixen" được định nghĩa ở đây là loại cụ thể của việc lắp ráp phân tử trong đó lưỡng tính các phân tử được sắp xếp trong cấu trúc hình cầu như vậy tất cả các phần kỵ nước của các phân tử là trực tiếp hướng vào, để lại phần ưa nước tiếp xúc với pha nước xung quanh. Việc sắp xếp ngược là tồn tại nếu môi trường là kỵ nước.

Chế phẩm mixen được trộn thích hợp để phân phối thông qua việc đi qua các màng có thể được điều chế bởi trộn dung dịch trong nước của các chế phẩm sARNi, kim loại kiềm C_8 đến C_{22} alkyl sulfat, và các hợp chất tạo thành mixen. Mixen mẫu mực tạo thành hợp chất bao gồm lexithin, axit hyaluronic, các muối dược dụng của axit hyaluronic, axit glycolic, axit lactic, chất chiết cúc La Mã, chất chiết dưa chuột, axit oleic, axit linoleic, axit linolenic, monoolein, monooleat, monolaurat, dầu lưu ly, dầu cây anh thảo, tinh dầu bạc hà, trihyđroxy oxo cholanyl glyxin và các muối dược dụng của chúng, glyxerin, polyglyxerin, lysin, polylysin, triolein, polyoxyetylen ete và dạng tương tự của chúng, poliđocanol alkyl ete và dạng tương tự của chúng, chenođeoxycholat, đeoxycholat, và các hỗn hợp của chúng. Mixen tạo thành hợp chất có thể được thêm vào ở cùng thời điểm hoặc sau khi bổ sung kim loại kiềm alkyl sulfat. Các mixen được trộn sẽ hình thành với cơ bản là bất kỳ loại của các nguyên liệu trộn nhưng việc trộn mạnh mẽ nhằm để cung cấp các mixen kích cỡ nhỏ hơn.

Trong một phương pháp chế phẩm mixen thứ nhất được điều chế mà chứa chế phẩm siARN và ít nhất kim loại kiềm alkyl sulfat. Chế phẩm mixen thứ nhất là sau đó được trộn với ít nhất ba hợp chất tạo thành mixen để hình thành chế phẩm được trộn mixen. Trong phương pháp khác, chế phẩm mixen được điều chế bằng cách trộn chế phẩm siARN, kim loại kiềm alkyl sulfat và ít nhất một trong số các mixen tạo thành hợp chất, sau đó bằng cách bổ sung mixen còn lại tạo thành hợp chất, với việc trộn mạnh mẽ.

Phenol và/hoặc m-cresol có thể được thêm vào chế phẩm mixen được trộn để ổn định hóa chế phẩm và bảo vệ chống lại sự phát triển của vi khuẩn. Tùy ý, phenol và/hoặc m-cresol có thể được thêm vào với mixen tạo thành các nguyên liệu. Tác nhân đẳng trương như glyxerin có thể cũng có thể được thêm vào công thức của hỗn hợp chế phẩm được trộn.

Để phân phối của chế phẩm mixen bằng cách phun, công thức có thể được đặt vào trong bình phân phối khí nén và bình phân phối được nạp với chất đẩy. Chất đẩy, mà dưới áp suất, là ở dạng lỏng trong bình phân phối. Các tỷ lệ thành phần được điều chỉnh sao cho pha nước và chất đẩy trở thành một, cụ thể là, có một pha. Nếu có hai pha, cần phải khuấy bình phân phối trước khi phân phối một phần dung lượng, *ví dụ,* thông qua van có đồng hồ đo. Liều được phân phối của tác nhân dược là được đẩy vào từ các van có đồng hồ đo trong bình xịt tinh luyện.

Các chất đẩy có thể bao gồm hydro-chứa cloroflocacbon, flocacbon chứa hyđro, đimetyl ete và đietyl ete. Theo một số phương án, HFA 134a (1,1,1,2 tetrafloetan) có thể được sử dụng.

Các nồng độ cụ thể của các nguyên liệu thiết yếu có thể được xác định bởi thí nghiệm tương đối đơn giản. Để hấp thụ thông qua đường uống, thường có mong muốn gia tăng, *ví dụ,* ít nhất gấp đôi hoặc gấp ba, liều dùng thông qua tiêm hoặc sử dụng thông qua đường tiêu hóa.

Hạt lipit

iARN, *ví dụ,* dsARN theo sáng chế có thể được bao nang đầy đủ trong chế phẩm lipit, *ví dụ,* LNP, hoặc hạt axit nucleic-lipit khác.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "LNP" đề cập đến hạt lipit axit nucleic ổn định. LNP chứa lipit tích điện dương, lipit không tích điện dương, và lipit ngăn chặn sự kết cụm của hạt (*ví dụ*, liên hợp PEG-lipit). LNP cực kỳ hữu dụng cho các áp dụng toàn thân, như chúng thể hiện vòng đời tuần hoàn được kéo dài sau khi tiêm trong tĩnh mạch (i.v.) tiêm và tích lũy ở các vị trí xa (*ví dụ*, các vị trí được phân cắt về vật lý từ vị trí dùng). LNP bao gồm "pSPLP," mà bao gồm tác nhân gây ngưng tụ được đóng gói-axit nucleic cấu trúc kép như nêu trong Công bố đơn PCT số WO 00/03683. Các hạt theo sáng chế thường có đường kính trung bình của khoảng 50 nm đến 150 nm, thông thường hơn khoảng 60 nm đến 130 nm, thông thường hơn khoảng 70 nm đến 110 nm, thông thường nhất khoảng 70 nm đến 90 nm, và là cơ bản là không độc hại. Ngoài ra, axit nucleic khi có mặt trong các hạt lipit axit nucleic theo sáng chế là kháng dung dịch trong nước với sự thoái biến với nucleaza. Các hạt lipit axit nucleic và phương pháp điều chế của chế phẩm được bộc lộ trong, *ví dụ*, Sáng chế Mỹ số 5,976,567; 5,981,501; 6,534,484; 6,586,410; 6,815,432; Công bố đơn Mỹ số. 2010/0324120 và Công bố đơn PCT số WO 96/40964.

Theo một phương án, tỉ lệ lipit với thuốc (tỷ lệ khối lượng/khối lượng) (*ví dụ*, tỷ lệ lipit với dsARN) sẽ nằm trong khoảng từ 1:1 đến 50:1, từ 1:1 đến 25:1, từ 3:1 đến 15:1, từ 4:1 đến 10:1, từ 5:1 đến 9:1, hoặc khoảng 6:1 đến 9:1. Các khoảng làm trung gian cho các khoảng được trích ở trên cũng được coi là một phần của sáng chế.

Lipit cation có thể là, ví dụ, N,N-đioleyl-N,N-đimetylamoni clorua (DODAC), N,N-đistearyl-N,N-đimetylamoni bromua (DDAB), N-(I -(2,3- đioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimetylamoni clorua (DOTAP), N-(I -(2,3- đioleyloxy)propyl)-N,N,N-trimetylamoni clorua (DOTMA), N,N-đimetyl-2,3- đioleyloxy)propylamin (DODMA), 1,2-Đilinoleyloxy-N,N-đimetylaminopropan (DLinDMA), l,2-Đilinolenyloxy-N,N-đimetylaminopropan (DLenDMA), 1,2-Đilinoleylcarbamoyloxy-3-đimetylaminopropan (DLin-C-DAP), 1,2-Dilinoleyoxy-3-(đimetylamino)axetoxypropan (DLin-DAC), 1,2-Đilinoleyoxy-3-morpholinopropan (DLin-MA), 1,2-Đilinoleoyl-3-đimetylaminopropan (DLinDAP), 1,2-Đilinoleylthio-3-đimetylaminopropan (DLin-S-DMA), 1-Linoleoyl-2-linoleyloxy-3-đimetylaminopropan (DLin-2-DMAP), muối 1,2-Đilinoleyloxy-3-trimetylaminopropan clorua (DLin-TMA.Cl), muối 1,2-Đilinoleoyl-3-trimetylaminopropan clorua (DLin-TAP.Cl), 1,2-Đilinoleyloxy-3-(N-metylpiperazino)propan (DLin-MPZ), hoặc 3-(N,N-Đilinoleylamino)-1,2-propanđiol (DLinAP), 3-(N,N-Đioleylamino)-1,2-propanđio (DOAP), 1,2-Đilinoleyloxo-3-(2-N,N-đimetylamino)etoxypropan (DLin-EG-DMA), l,2-Đilinolenyloxy-N,N-đimetylaminopropan (DLinDMA), 2,2-Đilinoleyl-4-đimetylaminometyl-[1,3]-đioxolan (DLin-K-DMA) hoặc chất tương tự của chúng, (3aR,5s,6aS)-N,N-đimetyl-2,2-đi((9Z,12Z)-octađeca-9,12-đienyl)tetrahyđro-3aH-xyclopenta[d][1,3]đioxol-5-amin (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(đimetylamino)butanoat (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hyđroxyđođexyl)amino)etyl)(2-hyđroxyđođexyl)amino)etyl)piperazin-1-yl)etylazanđiyl)điđođecan-2-ol (Tech G1), hoặc hỗn hợp của chúng. Lipit cation có thể bao gồm từ 20 mol % đến 50 mol % hoặc khoảng 40 mol % của tổng lipit có mặt trong hạt.

Theo phương án khác, hợp chất 2,2-Đilinoleyl-4-đimetylaminoetyl-[1,3]-đioxolan có thể được sử dụng để điều chế các hạt nano lipit-sARNi. Sự tổng hợp 2,2-Đilinoleyl-4-đimetylaminoetyl-[1,3]-đioxolan được mô tả trong tài liệu Đơn quốc tế số PCT/US2009/061897, được công bố dưới dạng WO/2010/048536, mà được kết hợp ở đây để tham khảo.

Theo một phương án, hạt lipit-sARNi bao gồm 40% 2, 2-Đilinoleyl-4-đimetylaminoetyl-[1,3]-đioxolan: 10% DSPC: 40% Cholesteol: 10% PEG-C-DOMG (phần trăm mol) với kích cỡ hạt 63,0 ± 20 nm và tỷ lệ siARN/Lipit 0,027.

Lipit ion hóa được/không cation có thể là lipit anion hoặc lipit trung tính bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đistearoylphosphatiđylcholin (DSPC), đioleoylphosphatiđylcholin (DOPC), đipalmitoylphosphatiđylcholin (DPPC), đioleoylphosphatiđylglyxerol (DOPG), đipalmitoylphosphatiđylglyxerol (DPPG), đioleoyl-phosphatiđyletanolamin (DOPE), palmitoyloleoylphosphatiđylcholin (POPC), palmitoyloleoylphosphatiđyletanolamin (POPE), đioleoyl- phosphatiđyletanolamin 4-(N-maleimiđometyl)-xyclohexan-l- carboxylat (DOPE-mal), đipalmitoyl phosphatiđyl etanolamin (DPPE), đimyristoylphosphoetanolamin (DMPE), đistearoyl-phosphatiđyl-etanolamin (DSPE), 16-O-monometyl PE, 16-O-đimetyl PE, 18-1 -trans PE, 1 -stearoyl-2-oleoyl- phosphatiđyestanolamin (SOPE), cholesteol, hoặc hỗn hợp của chúng. Cation không lipit có thể là từ 5 mol % đến 90 mol %, khoảng 10 mol %, hoặc khoảng 58 mol % nếu cholesteol được bao gồm, của tổng lipit có mặt trong hạt.

Thể liên hợp lipit mà ức chế sự tập hợp của các hạt có thể là, ví dụ, polyetylenglycol (PEG)-lipit bao gồm, không giới hạn, PEG-điaxylglyxerol (DAG), PEG-đialkyloxypropyl (DAA), PEG-phospholipit, PEG-xeramit (Cer), hoặc hỗn hợp của chúng. Thể liên hợp PEG-DAA có thể là, ví dụ, PEG-đilauryloxypropyl (Ci_2), PEG-đimyristyloxypropyl (Ci_4), PEG-đipalmityloxypropyl (Ci_6), hoặc PEG- đistearyloxypropyl ($C]_8$). Lipit được liên hợp mà ngăn chặn sự tập hợp của các hạt có thể là từ 0 mol % đến 20 mol % hoặc khoảng 2 mol % của tổng lipit có mặt trong hạt.

Theo một số phương án, hạt lipit axit nucleic còn bao gồm cholesterol ở, *ví dụ*, khoảng 10 mol % đến 60 mol % hoặc khoảng 48 mol % của tổng lipit có mặt trong hạt.

Theo một phương án, thể lipit ND98·4HCl (MW 1487) (xem Đơn sáng chế Mỹ số 12/056,230, nộp ngày 3/26/2008, được kết hợp ở đây để tham khảo), Cholesterol (Sigma-Aldrich), và PEG-xeramit C16 (Avanti Polar Lipids) có thể được sử dụng để điều chế các hạt nano lipit-dsARN (*cụ thể là,* các hạt LNP01). Các dung dịch gốc trong mỗi etanol có thể được điều chế như sau: ND98, 133 mg/ml; Cholesterol, 25 mg/ml, PEG-xeramit C16, 100 mg/ml. Các dung dịch gốc ND98, Cholesterol, và PEG-xeramit C16 có thể sau đó được kết hợp trong, *ví dụ*, tỉ lệ mol 42:48:10. Dung dịch lipit được kết hợp có thể được trộn với dsARN có nước (*ví dụ*, trong natri axetat độ pH 5) như vậy nồng độ etanol cuối cùng là khoảng 35-45% và nồng độ natri axetat cuối cùng là khoảng 100-300 mM. Các hạt nano lipit-dsARN chủ yếu hình thành một cách tự nhiên khi trộn. Dựa vào khoảng cách hạt phân

phối mong muốn, hỗn hợp hạt nano thu được có thể được đùn thông qua màng polycacbonat (*ví dụ*, cắt nhỏ 100 nm) bằng cách sử dụng, ví dụ, máy đùn bình nhiệt, như Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc). Trong một số trường hợp, bước đùn có thể được bỏ qua. Việc loại bỏ etanol và trao đổi chất đệm đồng thời có thể được thực hiện bởi, ví dụ, chạy thận hoặc lọc dòng chảy tiếp xúc. Chất đệm có thể được đổi với, ví dụ, nước muối đệm phosphat (PBS) ở khoảng độ pH 7, *ví dụ*, khoảng độ pH 6,9, khoảng độ pH 7,0, khoảng độ pH 7,1, khoảng độ pH 7,2, khoảng độ pH 7,3, hoặc khoảng độ pH 7,4. Chế phẩm LNP01 được mô tả, *ví dụ*, trong Công bố đơn quốc tế số WO 2008/042973, được kết hợp ở đây để tham khảo.

Ví dụ khác về chế phẩm lipit-dsARN được mô tả trong Bảng A.

Bảng A. Chế phẩm dsARN lipit ví dụ

	Lipit Ion hóa được/Cation	Thể liên hợp lipit cation/lipit không cation/cholesterol/PEG-lipit Tỷ lệ lipit:sARNi
LNP_DLinDMA	l,2-Đilinolenyloxy-N,N-đimetylaminopropan (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Cholesterol/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) lipit:sARNi ~ 7:1
2-XTC	2,2-Đilinoleyl-4-đimetylaminoetyl-[1,3]-đioxolan (XTC)	XTC/DPPC/Cholesteol/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 lipit:sARNi ~ 7:1
LNP05	2,2-Đilinoleyl-4-đimetylaminoetyl-[1,3]-đioxolan (XTC)	XTC/DSPC/Cholesteol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 lipit:sARNi ~ 6:1

LNP06	2,2-Đilinoleyl-4-đimetylaminoetyl-[1,3]-đioxolan (XTC)	XTC/DSPC/Cholesteol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 lipit:sARNi ~ 11:1
LNP07	2,2-Đilinoleyl-4-đimetylaminoetyl-[1,3]-đioxolan (XTC)	XTC/DSPC/Cholesteol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lipit:sARNi ~ 6:1
LNP08	2,2-Đilinoleyl-4-đimetylaminoetyl-[1,3]-đioxolan (XTC)	XTC/DSPC/Cholesteol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lipit:sARNi ~ 11:1
LNP09	2,2-Đilinoleyl-4-đimetylaminoetyl-[1,3]-đioxolan (XTC)	XTC/DSPC/Cholesteol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 lipit:sARNi 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-đimetyl-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienyl)tetrahyđro-3aH-xyclopenta[d][1,3]dioxol-5-amin (ALN100)	ALN100/DSPC/Cholesteol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 lipit:sARNi 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(đimetylamino)butanoat (MC3)	MC-3/DSPC/Cholesteol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 lipit:sARNi 10:1

LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hydroxydodexyl)amino)etyl)(2-hydroxydodexyl)amino)etyl)piperazin-1-yl)etylazanediyl)didodecan-2-ol (C12-200>	Tech G1/DSPC/Cholesteol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 lipit:sARNi 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 lipit:sARNi: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 lipit:sARNi: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 lipit:sARNi: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 lipit:sARNi: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 lipit:sARNi: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 lipit:sARNi: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG

		50/10/35/5 lipit:sARNi: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 lipit:sARNi: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 lipit:sARNi: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 lipit:sARNi: 10:1

Các chữ viết tắt trong Bảng A bao gồm: DSPC: đistearoylphosphatiđylcholin; DPPC: đipalmitoylphosphatiđylcholin; PEG-DMG: PEG-điđimyristoyl glyxerol (C14-PEG, hoặc PEG-C14) (PEG có khối lượng mol trung bình bằng 2000); PEG-DSG: PEG-đistyryl glyxerol (C18-PEG, hoặc PEG-C18) (PEG có khối lượng mol trung bình bằng 2000); PEG-cDMA: PEG-carbamoyl-1,2-đimyristyloxypropylamin (PEG có khối lượng mol trung bình bằng 2000).

DLinDMA (l,2-Đilinolenyloxy-N,N-đimetylaminopropan) chứa chế phẩm được mô tả trong Công bố Quốc tế Số WO2009/127060, nộp ngày 15 tháng 4 năm 2009, mà được kết hợp ở đây để tham khảo.

XTC bao gồm chế phẩm được mô tả, *ví dụ*, trong Đơn tạm thời Mỹ số. 61/148,366, nộp ngày 29 tháng 1 năm 2009; Đơn tạm thời Mỹ số. 61/156,851, nộp ngày 2 tháng 3 năm 2009; Đơn tạm thời Mỹ số nộp ngày 10 tháng 6 năm 2009; Đơn tạm thời Mỹ số 61/228,373, nộp ngày 24 tháng 7 năm 2009; Đơn tạm thời Mỹ số 61/239,686, nộp ngày 3 tháng 9 số 2009, và Đơn quốc tế số PCT/US2010/022614, nộp ngày 29 tháng 1 năm 2010, được kết hợp ở đây để tham khảo.

MC3 bao gồm các công thức được mô tả, *ví dụ*, trong Công bố đơn Mỹ số 2010/0324120, nộp ngày 10 tháng 6 năm 2010, được kết hợp ở đây để tham khảo.

ALNY-100 bao gồm chế phẩm được mô tả, *ví dụ*, Đơn sáng chế quốc tế số PCT/US09/63933, nộp ngày 10 tháng 11 năm 2009, được kết hợp ở đây để tham khảo.

C12-200 bao gồm chế phẩm như được mô tả trong Đơn tạm thời Mỹ số 61/175,770, nộp ngày 5 tháng 5 năm 2009 và Đơn quốc tế số PCT/US10/33777, nộp ngày 5 tháng 5 năm 2010, được kết hợp ở đây để tham khảo.

Chế phẩm bổ sung

i. *Nhũ tương*

Chế phẩm theo sáng chế có thể được điều chế và được hình thành như các nhũ tương. Nhũ tương thường là hệ thống hỗn tạp của một dịch lỏng được phân tán trong dịch lỏng khác ở dạng giọt thường có đường kính vượt quá 0,1μm (xem ví dụ, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., và Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Tập 1, trang 199; Rosoff, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Tập 1, trang 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Tập 2, trang 335; Higuchi *và cộng sự.*, trong Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, trang 301). Các nhũ tương thường là các hệ thống hai pha bao gồm hai pha lỏng chặt không trộn được và được phân tán với mỗi chất khác. Nói chung, các nhũ tương có thể hoặc là nước-trong-dầu (w/o) hoặc dầu-trong-nước (o/w). Khi pha nước được chia một cách tinh chế vào trong và được phân tán như các giọt ngắn vào trong pha khối dầu, thu được chế phẩm được gọi là nhũ tương nước-trong-dầu (w/o). Tùy ý, khi pha dầu là tinh chế được chia vào trong và được phân tán như các giọt ngắn vào trong khối pha nước, thu được chế phẩm được gọi là nhũ tương dầu-trong-nước (o/w). Các nhũ tương có thể chứa các thành phần bổ sung bổ sung vào các pha được phân tán, và thuốc hoạt tính mà có thể có mặt như dung dịch trong hoặc là pha nước, pha dầu hoặc mình nó như một pha riêng biệt. Tá dược như chất nhũ hóa, chất ổn định, các thuốc nhuộm, và chống oxy hóa còn có thể có mặt trong các nhũ tương như cần

thiết. Các nhũ tương được còn có thể là nhiều nhũ tương mà bao gồm nhiều hơn hai pha như, ví dụ, trong trường hợp của các nhũ tương dầu-trong-nước-trong-dầu (o/w/o) và nước-trong-dầu-trong-nước (w/o/w). Các công thức cấu trúc kép như vậy thường mang lại các lợi thế cụ thể mà các nhũ tương nhị phân đơn giản không có. Nhiều loại nhũ tương trong đó các giọt dầu đơn của nhũ tương o/w kèm theo các giọt nước nhỏ tạo thành nhũ tương w/o/w. Như vậy hệ thống của các giọt dầu kèm theo trong các hạt cầu của nước ổn định hóa trong pha dầu liên tục cung cấp nhũ tương o/w/o.

Các nhũ tương là đặc chưng bởi tính ổn định nhiệt động thấp hoặc không có. Thông thường, được pha phân tán hoặc không liên tục của nhũ tương được phân tán tốt vào bên ngoài hoặc pha liên tục và được giữ trong dạng này thông qua các phương pháp dùng chất nhũ hóa hoặc độ nhớt của công thức. Hoặc là các pha của nhũ tương có thể là bán rắn hoặc rắn, như trường hợp của nhũ tương-dạng thuốc mỡ và kem. Các cách khác của các nhũ tương ổn định dựa trên việc sử dụng chất nhũ hóa mà có thể được hợp nhất trong các pha của nhũ tương. Các chất nhũ tương hóa có thể được phân loại rộng thành bốn loại: chất hoạt động bề mặt tổng hợp, các chất nhũ tương hóa có trong tự nhiên, bazơ hấp thụ, và chất rắn được phân tán mịn (xem ví dụ, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., và Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Tập 1, trang 199).

Chất hoạt động bề mặt tổng hợp, còn được gọi là chất có hoạt tính bề mặt, được phát hiện thấy là có khả năng ứng rụng rộng rãi trong chế phẩm nhũ tương và đã được xem xét trong tài liệu (xem ví dụ, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., và Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Tập 1, trang 285; Idson, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, Tập 1, trang 199). Các chất hoạt tính bề mặt thường là lưỡng tính và bao gồm phần ưa nước và phần kỵ nước. Tỷ lệ của tính chất ưa nước với kỵ nước của chất hoạt tính bề mặt được gọi là cân bằng chất ưa nước/chất ưa lipit (HLB) và là dụng cụ có giá trị trong phân loại và lựa chọn các chất hoạt tính bề mặt trong chế phẩm của các

công thức. Chất hoạt động bề mặt có thể được phân loại thành các nhóm khác nhau dựa trên bản chất của nhóm ưa nước: không ion, anion, cation và lưỡng tính (xem ví dụ, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., và Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY Rieger, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Tập 1, trang 285).

Chất nhũ hóa có trong tự nhiên được sử dụng trong công thức nhũ tương bao gồm lanolin, sáp ong, phosphatit, lexithin và keo. Bazơ hấp thụ có các tính chất ưa nước như vậy chúng có thể hút nước để hình thành các nhũ tương w/o mà vẫn giữ được tính đồng nhất bán rắn, như lanolin khan và dầu trắng ưa nước. Các chất rắn được chia tinh chế cũng được sử dụng như các chất nhũ hóa tốt đặc biệt là khi kết hợp với các chất hoạt tính bề mặt và trong chế phẩm nhớt. Các bao gồm các chất rắn không hữu cơ có cực, như hyđroxit kim loại nặng, đất sét không phồng như bentonit, atapulgit, hectorit, cao lanh, montmorillonit, chất keo nhôm silicat và chất keo magiê nhôm silicat, các chất màu và các chất rắn không cực như cacbon hoặc glyxeryl tristearat.

Nhiều loại nguyên liệu không nhũ tương cũng bao gồm trong công thức nhũ tương và đóng góp vào các tính chất của các nhũ tương. Chúng bao gồm mỡ, dầu, sáp, axit béo, rượu béo, este béo, chất làm ẩm, keo ưa nước, chất bảo quản và chất chống oxy hóa (Block, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Tập 1, trang 335; Idson, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Tập 1, trang 199).

Keo hoặc keo nước ưa nước bao gồm gôm có trong tự nhiên và polyme tổng hợp như polysacarit (ví dụ, keo, aga, axit alginic, caragenan, gôm guar, gôm karaya, và tragacan), xenluloza phái sinh (ví dụ, carboxymetylxenluloza và carboxypropylxenluloza), và polyme tổng hợp (ví dụ, carbome, xenluloza ete, và polyme carboxyvinyl). Các chất phân tán hoặc phình trong nước để hình thành các dung dịch chất keo mà ổn định hóa các nhũ tương bằng cách hình thành các tấm chắc chắn giữa hai bề mặt xung quanh các giọt pha phân tán và bằng cách làm tăng độ nhớt của pha bên ngoài.

Khi các nhũ tương thường chứa nhiều nguyên liệu như các carbohyđrat, protein, sterol và phosphatit mà có thể sẵn sàng hỗ trợ tăng trưởng các vi sinh vật, các công thức thường có các chất bảo quản. Thông thường các chất bảo quản được sử dụng bao gồm các công thức nhũ tương bao gồm metyl paraben, propyl paraben, các muối amoni bậc bốn, benzalkonium clorit, este của axit p-hyđroxybenzoic, và axit boric. Chất chống oxy hóa là cũng thường được thêm vào công thức nhũ tương nhằm ngăn chặn sự hư hỏng của chế phẩm. Chất chống oxy hóa được sử dụng có thể là chất chống muội gốc tự do như tocopherol, alkyl galat, hyđroxyanisol được butylat hóa, hyđroxytoluen được butylat hóa, hoặc các chất khử như axit ascorbic và natri metabisulfit, và chất hiệp đồng chống oxy hóa như axit xitric, axit tartaric, và lexithin.

Việc ứng dụng chế phẩm nhũ tương thông qua các đường dùng ngoài da, đường miệng và ngoài đường tiêu hóa và phương pháp sản xuất chúng đã được xem xét trong tài liệu (xem ví dụ, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., và Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Tập 1, trang 199). Chế phẩm nhũ tương để phân phối qua đường miệng đã được sử dụng rộng rãi vì dễ tạo chế phẩm, cũng như là hữu hiệu theo quan điểm về sự hấp thụ và sinh khả dụng (xem ví dụ, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., và Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Tập 1, trang 245; Idson, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Tập 1, trang 199). Thuốc nhuận tràng gốc khoáng dầu, các vitamin tan trong dầu và chế phẩm dinh dưỡng nhiều chất béo là một trong các nguyên liệu mà đã thường được sử dụng qua đường uống như các nhũ tương o/w.

ii. Các vi nhũ tương

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm của các ARNi và axit nucleic được hình thành như các vi nhũ tương. Vi nhũ tương có thể được xác định là hệ thống gồm nước, dầu và chất lưỡng tính mà là dung dịch lỏng ổn định nhiệt động và tùy ý đẳng hướng đơn lẻ

(xem ví dụ, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., và Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Tập 1, trang 245). Thông thường vi nhũ tương là hệ thống được điều chế bằng cách trước hết phân tán dầu trong dung dịch chất hoạt động bề mặt trong nước và sau đó bổ sung lượng đủ của thành phần thứ tư, thường là rượu có chiều dài mạch trung bình để tạo thành hệ trong suốt. Do đó, vi nhũ tương cũng được mô tả là dịch phân tán trong đẳng hướng, ổn định về mặt nhiệt động học của hai dịch lỏng không trộn lẫn mà được làm ổn định bằng màng phân cách của phân tử có hoạt tính bề mặt (Leung và Shah, trong: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, trang 185-215). Các vi nhũ tương thường được điều chế thông qua sự kết hợp của từ ba đến năm thành phần mà bao gồm dầu, nước, chất có hoạt tính bề mặt, đồng chất có hoạt tính bề mặt và chất điện giải. Vi nhũ tương thuộc loại nước-trong-dầu (w/o) hoặc dầu-trong-nước (o/w) tùy thuộc vào tính chất của dầu và chất hoạt động bề mặt được sử dụng và cấu trúc và sự đóng gói hình học của các đầu phân cực và các đuôi hyđrocacbon của các phân tử chất hoạt động bề mặt (Schott, trong Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, trang 271).

Cách tiếp cận hiện tượng luận sử dụng sơ đồ pha đã được nghiên cứu bao quát và mang lại hiểu biết toàn diện, cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, về việc làm thế nào để tạo chế phẩm vi nhũ tương (xem ví dụ, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., và Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Tập 1, trang 245; Block, trong Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger và Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Tập 1, trang 335). So với các nhũ tương thông thường, các vi nhũ tương đem lại lợi thế trong việc hòa tan các thuốc không tan trong nước trong công thức của các giọt ổn định nhiệt động mà được tạo ra một cách ngẫu nhiên.

Các chất hoạt tính bề mặt được sử dụng trong chế phẩm của các vi nhũ tương bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất hoạt tính bề mặt ion, các chất hoạt tính bề mặt không ion, Brij 96, polyoxyetylen oleyl ete, polyglyxerol este của axit béo, tetraglyxerol

monolaurat (ML310), tetraglyxerol monooleat (MO310), hexaglyxerol monooleat (PO310), hexaglyxerol pentaoleat (PO500), đecaglyxerol monocaprat (MCA750), đecaglyxerol monooleat (MO750), đecaglyxerol sequioleat (SO750), đecaglyxerol đecaoleat (DAO750), đơn lẻ hoặc kết hợp với các đồng chất hoạt tính bề mặt. Đồng chất hoạt tính bề mặt, thường là rượu mạch ngắn như etanol, 1-propanol, và 1-butanol, hoạt tính để gia tăng lưu động bề mặt bằng việc thâm nhập vào trong màng chất hoạt tính bề mặt và kết quả là gây rối loạn màng bởi các khoảng trống được tạo ra giữa các phân tử chất hoạt tính bề mặt. Các vi nhũ tương có thể, tuy nhiên, được điều chế mà không sử dụng các đồng chất hoạt tính bề mặt và không có rượu tự nhũ tương hóa các hệ thống vi nhũ tương được biết đến trong lĩnh vực. Pha nước có thể thường là, nhưng không giới hạn ở, nước, dung dịch trong nước của thuốc, glyxerol, PEG300, PEG400, polyglyxerol, propylen glycol, và phái sinh của etylen glycol. Pha dầu có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nguyên liệu như Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, este của axit béo, mono, đi, và tri-glyxerit mạch trung bình (C8-C12), polyoxyetylated este của glyxeryl của axit béo, rượu béo, glyxerit được polyglycol hóa, C8-C10 glyxerit bão hòa được polyglycol hóa, dầu thực vật và dầu silicon.

Các vi nhũ tương là đặc biệt được ưa thích từ quan điểm hòa tan của thuốc và tăng sự hấp thụ của thuốc. Vi nhũ tương gốc lipit (cả o/w và w/o) đã được đề xuất làm tăng cường sinh khả dụng qua đường miệng của thuốc, bao gồm peptit (xem ví dụ, Sáng chế Mỹ số. 6,191,105; 7,063,860; 7,070,802; 7,157,099; Constantinides *và cộng sự.*, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Vi nhũ tương mang lại ưu điểm của sự hòa tan thuốc được cải thiện, sự bảo vệ thuốc khỏi sự thủy phân bằng enzym, sự tăng cường có thể có sủa sự hấp thụ thuốc do sự thay đổi gây ra bởi chất hoạt động bề mặt ở độ lỏng và độ thấm của màng, sự dễ dàng điều chế, sự dễ dàng dùng qua đường đường miệng cho các dạng liều lượng rắn, hiệu lực lâm sàng được cải thiện, và độ độc giảm (xem ví dụ, Sáng chế Mỹ số. 6,191,105; 7,063,860; 7,070,802; 7,157,099; Constantinides *và cộng sự.*, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho *và cộng sự.*, *J. Pharm. Sci.,* 1996, 85, 138-143). Thường các vi nhũ tương có thể hình thành một cách ngẫu nhiên khi các thành phần của chúng được đưa vào với nhau ở nhiệt độ môi trường. Điều này có thể là đặc biệt là có lợi khi hình thành thuốc không chịu nhiệt, peptit hoặc các ARNi. Các vi nhũ tương cũng có hiệu quả trong phân phối qua da của các thành phần hoạt tính trong cả hai ứng dụng mỹ phẩm và dược. Nó được kỳ vọng là chế phẩm vi

nhũ tương và chế phẩm theo sáng chế sẽ tạo điều kiện tăng sự hấp thụ toàn thân của các ARNi và axit nucleic từ đường tiêu hóa, cũng như sự hấp thu tế bào khu vực của các ARNi và axit nucleic.

Các vi nhũ tương theo sáng chế còn có thể chứa bổ sung các thành phần và các phụ gia như sorbitan monostearat (Grill 3), Labrasol, và chất tăng cường sự thẩm thấu để cải thiện tích chất của công thức và để tăng hấp thụ của các ARNi và axit nucleic theo sáng chế. Chất tăng cường thẩm thấu được sử dụng trong vi nhũ tương của thể hiện sáng chế có thể được phân loại thuộc vào một trong năm loại lớn--chất hoạt động bề mặt, axit béo, muối mật, chất chelat hóa, và chất không hoạt động bề mặt không chelat hóa (Lee *và cộng sự.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, trang 92). Mỗi loại này đã được đề cập ở trên.

iii. Vi hạt

Tác nhân ARNi theo sáng chế có thể được kết hợp vào trong hạt, *ví dụ*, vi hạt. Vi hạt có thể là tạo ra bằng cách phun sấy, nhưng có thể cũng được tạo ra bởi khác phương pháp bao gồm làm đông khô, bốc hơi, sấy tầng chất lỏng, sấy chân không, hoặc sự kết hợp của các phương pháp này.

iv. Chất tăng cường thẩm thấu

Theo một phương án, sáng chế sử dụng nhiều loại chất tăng cường thẩm thấu để tác động đến hiệu quả phân phối của axit nucleic, đặc biệt là các ARNi đối với da động vật. Đa phần thuốc có trong dung dịch đều ở dạng được ion hóa và không được ion hóa. Tuy nhiên, thường chỉ có lipit hòa tan hoặc thuộc ưa lipit là có thể vượt qua màng tế bào. Đã có các phát hiện rằng thậm chí các thuốc không ưa lipit có thể vượt qua màng tế bào nếu màng được vượt qua đó được xử lý bằng chất tăng cường thẩm thấu. Ngoài ra để hỗ trợ sự truyền của các thuốc không ưa lipit, thuốc ưa lipit vượt màng tế bào, các chất tăng cường tế bào cũng tăng cường độ thấm của các chất tăng cường thẩm thấu thuốc ưa lipit.

Chất tăng cường thẩm thấu có thể được phân loại thuộc vào một trong năm loại lớn, *tức là*, chất hoạt động bề mặt, axit béo, muối mật, chất chelat hóa, và chất không hoạt động bề mặt không chelat hóa (xem ví dụ, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *và cộng sự.*, Critical Reviews in

Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, trang 92). Mỗi loại của các chất tăng cường thẩm thấu được nhắc đến ở trên được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Chất hoạt tính bề mặt (hoặc "các tác nhân hoạt tính bề mặt") là các thực thể hóa học mà, khi tan trong dung dịch trong nước, làm giảm sự căng bề mặt của dung dịch hoặc sức căng giữa các bề mặt giữa dung dịch trong nước và các chất lỏng khác, với kết quả là sự hấp thụ của ARNi thông qua màng nhầy được tăng cường. Ngoài muối mật và axit béo, các chất tăng cường thẩm thấu bao gồm, ví dụ, natri lauryl sulfat, polyoxyetylen-9-lauryl ete và polyoxyetylen-20-xetyl ete) (xem ví dụ, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *và cộng sự.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, trang 92); và nhũ tương hóa chất flo hóa, chẳng hạn như FC-43. Takahashi *và cộng sự.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Nhiều loại axit béo và dẫn xuất của chúng mà có hoạt tính như các chất tăng cường thẩm thấu bao gồm, ví dụ, axit oleic, axit lauric, axit capric (axit n-đecanoic), axit myristic, axit palmitic, axit stearic, axit linoleic, axit linolenic, đicaprat, tricaprat, monoolein (1-monooleoyl-rac-glyxerol), đilaurin, axit caprylic, axit arachiđonic, glyxerol 1-monocaprat, 1-đođexylazaxycloheptan-2-on, axylcarnitin, axylcholin, C_{1-20} alkyl este của chúng (*ví dụ*, metyl, isopropyl và t-butyl), và mono- và đi-glyxerit của chúng (*cụ thể là*, oleat, laurat, caprat, myristat, palmitat, stearat, linoleat, *v.v.*) (xem ví dụ, Touitou, E., *và cộng sự.* Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *và cộng sự.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, trang 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri *và cộng sự.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

Vai trò sinh lý của mật bao gồm tạo điều kiện thuận lợi cho sự phân tán và sự hấp thụ của lipit và vitamin hòa tan trong chất béo (xem ví dụ, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chương 38 trong: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman *và cộng sự.* Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, trang 934-935). Nhiều loại các muối mật tự nhiên, và phái sinh tổng hợp của chúng, hoạt tính như chất tăng cường sự thẩm thấu. Do đó thuật ngữ "các muối mật" bao gồm bất kỳ các thành phần trong tự nhiên của mật cũng như bất kỳ của chất phái sinh tổng hợp của chúng. Muối mật thích hợp bao gồm, ví dụ, axit

cholic (hoặc muối natri dược dụng của nó, natri cholat), axit đehyđrocholic (natri đehyđrocholat), axit đeoxycholic (natri đeoxycholat), gluaxit cholic (natri glucholat), axit glycholic (natri glycocholat), axit glycođeoxycholic (natri glycođeoxycholat), axit taurocholic (natri taurocholat), axit taurođeoxycholic (natri taurođeoxycholat), axit chenođeoxycholic (natri chenođeoxycholat), axit ursođeoxycholic (UDCA), natri tauro-24,25-đihyđro-fusiđat (STDHF), natri glycođihyđrofusiđat và polyoxyetylen-9-lauryl ete (POE) (xem ví dụ, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *và cộng sự*., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, trang 92; Swinyard, Chương 39 trong: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, trang 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto *và cộng sự*., *J. Pharm. Exp. Ther*., 1992, 263, 25; Yamashita *và cộng sự*., *J. Pharm. Sci*., 1990, 79, 579-583).

Các chất chelat hóa, như được sử dụng trong kết nối của sáng chế, có thể được định nghĩa là hợp chất mà loại bỏ ion kim loại từ dung dịch bởi tạo thành các cấu trúc kép, với kết quả là sự hấp thụ của các ARNi thông qua niêm mạc được tăng lên. Đối với việc sử dụng chúng làm chất tăng cường thẩm thấu trong sáng chế, chất chelat hóa có ưu điểm bổ sung là cũng đáp ứng làm chất ức chế ADNaza, làm ADN nucleaza được xác định đặc điểm nhiều nhất cần ion kim loại hóa trị hai để xúc tác và do đó bị ức chế bởi chất chelat hóa (Jarrett, *J. Chromatogr*., 1993, 618, 315-339). Chất chelat hóa thích hợp bao gồm nhưng không giới hạn ở đinatri etylenđiamintetraaxetat (EDTA), axit xitric, salicylat (*ví dụ*, natri salixylat, 5-metoxysalixylat và homovanilat), dẫn xuất N-axyl của colagen, laureth-9 và dẫn xuất N-amino axyl của beta-điketon (enamin)(xem ví dụ, Katdare, A. *và cộng sự*., Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *và cộng sự*., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, trang 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur *và cộng sự*., *J. Control Rel*., 1990, 14, 43-51).

Như được dùng trong bản mô tả này, hợp chất tăng cường thẩm thấu chất không hoạt động bề mặt không chelat hóa có thể được xác định là hợp chất mà chứng tỏ hoạt tính không đáng kể làm chất chelat hóa hoặc làm chất hoạt động bề mặt nhưng tuy nhiên làm tăng

cường sự hấp thụ của iARN qua niêm mạc đường tiêu hóa (xem ví dụ, Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Nhóm chất tăng cường thẩm thấu này bao gồm, ví dụ, urê vòng chưa no, dẫn xuất 1-alkyl- và 1-alkenylazaxyclo-alkanon (Lee *và cộng sự*., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, trang 92); và chất kháng viêm không steroit chẳng hạn như điclofenac natri, inđomethaxin và phenylbutazon (Yamashita *và cộng sự*., *J. Pharm. Pharmacol*., 1987, 39, 621-626).

Các tác nhân mà làm tăng sự hấp thu của các ARNi ở mức độ tế bào còn có thể là bổ sung dược và chế phẩm khác theo sáng chế. Ví dụ, lipit cation, chẳng hạn như lipofectin (Junichi *và cộng sự*, Sáng chế Mỹ số. 5,705,188), dẫn xuất glyxerol cation, và phân tử polycation, chẳng hạn như polylysin (Lollo *và cộng sự*., Đơn PCT WO 97/30731), còn được biết là làm tăng cường sự hấp thụ tế bào của dsARN. Các ví dụ về chất phản ứng chuyển nạp có trên thị trường bao gồm, ví dụ Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), 293fectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Cellfectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), DMRIE-C™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), ARNiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Oligofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Optifect™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Chất phản ứng Chuyển nạp X-tremeGENE Q2 (Roche; Grenzacherstrasse, Thụy Sĩ), Chất phản ứng Chuyển nạp Liposom DOTAP (Grenzacherstrasse, Thụy Sĩ), Chất phản ứng Chuyển nạp Liposom DOSPER (Grenzacherstrasse, Thụy Sĩ), hoặc Fugene (Grenzacherstrasse, Thụy Sĩ), Chất phản ứng Transfectam® (Promega; Madison, WI), Chất phản ứng Chuyển nạp TransFast™ (Promega; Madison, WI), Chất phản ứng Tfx™-20 (Promega; Madison, WI), Chất phản ứng Tfx™-50 (Promega; Madison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marseille, Pháp), EcoTransfect (OZ Biosciences; Marseille, Pháp), Chất phản ứng Chuyển nạp TransPass[a] D1 (New England Biolabs; Ipswich, MA, Mỹ), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; San Diego, CA, Mỹ),Chất phản ứng Chuyển nạp PerFectin (Genlantis; San Diego, CA, Mỹ), Chất phản ứng Chuyển nạp NeuroPORTER (Genlantis; San Diego, CA, Mỹ), Chất phản ứng Chuyển nạp GenePORTER (Genlantis; San Diego, CA, Mỹ), Chất phản ứng Chuyển nạp GenePORTER 2 (Genlantis; San Diego, CA, Mỹ), Chất phản ứng Chuyển nạp Cytofectin (Genlantis; San Diego, CA, Mỹ), Chất phản ứng Chuyển nạp BaculoPORTER (Genlantis; San Diego, CA, Mỹ), Chất phản ứng Chuyển

nạp TroganPORTER™ (Genlantis; San Diego, CA, Mỹ), RiboFect (Bioline; Taunton, MA, Mỹ), PlasFect (Bioline; Taunton, MA, Mỹ), UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, Mỹ), SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, Mỹ), hoặc HiFect™ (B-Bridge International, Mountain View, CA, Mỹ), trong số các chất khác.

Các tác nhân có thể được sử dụng để tăng sự thẩm thấu của axit nucleic được dử dụng, bao gồm glycol như etylen glycol và propylen glycol, pyrol như 2-pyrol, azon, và terpen như là limonen và menthon.

v. Chất mang

Một số chất tổng hợp của sáng chế cũng kết hợp với hợp chất mang trong chế phẩm. Như được sử dụng ở đây, "hợp chất mang" hoặc "chất mang" có thể là axit nucleic, hoặc chất tương tự mà trơ (*cụ thể là*, không có hoạt tính sinh học *về bản chất*) nhưng được công nhận là axit nucleic bởi các quá trình *trong cơ thể* mà làm giảm tính sinh học của axit nucleic có hoạt tính sinh học bằng cách, ví dụ, làm suy thoái axit nucleic hoạt tính sinh học hoặc thúc đẩy loại bỏ nó khỏi sự tuần hoàn Việc đồng sử dụng axit nucleic và hợp chất mang, điển hình là với lượng dư của chất thứ hai, có thể dẫn đến việc giảm đáng kể lượng axit nucleic được phục hồi lại trong gan, thận hoặc phần chứa ngoài lưu thông, được cho là do sự cạnh tranh giữa các hợp chất mang và axit nucleic cho thụ thể chung. Ví dụ, việc thu hồi của dsARN phosphorothioat một phần ở mô gan có thể được giảm đi khi nó được đồng sử dụng với axit polyinosinic, đextran sulfat, axit polyxytiđic hoặc axit 4-axetamiđo-4'isothioxyano-stilben-2,2'-đisulfonic (Miyao *và cộng sự*., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura *và cộng sự*., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183.

vi. Tá dược

Ngược lại với hợp chất mang, một "chất mang dược" hoặc "tá dược" là một dung môi dược dụng, tác nhân ngưng tụ chất chuyển dược khác để chuyển một hoặc nhiều axit nucleic của động vật. Tá dược có thể ở dạng lỏng hoặc rắn và được lựa chọn, với các cách sử dụng đã được lên kế hoạch trong đầu, để đáp ứng được phần lớn mong muốn, nhất quán, *v.v.*, khi được kết hợp với một axit nucleic và các thành phần khác của một thành phần dược nhất định. Thông thường các chất mang dược bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các tác nhân liên kết (*ví dụ*, tinh bột ngô được tiền gelatin hóa, polyvinylpyroliđon hoặc

hyđroxypropyl metylxenluloza, *v. v.*); các chất làm đặc (*ví dụ*, lactoza và các đường khác, xenluloza vi tinh thể, pectin, gelatin, canxi sulfat, etyl xenluloza, polyacrylat hoặc canxi hyđro phosphat, *v.v.*); các chất bôi trơn (*ví dụ*, magiê stearat, bột talc, silic oxit, chất keo silicon đioxit, axit stearic, stearat kim loại, các dầu thực vật được hyđro hóa, bột ngô, polyetylen glycol, natri benzoat, natri axetat, *v.v.*); chất phân rã (*ví dụ*, tinh bột, natri tinh bột glycolat, *v.v.*); và các tác nhân làm ẩm (*ví dụ*, natri lauryl sulfat, *v.v.*).

Các tá dược hữu cơ hoặc vô cơ có thể chấp nhận được thích hợp với việc sử dụng bên ngoài mà không phản ứng độc với axit nucleic có thể được sử dụng để xây dựng các chế phẩm theo sáng chế. Các dược chất mang thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở nước, muối, rượu, polyetylen glycol, gelatin, lactoza, amylaza, magiê stearat, bột talc, axit silic, parafin nhớt, hyđroxymetylxenluloza, polyvinylpyroliđon và các chất tương tự.

Các chế phẩm để sử dụng axit nucleic cục bộ có thể bao gồm thuốc nước tiệt trùng hoặc không được tiệt trùng, thuốc không chứa nước trong các dung môi phổ biến như rượu, hoặc dung dịch của axit nucleic trong các dạng dầu lỏng hoặc rắn. Các dung dịch này cũng có thể chứa chất đệm, chất pha loãng và các chất phụ gia khác. Các tá dược hữu cơ hoặc vô cơ chấp nhận được thích hợp với việc sử dụng bên ngoài mà không phản ứng độc hại với axit nucleic có thể được sử dụng.

Các tá dược thích hợp chấp nhận được bao gồm, nhưng không giới hạn ở nước, dung dịch muối, rượu, polyetylen glycol, gelatin, lactoza, amyloza, magiê stearat, bột talc, axit silic, màng parafin nhớt, hyđroxymetylxenluloza, polyvinylpyroliđon và các chất tương tự.

vii. Các thành phần khác

Các chế phẩm theo sáng chế có thể chứa thêm các thành phần phụ khác vẫn thường được tìm thấy trong dược phẩm, ở các mức sử dụng được đặt sẵn trong lĩnh vực. Do đó, ví dụ, chế phẩm có thể chứa thêm các nguyên liệu dược tương thích các nguyên liệu hoạt tính dược như, ví dụ, thuốc trị ngứa, chất làm se da, thuốc gây tê tại chỗ hoặc tác nhân chống viêm, hoặc có thể chứa các nguyên liệu bổ sung hữu dụng trong việc tạo dạng vật lý nhiều loại liều của chế phẩm theo sáng chế, như là thuốc nhuộm, các tác nhân hương liệu, chất bảo quản, chất chống oxy hóa, các chất làm mờ, các chất làm đặc và chất ổn định. Tuy nhiên, các nguyên liệu đó, khi được thêm vào, không được can thiệp quá mức vào các hoạt tính sinh học của các thành phần chế phẩm theo sáng chế. Các công thức có thể được khử trùng

và, nếu muốn, trộn với các tác nhân phụ trợ, *ví dụ*, chất bôi trơn, chất bảo quản, chất ổn định, chất làm ẩm, chất chuyển thể sữa, muối để tác động đến áp suất thấm lọc, chất đệm, phẩm màu, gia vị và/hoặc chất thơm và các chất giống vậy mà không gây hại đến (các) axit nucleic trong chế phẩm.

Huyền phù trong nước có thể chứa các chất làm tăng độ nhớt của huyền phù bao gồm, ví dụ, natri carboxymetyl xenluloza, sorbitol và/hoặc đextran. Huyền phù còn có thể chứa chất ổn định.

Theo một số phương án, dược phẩm được nêu trong sáng chế bao gồm (a) một hoặc nhiều hợp chất iARN và (b) một hoặc nhiều tác nhân mà hoạt động theo cơ chế không ARNi và hữu dụng trong việc điều trị, ví dụ, PH1.

Thử nghiệm dược phẩm

Độc tính và hiệu quả điều trị của các hợp chất trên có thể được xác định bởi các thủ tục dược tiêu chuẩn trong nuôi cấy tế bào hoặc thực nghiệm trên động vật, *ví dụ*, để xác định LD50 (liều thuốc gây chết người đối với 50% dân số) và ED50 (liều thuốc điều trị hiệu quả đối với 50% dân số). Tỷ lệ liều lượng giữa các hiệu ứng độc hại và điều trị là chỉ số điều trị và nó có thể được thể hiện bằng tỉ lệ LD50/ED50. Các hợp chất mà có chỉ số điều trị cao được ưa thích.

Các dữ liệu thu được từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào và nghiên cứu động vật có thể được dùng để xây dựng một loạt các liều lượng sử dụng cho con người. Liều lượng của các hợp chất được mô tả ở đây trong sáng chế nằm chung trong khoảng nồng độ có ED50 và một chút hoặc không có độc. Liều dùng có thể thay đổi trong phạm vi này phụ thuộc vào công thức liều lượng được sử dụng và con đường sử dụng chúng. Đối với bất kỳ hợp chất nào được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế, liều lượng điều trị hiệu quả có thể được đánh giá ngay từ đầu với các thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Liều dùng có thể được bào chế trong các mô hình động vật để đạt được khoảng nồng độ lưu thông trong huyết tương của hợp chất hoăc, khi thích hợp, của sản phẩm polypeptit của trình tự đích (*ví dụ*, đạt được nồng độ giảm của polypeptit) bao gồm IC_{50} (*tức là*, nồng độ của hợp chất thử nghiệm đạt được triệu chứng ức chế tối đa) như được xác định trong nuôi cấy tế bào. Các thông tin trên có thể sử dụng để xác định chính xác hơn các liều lượng hữu ích cho con người. Mức độ trong huyết tương có thể được đo lường, ví dụ, bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Ngoài việc sử dụng chúng, như thảo luận ở trên, iARN được nêu trong sáng chế có thể được dùng kết hợp với các tác nhân đã biết khác hữu hiệu để điều trị quy trình bệnh lý mà qua trung gian lượng quá tải sắt và có thể được điều trị bằng cách ức chế sự biểu hiện HAO1. Trong bất kỳ trường hợp nào, bác sĩ điều trị có thể điều chỉnh số lượng và thời gian sử dụng ARNi dựa trên các kết quả thu được bằng cách sử dụng các tiêu chuẩn đo lường hiệu quả được biết đến trong lĩnh vực hoặc được mô tả trong tài liệu này.

V. Phương pháp ức chế sự biểu hiện HAO1

Sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự biểu hiện của HAO1 (hyđroxyaxit oxiđaza 1) trong tế bào. Phương pháp này bao gồm bước cho tế bào tiếp xúc với tác nhân ARNi, *ví dụ*, tác nhân ARNi sợi kép, ở lượng hữu hiệu để ức chế sự biểu hiện của HAO1 trong tế bào, bằng cách đó ức chế sự biểu hiện của HAO1 trong tế bào.

Sự tiếp xúc của tế bào với tác nhân ARNi sợi kép có thể được thực hiện *trong ống nghiệm* hoặc *trong cơ thể*. Sự tiếp xúc tế bào *trong cơ thể* với tác nhân ARNi bao gồm việc cho tế bào hoặc nhóm tế bào ở đối tượng, *ví dụ*, đối tượng người, tiếp xúc với tác nhân ARNi. Sự kết hợp của các phương pháp *in vitro* và *in vivo* để cho tiếp xúc cũng có thể được. Sự tiếp xúc có thể là trực tiếp hoặc gián tiếp, như thảo luận ở trên. Hơn nữa, sự tiếp xúc tế bào có thể được hoàn thành thông qua một phối tử nhắm đích, bao gồm bất kỳ phối tử nào được mô tả ở đây hoặc được biết đến trong lĩnh vực. Theo một số phương án, phối tử hướng đích là gốc carbohyđrat, *ví dụ*, phối tử $GalNAc_3$, hoặc phối tử khác bất kỳ mà định hướng tác nhân ARNi đến vị trí quan tâm, *ví dụ*, gan của đối tượng.

Thuật ngữ "ức chế," như được sử dụng ở đây, được sử dụng thay đổi với "làm giảm," "làm câm," "sự điều hòa giảm" và các thuật ngữ tương tự khác, và bao gồm bất kỳ mức độ nào của sự ức chế.

Cụm từ "ức chế sự biểu hiện của HAO1" được dự định là dùng để chỉ sự ức chế của sự biểu hiện của gen HAO1 bất kỳ (chẳng hạn như, *ví dụ*, gen HAO1 ở chuột, gen HAO1 ở chuột nhắt, gen HAO1 ở khỉ, hoặc gen HAO1 ở người) cũng như là các biến thể hoặc các thể đột biến của gen HAO1. Do đó, gen HAO1 có thể là gen HAO1 kiểu dại, gen HAO1 đột biến, hoặc gen HAO1 chuyển gen trong trường hợp tế bào, nhóm tế bào, hoặc sinh vật được thao tác di truyền.

"Ức chế sự biểu hiện của gen HAO1" bao gồm mức độ bất kỳ của sự ức chế của gen HAO1, *ví dụ*, ít nhất sự triệt tiêu một phần của sự biểu hiện của gen HAO1. Sự biểu hiện của gen HAO1 có thể được đánh giá dựa trên mức độ, hoặc sự thay đổi trong mức độ, của biến thể bất kỳ kết hợp vớisự biểu hiện gen HAO1, *ví dụ*, hàm lượng mARN HAO1, hàm lượng protein HAO1. Mức độ này có thể được đánh giá trong một tế bào riêng biệt hoặc trong một nhóm tế bào, bao gồm, ví dụ, một mẫu thử được lấy từ đối tượng.

Sự ức chế có thể được đánh giá bằng sự giảm đi của hàm lượng tuyệt đối hoặc tương đối của một hoặc nhiều biến thể mà kết hợp với sự biểu hiện HAO1 so với mức độ đối chứng. Mức độ kiểm soát có thể là bất kỳ loại nào của mức độ kiểm soát được sử dụng trong lĩnh vực, *ví dụ*, một mức cơ bản trước khi dùng thuốc, hoặc mức được xác định từ đối tượng, tế bào tương tự, hoặc mẫu chưa được xử lý hoặc được xử lý với kiểm soát (như, *ví dụ* chỉ kiểm soát đệm hoặc kiểm soát tác nhân bất hoạt.

Theo một số phương án của phương pháp theo sáng chế, sự biểu hiện của gen HAO1 bị ức chế bằng ít nhất là khoảng 5%, ít nhất là khoảng 10%, ít nhất là khoảng 15%, ít nhất là khoảng 20%, ít nhất là khoảng 25%, ít nhất là khoảng 30%, ít nhất là khoảng 35%, ít nhất là khoảng 40%, ít nhất là khoảng 45%, ít nhất là khoảng 50%, ít nhất là khoảng 55%, ít nhất là khoảng 60%, ít nhất là khoảng 65%, ít nhất là khoảng 70%, ít nhất là khoảng 75%, ít nhất là khoảng 80%, ít nhất là khoảng 85%, ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%. ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, hoặc ít nhất là khoảng 99%.

Sự ức chế của sự biểu hiện của gen HAO1 có thể được biểu thị bằng sự giảm đi của hàm lượng của mARN được biểu hiện bởi tế bào hoặc nhóm tế bào thứ nhất (tế bào này có thể có mặt, ví dụ, trong mẫu có nguồn gốc từ đối tượng) trong đó gen HAO1 được phiên mã và được xử lý (*ví dụ*, bằng cách cho tế bào hoặc các tế bào tiếp xúc với tác nhân ARNi theo sáng chế, hoặc bằng cách dùng tác nhân ARNi theo sáng chế cho đối tượng trong đó tế bào này có mặt) sao cho sự biểu hiện của gen HAO1 bị ức chế, khi so với tế bào hoặc nhóm tế bào thứ hai về cơ bản giống với tế bào hoặc nhóm tế bào thứ nhất but mà không được xử lý như vậy ((các) tế bào đối chứng). Theo một số phương án, sự ức chế được đánh giá bằng cách biểu diễn hàm lượng của mARN trong tế bào được xử lý dưới dạng tỷ lệ phần trăm của hàm lượng của mARN trong tế bào đối chứng, bằng cách sử dụng công thức sau đây:

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

Theo cách khác, sự ức chế của sự biểu hiện của gen HAO1 có thể được đánh giá trong mối quan hệ với sự giảm đi của tham số mà có liên kết về mặt chức năng với sự biểu hiện gen HAO1, *ví dụ*, sự biểu hiện protein HAO1. Việc làm câm gen HAO1 có thể được xác định trong tế bào bất kỳ có biểu hiện HAO1, về mặt cấu trúc hoặc bằng cách thiết kế hệ gen, và bằng thử nghiệm bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Gan là vị trí chính của sự biểu hiện HAO1. Các nơi khác mà gen HAO1 cũng biểu hiện đáng kể là thận và dạ con.

Sự ức chế của sự biểu hiện của protein HAO1 có thể được biểu thị bằng sự giảm đi của hàm lượng của protein HAO1 mà được biểu hiện bởi tế bào hoặc nhóm tế bào (*ví dụ*, hàm lượng của protein được biểu hiện trong mẫu có nguồn gốc từ đối tượng). Như đã giải thích ở trên đối với sự đánh giá của sự triệt tiêu mARN, sự ức chế của mức độ biểu hiện protein ở tế bào hoặc nhóm tế bào được xử lý được biểu diễn một cách tương tự dưới dạng tỷ lệ phần trăm của hàm lượng của protein ở tế bào hoặc nhóm tế bào đối chứng.

Tế bào hoặc nhóm tế bào đối chứng mà có thể được sử dụng để đánh giá sự ức chế của sự biểu hiện của gen HAO1 bao gồm tế bào hoặc nhóm tế bào mà chưa được tiếp xúc với tác nhân ARNi theo sáng chế. Ví dụ, tế bào hoặc nhóm tế bào điều khiển có thể được lấy từ từng đối tượng (*ví dụ*, đối tượng là người hoặc động vật) trước khi điều trị cho đối tượng bằng một tác nhân ARNi.

Hàm lượng của mARN HAO1 mà được biểu hiện bởi tế bào hoặc nhóm tế bào có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực để đánh giá sự biểu hiện mARN. Theo một phương án, mức độ của sự biểu hiện của HAO1 trong mẫu được xác định bằng cách phát hiện polynucleotit được phiên mã, hoặc một phần của chúng, *ví dụ,* mARN của gen HAO1. ARN có thể được chiết xuất từ các tế bào bằng cách sử dụng kỹ thuật chiết xuất ARN bao gồm, ví dụ, sử dụng chiết xuất axit phenol/guaniđin isotioxyanat (RNAzol B; Biogenesis), bộ kit điều chế ARN RNeasy (Qiagen) hoặc PAXgene (PreAnalytix, Thụy Sĩ). Các dạng thử nghiệm điển hình sử dụng sự lai hóa axit ribonucleic bao gồm thử nghiệm chạy nhân, RT-PCR, thử nghiệm bảo vệ ARNaza (Melton *và cộng sự.*, *Nuc. Acids Res.* 12:7035), thẩm tách Northern, sự lai hóa *in situ*, và phân tích vi mảng.

Theo một phương án, mức độ của sự biểu hiện của HAO1 được xác định bằng cách sử dụng đoạn dò axit nucleic. Thuật ngữ "đoạn dò", như được dùng trong bản mô tả này, dùng để chỉ phân tử bất kỳ mà có khả năng liên kết có chọn lọc với HAO1 cụ thể. Đoạn dò có thể được tổng hợp bằng một trong các kỹ năng trong lĩnh vực, hoặc có từ các chế phẩm sinh học thích hợp. Các đoạn dò có thể được cấu tạo đặc biệt để được gắn nhãn. Các ví dụ về các phân tử có thể được sử dụng như đoạn dò, bao gồm nhưng không giới hạn ARN, ADN, protein, các kháng thể, và các phân tử hữu cơ.

Sự phân lập mARN có thể được sử dụng trong các thử nghiệm lai tạo hoặc khuếch đại nhưng không giới hạn ở các phân tích Southern hoặc Northern, phân tích phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và mảng đầu dò. Phương pháp khác để xác định hàm lượng mARN bao gồm bước cho mARN đã được phân lập tiếp xúc với phân tử axit nucleic (đoạn dò) mà có thể lai hóa với mARN HAO1. Theo một phương án, mARN được giữ cố định trên một mặt phẳng rắn và tiếp xúc với một đoạn dò, ví dụ bằng cách chạy mARN được phân lập trên gel agaroza và chuyển mARN từ chất gel đó tới màng, như nitroxenluloza. Trong một phương án khác, (các) đoạn dò được gắn cố định trên một mặt phẳng rắn và mARN được tiếp xúc với (các) đoạn dò, ví dụ, trong gen chip Affymetrix. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng điều chỉnh phương pháp phát hiện mARN đã biết để sử dụng trong việc xác định hàm lượng của mARN HAO1.

Phương pháp khác để xác định mức độ của sự biểu hiện của HAO1 trong mẫu bao gồm quy trình khuếch đại axit nucleic và/hoặc transcriptaza ngược (để điều chế cADN) của ví dụ như mARN trong mẫu, *ví dụ*, bằng RT-PCR (phương án thí nghiệm nêu trong Mullis, 1987, Sáng chế Mỹ số. 4,683,202), phản ứng chuỗi ligaza (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), sự sao chép trình tự tự duy trì (Guatelli và cộng sự. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), hệ thống khuếch đại phiên mã (Kwoh *và cộng sự.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicaza (Lizardi *và cộng sự.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), sự sao chép vòng lăn (Lizardi và cộng sự., Sáng chế Mỹ số. 5,854,033) hoặc phương pháp khuếch đại axit nucleic khác bất kỳ, sau đó là sự phát hiện của phân tử được khuếch đại bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Các sơ đồ phát hiện này đặc biệt hữu dụng cho việc phát hiện các phân tử axit nucleic nếu các phân tử đo xuất hiện với số lượng rất ít. Theo khía

cạnh cụ thể của sáng chế, mức độ của sự biểu hiện của HAO1 được xác định bằng RT-PCR phát huỳnh quang định lượng (*tức là*, Hệ thống TaqMan™).

Mức độ biểu hiện của mARN HAO1 có thể được theo dõi bằng cahcs sử dụng thẩm tách màng chẳng hạn như dùng trong phân tích lai hóa chẳng hạn như Northern, Southern, vẽ chấm, và phương pháp tương tự), hoặc vi giếng, ống mẫu, gel, hạt hoặc sợi (hoặc giá đỡ rắn bất kỳ có chứa axit nucleic được liên kết). Xem Sáng chế Mỹ Số. 5,770,722, 5,874,219, 5,744,305, 5,677,195 và 5,445,934, được kết hợp ở đây để tham khảo. Việc xác định mức độ biểu hiện HAO1 cũng có thể bao gồm việc sử dụng đoạn dò axit nucleic trong dung dịch.

Theo một số phương án, mức độ của sự biểu hiện mARN được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm ADN phân nhánh (bADN) hoặc PCR thời gian thực (qPCR). Sử dụng phương pháp được mô tả và lấy ví dụ trong các Ví dụ ở đây.

Mức độ biểu hiện protein HAO1 có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực để đo hàm lượng protein. Các phương pháp đó bao gồm, ví dụ, hiện tượng điện chuyển, mao mạch điện, chất lỏng sắc ký hiệu suất cao (HPLC), lớp mỏng sắc ký (TLC), sắc ký siêu khuếch tán, các phản ứng chất lỏng hoặc gel, hấp thụ quang phổ, thử nghiệm đo màu, thử nghiệm quang phổ, đo dòng tế bào, khuếch tán miễn dịch (đơn hoặc đôi), phản ứng miễn dịch điện di, phương pháp Western blot, miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm miễn dịch enzym liên kết (ELISA), thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, thử nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang, và tương tự.

Thuật ngữ “mẫu thử” như được sử dụng ở đây đề cập đến tập hợp các chất lỏng, tế bào hoặc mô tương tự nhau được phân lập khỏi đối tượng cũng như các chất lỏng, các tế bào hoặc mô hiện ở trên đối tượng. Ví dụ về chất lỏng sinh học bao gồm máu, huyết thanh và nước ối, huyết tương, bạch huyết, nước tiểu, dịch não tủy, nước bọt, tuyến lệ, và tương tự. Mẫu mô có thể bao gồm mẫu từ các mẫu mô, bộ phận hoặc các vùng được chọn. Ví dụ, các mẫu thử có thể được lấy từ các bộ phận đặc biệt, một phần của các bộ phận đó, hoặc chất lỏng hoặc các tế bào của các bộ phận đó. Trong một số phương án nhất định, các mẫu thử có thể được lấy từ gan (ví dụ, toàn bộ gan hoặc một số đoạn của gan hoặc một số loại tế bào trong gan, như, ví dụ, tế bào gan). Theo một số phương án, "mẫu có nguồn gốc từ đối tượng" dùng để chỉ máu hoặc huyết tương được rút ra từ đối tượng. Ở các phương án khác, một “mẫu thử lấy từ đối tượng” có nghĩa là lấy mô gan từ đối tượng.

Theo một số phương án của phương pháp theo sáng chế, tác nhân iARN được sử dụng cho đối tượng như tác nhân ARNi được đưa đến một nơi đặc biệt của đối tượng. Sự ức chế của sự biểu hiện của HAO1 có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phép đo của hàm lượng hoặc sự thay đổi trong hàm lượng của mARN HAO1 hoặc protein HAO1 trong mẫu có nguồn gốc từ dịch hoặc mô từ vị trí cụ thể ở đối tượng. Theo một số phương án, vị trí này là gan. Nơi được chọn cũng có thể là tiểu khu hoặc tiểu nhóm tế bào từ bất kỳ nơi nào nằm trong các nơi đã được nhắc đến ở trên. Nơi được chọn cũng có thể bao gồm các tế bào thể hiện loại thụ thể đặc biệt.

VI. Phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn có kết hợp với HAO1

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh và tình trạng bệnh mà có thể được điều biến bởi sự biểu hiện gen HAO1. Ví dụ, hợp phần được mô tả trong bản mô tả này có thể được dùng để điều trị rối loạn bất kỳ kết hợp với PH1.

Hiệu quả của điều trị hoặc phòng ngừa bệnh có thể được đánh giá, ví dụ bằng cách đo sự tiến triển của bệnh, sự thuyên giảm của bệnh, mức độ nghiêm trọng của triệu chứng, sự giảm đau, chất lượng cuộc sống, liều thuốc cần thiết để duy trì hiệu quả điều tri, mức độ của chất đánh dấu bệnh hoặc thông số có thể đo thích hợp cho bệnh đang được điều trị hoặc đang được hướng đến để phòng ngừa. Điều này là đơn giản trong khả năng của một người có trình độ trong lĩnh vực để theo dõi hiệu quả của việc điều trị hoặc ngăn ngừa bằng việc đo các thông số đó, hoặc bất kỳ sự kết hợp của các thông số.

Hiệu quả điều trị hoặc phòng ngừa là điều hiển nhiên khi có sự cải thiện có ý nghĩa thống kê về một hoặc nhiều tham số về tình trạng bệnh, hoặc bởi sự thất bại dẫn đến tình trạng trở nên tồi tệ hơn hoặc phát triển các triệu chứng ở nơi mà chúng không được lường trước. Ví dụ, sự thay đổi tốt ít nhất 10% ở tham số đo được của bệnh, và tốt hơn là ít nhất 20%, 30%, 40%, 50% hoặc hơn có thể được chỉ định cho điều trị hiệu quả. Sự hiệu quả của thuốc cho ARNi hoặc công thức của thuốc đó còn có thể được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình động vật thử nghiệm đối với bệnh được biết đến trong lĩnh vực. Khi sử dụng mô hình động vật thử nghiệm, hiệu quả điều trị đươc chứng minh khi có sự giảm có ý nghĩa thống kê ở chất đánh dấu hoặc triệu chứng được quan sát thấy.

Theo cách khác, hiệu quả này có thể được đo bằng sự giảm độ trầm trọng của bệnh như được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực chẩn đoán dựa trên thang điểm độ trầm trọng của bệnh chấp nhận được về mặt lâm sàng.

Theo một số phương án của phương pháp theo sáng chế, sự biểu hiện HAO1 được giảm đi trong khoảng thời gian kéo dài, *ví dụ*, ít nhất một tuần, hai tuần, ba tuần, hoặc bốn tuần hoặc lâu hơn. Ví dụ, trong các trường hợp nhất định, sự biểu hiện của gen HAO1 bị triệt tiêu đi ít nhất là khoảng 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, hoặc 100% bằng cách sử dụng tác nhân iARN được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, gen HAO1 bị triệt tiêu đi ít nhất là khoảng 60%, 70%, hoặc 80% bằng cách sử dụng tác nhân iARN. Theo một số phương án, gen HAO1 bị triệt tiêu đi ít nhất là khoảng 85%, 90%, hoặc 95% bằng cách sử dụng oligonucleotit mạch kép. Theo phương án khác, gen HAO1 vẫn bị triệt tiêu trong 7 ngày, 10 ngày, 20 ngày, 30 ngày, hoặc lâu hơn sau khi sử dụng.

Sử dụng

Các tác nhân ARNi theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng bằng cách sử dụng đường dùng bất kỳ được biết trong lĩnh vực này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở dưới da, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong lòng mạch, trong cuống phổi, trong màng phổi, trong màng bụng, trong động mạch, bạch huyết, não tủy và dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Theo một số phương án, các tác nhân được dùng dưới da.

Theo một số phương án, việc dùng này là qua đường tiêm vào bể chứa. Việc tiêm vào bể chứa có thể giải phóng tác nhân ARNi theo cách đồng nhất qua một thời gian kéo dài. Do đó, việc tiêm vào bể chứa có thể làm giảm tần suất dùng liều lượng cần để đạt được hiệu quả mong muốn, *ví dụ*, sự ức chế mong muốn của HAO1, hoặc hiệu quả trị liệu hoặc dự phòng. Một mũi tiêm cũng có thể cung cấp huyết thanh nồng độ cao. Các mũi tiêm có thể bao gồm tiêm dưới da hoặc tiêm vào cơ. Theo một số phương án, việc tiêm vào bể chứa là tiêm dưới da.

Theo một số phương án, việc dùng này là qua bơm. Bơm có thể là bơm bên ngoài hoặc bơm được phẫu thuật cấy ghép. Trong một số phương án nhất định, bơm là loại bơm thẩm thấu được cấy dưới da. Trong các phương án khác, bơm là loại máy bơm truyền dịch. Bơm có thể được sử dụng để tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, động mạch hoặc tiêm truyền

ngoài màng cứng. Theo một số phương án, bơm truyền là bơm truyền dưới da. Theo các phương án khác, bơm này là bơm được cấy thông qua phẫu thuật phân phối tác nhân ARNi đến gan.

Các cách sử dụng khác bao gồm ngoài màng cứng, trong não, trong não thất, sử dụng trong mũi, trong động mạch, trong tim, truyền trong xương, nội tủy mạch, và trong thủy tinh thể, và phổi. Các chế độ sử dụng có thể được chọn dựa trên việc điều trị cục bộ hay toàn thân là mong muốn hay dựa trên vùng được điều trị nào. Lộ trình và vị trí của việc sử dụng có thể được chọn để tăng việc nhắm mục tiêu.

Phương pháp này bao gồm bước sử dụng tác nhân iARN, *ví dụ*, liều lượng đủ để làm giảm hàm lượng của mARN HAO1 trong ít nhất 5, nhiều tốt hơn là 7, 10, 14, 21, 25, 30 hoặc 40 ngày; và một cách tùy ý, sử dụng liều lượng đơn lẻ thứ hai của dsARN, trong đó liều lượng đơn lẻ thứ hai này được dùng ít nhất 5, nhiều tốt hơn là 7, 10, 14, 21, 25, 30 hoặc 40 ngày sau khi liều lượng đơn lẻ thứ nhất được dùng, bằng cách đó ức chế sự biểu hiện của gen HAO1 ở đối tượng.

Theo một phương án, các liều lượng tác nhân iARN theo sáng chế được dùng không nhiều hơn một lần mỗi bốn tuần, không nhiều hơn một lần mỗi bốn tuần, không nhiều hơn một lần mỗi ba tuần, không nhiều hơn một lần mỗi hai tuần, hoặc không nhiều hơn một lần mỗi tuần. Theo phương án khác, việc sử dụng này có thể được duy trì trong một, hai, ba hoặc sáu tháng, hoặc một năm hoặc lâu hơn. Theo một phương án khác, các liều lượng tác nhân iARN theo sáng chế được dùng một tuần một lần trong ba tuần.

Nhìn chung, tác nhân iARN không hoạt hóa hệ miễn dịch, *ví dụ*, không làm tăng mức xytokin, như mức TNF-alpha hoặc IFN-alpha. Ví dụ, khi được đo bằng thử nghiệm, chẳng hạn như thử nghiệm PBMC in vitro, chẳng hạn như được mô tả trong bản mô tả này, sự tăng lên của hàm lượng TNF-alpha hoặc IFN-alpha, nhỏ hơn 30%, 20%, hoặc 10% của tế bào đối chứng được điều trị bằng dsARN đối chứng, chẳng hạn như dsARN mà không hướng đích HAO1.

Ví dụ, đối tượng có thể được dùng lượng chữa bệnh của tác nhân iARN, như 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, hoặc 3 mg/kg dsARN. Tác nhân iARN có thể được sử dụng qua đường truyền trong mạch trong khoảng thời gian, như trong khoảng thời gian 5 phút, 10 phút, 15 phút, 20 phút, hoặc 25 phút. Việc dùng lặp lại, ví

dụ, một cách thường xuyên, như hàng hai tuần (*tức là*, mỗi hai tuần) trong một tháng, hai tháng, ba tháng, bốn tháng hoặc lâu hơn. Sau chế độ dùng liều bắt đầu, việc điều trị có thể được dùng trên cơ sở ít thường xuyên hơn. Ví dụ, sau khi dùng mỗi hai tuần trong ba tháng, có thể lặp lại việc sử dụng mỗi tháng một lần, trong sáu tháng hoặc một năm hoặc lâu hơn. Việc sử dụng tác nhân iARN có thể làm giảm hàm lượng HAO1, *ví dụ*, trong tế bào, mô, máu, nước tiểu hoặc khoang khác của bệnh nhân đi ít nhất 10%, ít nhất 15%, ít nhất 20%, ít nhất 25%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80 % hoặc ít nhất 90% hoặc nhiều hơn.

Trước khi dùng liều đầy đủ của tác nhân iARN, bệnh nhân có thể được dùng liều nhỏ hơn, như liều dẫn đến phản ứng truyền nhỏ hơn 5%, và được theo dõi về tác dụng không mong muốn, như phản ứng dị ứng, hoặc về các mức lipit tăng cao hoặc huyết áp. Trong ví dụ khác, bệnh nhân có thể được theo dõi tác dụng kích thích miễn dịch không mong muốn, như gia tăng hàm lượng xytokin (*ví dụ*, TNF-alpha hoặc INF-alpha).

Bệnh nhân cần tác nhân ARNi HAO1 có thể được nhận dạng bằng cách xem xét tiền sử gia đình. Người chăm sóc sức khỏe, chẳng hạn như bác sĩ, y tá, hoặc thành viên gia đình, có thể xem xét tiền sử gia đình trước khi kê đơn hoặc sử dụng dsARN HAO1. Thử nghiệm ADN cũng có thể được tiến hành trên bệnh nhân để xác định sự đột biến trong gen AGT1, trước khi dùng tác nhân ARNi HAO1 cho bệnh nhân. Sự chẩn đoán PH1 có thể được xác nhận bằng thử nghiệm bất kỳ đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Hiệu quả điều trị hoặc phòng ngừa là điều hiển nhiên khi có sự cải thiện có ý nghĩa thống kê về một hoặc nhiều tham số về tình trạng bệnh, hoặc bởi sự thất bại dẫn đến tình trạng trở nên tồi tệ hơn hoặc phát triển các triệu chứng ở nơi mà chúng không được lường trước. Ví dụ, sự thay đổi tốt ít nhất 10% ở tham số đo được của bệnh, và tốt hơn là ít nhất 20%, 30%, 40%, 50% hoặc hơn có thể được chỉ định cho điều trị hiệu quả. Hiệu quả đối với tác nhân iARN theo sáng chế hoặc chế phẩm tác nhân iARN được đưa ra cũng có thể được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình động vật thử nghiệm đối với bệnh đưa ra đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Khi sử dụng mô hình động vật thử nghiệm, hiệu quả điều trị đươc chứng minh khi có sự giảm có ý nghĩa thống kê ở chất đánh dấu hoặc triệu chứng được quan sát thấy.

Liều lượng của tác nhân ARNi mà được dùng cho đối tượng có thể được điều chỉnh để làm cho cân bằng nguy cơ và lợi ích của liều lượng cụ thể, ví dụ, để đạt được mức độ mong muốn của sự triệt tiêu gen HAO1 (như được đánh giá, *ví dụ*, dựa trên sự triệt tiêu mARN HAO1, sự biểu hiện protein HAO1, hoặc sự giảm hàm lượng oxalat) hoặc hiệu quả trị liệu hoặc phòng ngừa mong muốn, cùng lúc đó tránh được các tác dụng phụ không mong muốn.

Theo một số phương án, tác nhân ARNi được dùng thành hai liều hoặc nhiều hơn. Nếu muốn để tạo thuận lợi cho việc truyền lặp lại hoặc thường xuyên, việc cấy thiết bị phân phối, *ví dụ*, bơm, ống dẫn bán vĩnh viễn (*ví dụ*, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong bể lớn hoặc trong bao), hoặc bể chứa có thể thích hợp. Theo một số phương án, số lượng hoặc hàm lượng của liều lượng tiếp theo phụ thuộc vào sự đạt được hiệu quả mong muốn, *ví dụ*, sự triệt tiêu của gen HAO1, hoặc sự đạt được hiệu quả trị liệu hoặc dự phòng, *ví dụ*, làm giảm sự quá tải sắt. Theo một số phương án, tác nhân ARNi được dùng theo lịch biểu. Ví dụ, tác nhân ARNi có thể được dùng mỗi tuần một lần, mỗi tuần hai lần, ba lần mỗi tuần, bốn lần mỗi tuần, hoặc năm lần mỗi tuần. Theo một số phương án, phát đồ này bao gồm các lần dùng cách đều, *ví dụ*, hàng giờ, mỗi bốn giờ, mỗi sáu giờ, mỗi tám giờ, mỗi mười hai giờ, hàng ngày, mỗi 2 ngày, mỗi 3 ngày, mỗi 4 ngày, mỗi 5 ngày, hàng tuần, hàng hai tuần hoặc hàng tháng. Theo các phương án khác, lịch biểu này gồm các lần sử dụng cách gần nhau, sau đó là khoảng cách thời gian lâu hơn không dùng tác nhân này. Ví dụ, lịch trình này có thể bao gồm nhóm liều ban đầu mà được dùng trong khoảng thời gian tương đối ngắn (*ví dụ*, khoảng mỗi 6 giờ, khoảng mỗi 12 giờ, khoảng mỗi 24 giờ, khoảng mỗi 48 giờ, hoặc khoảng mỗi 72 giờ) tiếp theo là khoảng thời gian lâu hơn (*ví dụ*, khoảng 1 tuần, khoảng 2 tuần, khoảng 3 tuần, khoảng 4 tuần, khoảng 5 tuần, khoảng 6 tuần, khoảng 7 tuần, hoặc khoảng 8 tuần) trong thời gian đó tác nhân ARNi không được dùng. Theo một phương án, tác nhân ARNi ban đầu được dùng mỗi giờ và sau đó được dùng ở khoảng cách lâu hơn (*ví dụ*, hàng ngày, hàng tuần, hai tuần, hoặc hàng tháng). Theo một phương án khác, tác nhân ARNi ban đầu được dùng hàng ngày và sau đó được dùng ở khoảng cách lâu hơn (*ví dụ*, hàng tuần, hai tuần, hoặc hàng tháng). Theo một số phương án, việc gia tăng khoảng cách lâu hơn theo thời gian hoặc được xác định dựa trên việc đạt được tác dụng mong muốn. Theo phương án cụ thể, tác nhân ARNi được dùng một lần hàng ngày trong tuần đầu tiên, sau đó dùng liều hàng tuần bắt đầu vào ngày dùng thứ tám. Theo phương án cụ thể

khác, tác nhân ARNi được dùng mỗi ngày khác trong tuần đầu tiên, sau đó dùng liều hàng tuần bắt đầu vào ngày dùng thứ tám.

Theo một số phương án, tác nhân ARNi được dùng theo chế độ liều lượng mà bao gồm "pha tải" của các lần dùng khoảng cách gần nhau mà có thể được theo dõi bằng "pha duy trì", trong đó tác nhân ARNi được dùng ở các khoảng thời gian cách nhau lâu hơn. Theo một phương án, giai đoạn tải gồm năm lần dùng hàng ngày của tác nhân ARNi trong tuần đầu tiên. Theo phương án khác, giai đoạn duy trì gồm một hoặc hai lần dùng hàng tuần của tác nhân ARNi. Theo phương án nữa, giai đoạn duy trì kéo dài 5 tuần.

Lịch biểu bất kỳ trong số các lịch biểu này có thể tùy ý được lặp lại một hoặc nhiều lần lặp lại. Số lượng bước lặp có thể phụ thuộc vào sự đạt được hiệu quả mong muốn, *ví dụ*, sự triệt tiêu của gen HAO1, và/hoặc sự đạt được hiệu quả trị liệu hoặc dự phòng, *ví dụ*, làm giảm hàm lượng oxalat hoặc làm giảm triệu chứng của PH1.

Theo một khía cạnh khác, các dấu hiệu của sáng chế, phương pháp hướng dẫn người sử dụng cuối, *ví dụ*, điều dưỡng viên hoặc đối tượng, về cách dùng tác nhân iARN được mô tả ở đây. Phương pháp này bao gồm, tùy ý, cung cấp cho người dùng cuối một hoặc nhiều liều của tác nhân iARN, và chỉ định cho người dùng cuối dùng tác nhân iARN theo phác đồ được mô tả ở đây, do đó chỉ định cho người dùng cuối.

VII. Bộ kit

Sáng chế cũng đề xuất bộ kit để sử dụng tác nhân iARN bất kỳ và/hoặc thực hiện phương pháp bất kỳ theo sáng chế. Các bộ kit bao gồm một hoặc nhiều tác nhân ARNi và hướng dẫn sử dụng, *ví dụ*, hướng dẫn để ức chế sự biểu hiện của HAO1 trong tế bào bằng cách cho tế bào tiếp xúc với (các) tác nhân ARNi ở lượng hữu hiệu để ức chế sự biểu hiện của HAO1. Bộ kit có thể tùy ý có chứa thêm phương tiện để làm tế bào tiếp xúc với tác nhân ARNi (*ví dụ*, dụng cụ tiêm), hoặc phương tiện để đo sự ức chế của HAO1 (*ví dụ*, phương tiện để đo sự ức chế của mARN HAO1 hoặc protein). Phương tiện để đo sự ức chế của HAO1 này có thể có chứa phương tiện để thu mẫu từ đối tượng, chẳng hạn như, *ví dụ*, mẫu huyết tương. Bộ kit theo sáng chế có thể tùy ý còn chứa các phương tiện để sử dụng (các) tác nhân ARNi cho đối tượng hoặc phương tiện để xác định lượng có hiệu quả điều trị bệnh hoặc lượng có hiệu quả phòng bệnh.

VII. Chất đánh dấu chẩn đoán đối với PH1 và các tình trạng bệnh liên quan

Cũng được mô tả trong bản mô tả này là chất đánh dấu và phương pháp chẩn đoán của tình trạng bệnh gây ra bởi sự sản xuất quá mức oxalat, cụ thể là PH1 và các tình trạng bệnh liên quan, cũng như là với các tác nhân để điều trị các tình trạng bệnh này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị tình trạng bệnh PH1 ở đối tượng (bệnh tạo sỏi, đặc biệt là PH1). Phương pháp chẩn đoán này bao gồm các bước: (a) phá vỡ sự biểu hiện HAO1 ở đối tượng (b) thu lấy huyết thanh sinh học từ đối tượng này; và (b) xác định hàm lượng của glycolat trong huyết thanh này. Cần hiểu rõ rằng hàm lượng tăng lên của glycolat trong huyết thanh, so với đối chứng âm, cho thấy sự ức chế của enzym glycolat oxiđaza giúp ngăn ngừa sự sản xuất oxalat gây ra bởi tình trạng bệnh PH1.

Theo một phương án, được mô tả trong bản mô tả này là bộ kit để chẩn đoán tình trạng bệnh PH1, bộ kit này bao gồm các thành phần sau: (a) tác nhân để xác định sự có mặt của chất phân tích quan tâm trong huyết thanh, trong đó chất phân tích quan tâm này là một trong số các glycolat; và (b) phương tiện định cỡ. Ví dụ, chất phân tích quan tâm này là glycolat, tác nhân này là siARN hướng đích HAO1.

Trừ khi được định nghĩa, mọi thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong tài liệu này có nghĩa tương tự như cách hiểu chung thông thường của người có kỹ năng bình thường trong lĩnh vực của sáng chế này. Mặc dù các phương pháp và nguyên liệu giống hoặc tương đương với các gì được mô tả ở tài liệu này có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm sARNi và các phương pháp đặc trưng theo sáng chế, các phương pháp và nguyên liệu thích hợp vẫn được mô tả dưới đây. Tất cả các ấn phẩm, các ứng dụng bằng sáng chế, bằng sáng chế và các tài liệu tham khảo khác được nhắc đến ở đây được kết hợp vào đây chỉ để tham khảo. Trong trường hợp xung đột, các đặc điểm kỹ thuật hiện tại, bao gồm cả định nghĩa sẽ được sử dụng. Ngoài ra, nguyên liệu, phương pháp, và ví dụ chỉ dùng để minh họa và không phải để hạn chế.

CÁC VÍ DỤ

Nguyên liệu và phương pháp

Các nguyên liệu và phương pháp sau được sử dụng trong các Ví dụ. Như được dùng trong bản mô tả này, "HAO" và "GO" được sử dụng thay thế lẫn nhau.

Tổng hợp siARN

ARN sợi đơn được sản xuất bằng cách tổng hợp pha rắn trên thang chia độ 1 μmol sử dụng thiết bị tổng hợp Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darm-stadt, Đức) và thủy tinh lỗ có kiểm soát (CPG, 500Å, Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Đức) làm giá đỡ rắn. ARN và ARN chứa 2'-O-metyl nucleotit được tạo ra bằng cách tổng hợp pha rắn sử dụng lần lượt phosphoramiđit và 2'-O-metyl phos-phoramiđit tương ứng (Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Đức). Các khối xây dựng này được kết hợp ở các vị trí chọn lọc trong trình tự của chuỗi oligoribonucleotit sử dụng hóa học nucleosit phosphoramiđit tiêu chuẩn như được mô tả trong tài liệu Current protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S.L. và cộng sự. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA. Liên kết phosphorothioat được đưa vào bằng cách thay thế dung dịch chất oxy hóa iot bằng dung dịch của Chất phản ứng Beaucage (Chruachem Ltd, Glasgow, Anh) trong axetonitril (1%). Chất phản ứng phụ khác được thu từ hãng Mallinckrodt Baker (Griesheim, Đức).

Sự khử bảo vệ và sự tinh chế của oligoribonucleotit thô bằng HPLC trao đổi anion được thực hiện theo các quy trình đã được thiết lập. Hiệu suất và nồng độ được xác định bởi sự hấp thụ UV của dung dịch của ARN tương ứng ở chiều dài bước sóng bằng 260 nm bằng cách sử dụng quang phổ kế (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim, Đức).

ARN sợi kép được tạo ra bằng cách trộn dung dịch đẳng mol của các sợi bổ sung trong đệm ủ (20 mM natri phosphat, độ pH 6,8; 100 mM natri clorua), được gia nhiệt trong bể nước ở nhiệt độ 85 - 90°C trong thời gian 3 phút và để nguội xuống nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 3 - 4 giờ. Dung dịch ARN đã được ủ được lưu trữ ở nhiệt độ –20 °C đến khi sử dụng.

Trong một số trường hợp, cặp đôi (dsARN) được tổng hợp nhiều hơn một lần. Các mẻ khác nhau được gắn nhãn bằng các phần kéo dài khác nhau. Ví dụ, AD-62933.1 và AD-62933.2 là các mẻ khác nhau của cùng một cặp đôi.

Nuôi cấy và sự được biến nạp tế bào

Tế bào gan khỉ Cynomolgus sơ cấp (PCH) và tế bào gan chuột sơ cấp (PMH) được sử dụng. PCH (Celsis # M003055, lô CBT) hoặc PMH (mới được phân lập) được chuyển nạp bằng cách bổ sung 14,8µl Opti-MEM cộng với 0,2µl Lipofectamin ARNiMax trong mỗi giếng (Invitrogen, Carlsbad CA. cat # 13778-150) vào 5µl cặp đôi siARN trong mỗi giếng vào đĩa 96 giếng và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15 phút. 80µl môi trường InVitroGRO CP Chuột nhắt (InVitro Technologies) chứa ~2 x10^4 tế bào PCH hoặc PMH sau đó được bổ sung vào hỗn hợp siARN. Tế bào được ủ trong 24 giờ trước khi tinh chế ARN. Các thí nghiệm liều lượng đơn lẻ được thực hiện ở nồng độ cặp đôi cuối cùng 10 hoặc 20 nM và 0,1 hoặc 0,2 nM và các thí nghiệm đáp ứng liều lượng được thực hiện trong khoảng liều lượng của nồng độ cặp đôi cuối cùng từ 10 nM đến 36 fM qua các dịch pha loãng 8, 6 lần.

Phân lập ARN tổng số

ARN tổng số được phân lập bằng cách sử dụng bộ kit phân lập mARN DYNABEADS (Invitrogen, phần #: 610-12). Các tế bào được thu hoạch và được làm tan trong 150µl Chất đệm Làm tan/Liên kết sau đó được trộn trong thời gian 5 phút ở tốc độ 850 vòng/phút bằng cách sử dụng thiết bị trộn gia nhiệt Eppendorf (tốc độ trộn ổn định trong suốt quy trình). Mười microlít hạt từ tính và 80µl hỗn hợp Chất đệm Làm tan/Liên kết được bổ sung vào đĩa đáy tròn và được trộn trong thời gian 1 phút. Các hạt từ tính được giữ lại bằng cách sử dụng bệ từ tính và dịch nổi được loại bỏ mà không ảnh hưởng đến các hạt. Sau khi loại bỏ dịch nổi bề mặt, tế bào đã được làm tan được bổ sung vào các hạt còn lại và được trộn trong thời gian 5 phút. Sau khi loại bỏ dịch nổi bề mặt, hạt từ tính được rửa 2 lần bằng 150µl Chất đệm Rửa A và được trộn trong thời gian 1 phút. Các hạt được lại bắt giữ và loại bỏ phần nổi. Sau đó các hạt được rửa bằng 150µl Chất đệm Rửa B, được bắt giữ và dịch nổi bề mặt được loại bỏ. Tiếp theo các hạt được rửa bằng 150µl Chất đệm Rửa giải, được bắt giữ và dịch nổi bề mặt được loại bỏ. Sau đó, hạt được để khô trong 2 phút. Sau khi

để khô, 50µl Chất đệm Rửa giải được bổ sung và được trộn trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 70°C. Các hạt được bắt giữ trên nam châm trong thời gian 5 phút. 40µl dịch nổi bề mặt được loại bỏ và được bổ sung vào đĩa 96 giếng khác.

Tổng hợp cADN

Tổng hợp cADN được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit phiên mã ngược cADN dung lượng cao ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat #4368813).

Hỗn hợp chủ của 2µl 10X Chất đệm, 0,8µl 25X dNTP, 2µl đoạn mồi ngẫu nhiên, 1µl transcriptaza ngược, 1µl chất ức chế ARNaza và 3,2µl H2O trong mỗi phản ứng được bổ sung vào 10µl ARN tổng số. cADN được tạo ra bằng cách sử dụng chu trình nhiệt Bio-Rad C-1000 hoặc S-1000 (Hercules, CA) qua các bước sau: 10 phút 25°C, 120 phút 37°C, 5 giây 85°C, giữ nguyên 4°C.

Kỹ thuật PCR thời gian thực

2 µl cADN được bổ sung vào hỗn hợp chủ chứa 0,5 µl GAPDH ở chuột (cat # 4352339E Life Technologies) hoặc các đoạn dò GAPDH TaqMan ở khỉ Cynomolgus được thiết kế theo đặt hàng: (F- GCATCCTGGGCTACACTGA, (SEQ ID NO: 13) R-TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC (SEQ ID NO: 14), Đoạn dò- CCAGGTGGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 15)), 0,5 µl HAO1 người hoặc chuột (HS00213909_M1- mà phản ứng chéo với HOA1 khỉ Cynomolgus, Mm 00439249_m1 cho các thử nghiệm ở chuột, life technologies) và 5µl hỗn hợp chủ đoạn dò Lightcycler 480 (Roche Cat # 04887301001) trong mỗi giếng trong 50 đĩa 384 giếng (Roche cat # 04887301001). PCR thời gian thực được thực hiện trong hệ thống PCR thời gian thực LightCycler480 (Roche) bằng cách sử dụng thử nghiệm ΔΔCt(RQ). Mỗi sợi kép được kiểm tra trong hai lần chuyển nhiễm độc lập và mỗi lần chuyển nhiễm được thử nghiệm trong hai lần lặp, trừ khi có lưu ý khác theo các bảng tóm tắt.

Để tính số lần thay đổi tương đối, dữ liệu thời gian thực được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp ΔΔCt và được chuẩn hóa với các thử nghiệm được thực hiện bằng các tế bào được chuyển nhiễm bằng 10 nM AD-1955, hoặc các tế bào được chuyển nhiễm giả. IC50 được tính bằng cách sử dụng mô hình khớp 4 tham số sử dụng XLFit và được chuẩn

hóa đối với tế bào được chuyển nhiễm bằng AD-1955 hoặc các tế bào chưa quen thí nghiệm.

Các trình tự của sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa AD-1955 là: CÓ NGHĨA: 5'-cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT-3' (SEQ ID NO: 16); và ĐỐI NGHĨA: 5'-UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT-3' (SEQ ID NO: 17).

Bảng B: Chữ viết tắt của các monome nucleotit sử dụng trong biểu diễn trình tự axit nucleic.

Chữ viết tắt	(Các) Nucleotit
A	Ađenosin-3'-phosphat
Ab	beta-L-ađenosin-3`-phosphat
Af	2'-floađenosin-3'-phosphat
Afs	2'-floađenosin-3'-phosphorothioat
As	ađenosin-3'-phosphorothioat
C	xytiđin-3'-phosphat
Cb	beta-L-xytiđin-3'-phosphat
Cf	2'-floxytiđin-3'-phosphat
Cfs	2'-floxytiđin-3'-phosphorothioat
Cs	xytiđin-3'-phosphorothioat
G	guanosin-3'-phosphat
Gb	beta-L-guanosin-3`-phosphat
Gbs	beta-L-guanosin-3`-phosphorothioat
Gf	2'-floguanosin-3'-phosphat
Gfs	2'-floguanosin-3'-phosphorothioat
Gs	guanosin-3'-phosphorothioat
T	5'-metyluriđin-3'-phosphat

Chữ viết tắt	(Các) Nucleotit
Tf	2'-flo-5-metyluriđin-3'-phosphat
Tfs	2'-flo-5-metyluriđin-3'-phosphorothioat
Ts	5-metyluriđin-3'-phosphorothioat
U	uriđin-3'-phosphat
Uf	2'-flouriđin-3'-phosphat
Ufs	2'-flouriđin -3'-phosphorothioat
Us	uriđin -3'-phosphorothioat
N	nucleotit bất kỳ (G, A, C, T hoặc U)
a	2'-O-metylađenosin-3'-phosphat
as	2'-O-metylađenosin-3'- phosphorothioat
c	2'-O-metylxytiđin-3'-phosphat
cs	2'-O-metylxytiđin-3'- phosphorothioat
g	2'-O-metylguanosin-3'-phosphat
gs	2'-O-metylguanosin-3'- phosphorothioat
t	2'-O-metyl-5-metyluriđin-3'-phosphat
ts	2'-O-metyl-5-metyluriđin-3'-phosphorothioat
u	2'-O-metyluriđin-3'-phosphat
us	2'-O-metyluriđin-3'-phosphorothioat
dT	2'-đeoxytymiđin
dTs	2`-đeoxytymiđin-3`-phosphothioat
dU	2`-đeoxyuriđin
s	cầu nối phosphorothioat

Chữ viết tắt	(Các) Nucleotit
L96	N-[tris(GalNAc-alkyl)-amiđođecanoyl)]-4-hyđroxyprolinol Hyp-(GalNAc-alkyl)3
(Aeo)	2'-O-metoxyetylađenosin-3'-phosphat
(Aeos)	2'-O-metoxyetylađenosin-3'-phosphorothioat
(Geo)	2'-O-metoxyetylguanosin-3'-phosphat
(Geos)	2'-O-metoxyetylguanosin-3'- phosphorothioat
(Teo)	2'-O-metoxyetyl-5-metyluriđin-3'-phosphat
(Teos)	2'-O-metoxyetyl-5-metyluriđin-3'- phosphorothioat
(m5Ceo)	2'-O-metoxyetyl-5-metylxytiđin-3'-phosphat
(m5Ceos)	2'-O-metoxyetyl-5-metylxytiđin-3'- phosphorothioat
(A3m)	3`-O-metylađenosin-2`-phosphat
(A3mx)	3'-O-metyl-xylofuranosylAđenosin-2'-phosphat
(G3m)	3`-O-metylguanosin-2`-phosphat
(G3mx)	3'-O-metyl-xylofuranosylguanosin-2'-phosphat
(C3m)	3`-O-metylxytiđin-2`-phosphat
(C3mx)	3'-O-metyl-xylofuranosylxytiđin-2'-phosphat
(U3m)	3`-O-metyluriđin-2`-phosphat
(U3mx)	3'-O-metylxylouriđin-2'-phosphat
(Chd)	2'-O-hexađexyl-xytiđin-3'-phosphat
(pshe)	hyđroxyetylphosphorothioat
(Uhd)	2'-O-hexađexyl-uriđin-3'-phosphat
(Tgn)	S-Isome của axit tymiđin-glycol nucleic (GNA)
(Cgn)	Axit nucleic xytiđin- glycol (GNA)

Chữ viết tắt	(Các) Nucleotit
(Chd)	2'-O-hexađexyl-xytiđin-3'-phosphat
(Ggn)	2'-O-hexađexyl-xytiđin-3'-phosphat
(Agn)	Axit nucleic ađenosin-glycol (GNA)
P	5'-phosphat
(m5Cam)	2`-O-(N-metylaxetamit)-5-metylxytiđin-3`-phosphat
(m5Cams)	2`-O-(N-metylaxetamit)-5-metylxytiđin-3`-phosphorothioat
(Tam)	2`-O-(N-metylaxetamit)tymiđin-3`-phosphat
(Tams)	2`-O-(N-metylaxetamit)tymiđin-3`-phosphorothioat
(Aam)	2`-O-(N-metylaxetamit)Ađenosin-3`-phosphat
(Aams)	2`-O-(N-metylaxetamit)Ađenosin-3`-phosphorothioat
(Gam)	2`-O-(N-metylaxetamit)guanosin-3`-phosphat
(Gams)	2`-O-(N-metylaxetamit)guanosin-3`-phosphorothioat
Y34	2'-O-Metyl không bazơ
Y44	2-hyđroxymetyl-tetrahyđrofuran-5-phosphat

Ví dụ 1. Thiết kế, Dự đoán Tính đặc hiệu và Hiệu lực của siARN

Thiết kế siARN được thực hiện để nhận dạng siARN hướng đích bản phiên mã HAO1 ở người, khỉ Cynomolgus, chuột, và chuột nhắt được chú thích trong cơ sở dữ liệu Gen NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/).

Thiết kế sử dụng các bản phiên mã sau đây từ bộ sưu tập NCBI RefSeq: mARN HAO1 người (*Homo sapiens*) là NM_017545.2; mARN HAO1 khỉ Cynomolgus (*Macaca fascicularis)* là XM_005568381.1; mARN HAO1 chuột (*Mus musculus)* là NM_010403.2; mARN HAO1 chuột nhắt (*Rattus norvegicus)* là XM_006235096.1.

Do sự khác biệt trình tự động vật linh trưởng/động vật gặm nhấm cao, các cặp đôi siARN được thiết kế trong vài mẻ riêng rẽ, bao gồm nhưng không giới hạn ở các mẻ chứa bắt cặp chỉ các bản phiên mã người và cyno; chỉ các bản phiên mã người, cyno, chuột, và chuột nhắt; và chỉ các bản phiên mã chuột và chuột nhắt. Mọi siARN kép đều được cấu tạo để chia sẻ 100% nhận dạng với các danh sách bản mã của người và các loài khác đã được liệt kê, được xem xét trong mỗi lứa (ở trên).

Tính đặc hiệu của tất cả 19mer có thể có được dự đoán từ mỗi trình tự. Sau đó ứng viên 19mer mà thiếu các đoạn lặp dài hơn 7 nucleotit được chọn. 1069 ứng viên siARN ở người/cyno, 184 ở người/cyno/chuột/chuột nhắt, và 579 ở chuột/chuột nhắt được dùng trong các tra cứu toàn diện tương phản với các hệ phiên mã thích hợp (được xác định dưới dạng tập hợp của các bản ghi NM_ và XM_ trong các tập hợp NCBI Refseq ở người, cyno, chuột, hoặc chuột nhắt) sử dụng thuật toán "tổng lực" toàn diện được thực hiện trong tập lệnh python 'BruteForce.py'. Sau đó bảng mã phân tích các sự sắp xếp, bảng mã oligo để tạo ra một số điểm dựa trên vị trí và số lượng của lỗi bắt cặp giữa các siARN và bất kỳ bảng mã có tiềm năng ngoài-mục tiêu. Điểm ngoài đích được lấy trọng số để nhấn mạnh các khác biệt ở các vùng 'hạt giống' của các siARN, ở các vị trí 2-9 từ đầu 5' của phân tử này. Mỗi cặp bản sao oligo từ tìm kiếm cưỡng đã cho thấy sự không tương xứng bằng cách tổng hợp các kết quả không tương xứng; sự không tương xứng tại vị trí 2-9 được tính là 2,8, sự không tương xứng tại các vị trí 10-11 được tính là 1,2, và sự không tương xứng tại khu vực 12-19 được tính là 1,0. Một sự dự báo ngoài mục tiêu bổ sung được thực hiện bằng cách so sánh tần số heptamer và octomer từ 3 hexamer riêng biệt từ hạt giống của mỗi oligo. Các hexame từ các vị trí 2-7 so với đầu 5' được sử dụng để tạo 2 heptame và một octome. Heptame1 được tạo ra bằng cách bổ sung A ở đầu 3' vào hexame; heptame2 được tạo ra bằng cách bổ sung A ở đầu 5' vào hexame; octome được tạo ra bằng cách bổ sung A vào cả đầu 5' và 3' của hexame. Tần suất của octome và heptame ở UTRome ở đầu 3' của người, cyno, chuột nhắt, hoặc chuột (được xác định là trình tự con của hệ phiên mã từ cơ sở dữ liệu Refseq của NCBI trong đó đầu của vùng mã hóa, 'CDS', được xác định rõ) được tính trước. Tần suất octome được chuẩn hóa về tần suất heptame bằng cách sử dụng giá trị trung bình từ khoảng tần suất octome. Sau đó 'mirSeedScore' được tính bằng cách tính tổng của ((3 X số đếm octome chuẩn hóa) + (2 X số đếm heptame2) + (1 X số đếm heptame1)).

Cả hai sợi siARN đều được phân vào loại đặc hiệu theo số điểm tính toán được: điểm số trên 3 đủ tiêu chuẩn là đặc hiệu cao, bằng 3 là đặc hiệu và giữa 2,2 với 2,8 là đặc hiệu vừa phải. siARN được phân loại theo tính đặc hiệu của sợi đối nghĩa. Sau đó các cặp đôi từ tập hợp người/cyno và chuột/chuột nhắt mà các oligo đối nghĩa của chúng thiếu GC ở vị trí thứ nhất, thiếu G ở cả vị trí 13 và 14, và có 3 hoặc nhiều Us hoặc As trong vùng hạt (đặc điểm của các cặp đôi có hiệu lực được dự đoán cao) được chọn. Tương tự, các cặp đôi từ tập hợp người/cyno/chuột và người/cyno/chuột/chuột nhắt mà có 3 hoặc nhiều hơn Us hoặc As trong vùng hạt được chọn.

Các sợi kép được liên hợp với GalNAc ứng viên, lần lượt dài 21 và 23 nucleotit trên các sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa, được tạo ra bằng cách kéo dài 4 nucleotit bổ sung đối nghĩa dài 19mer theo hướng 3' (bảo toàn sự bổ trợ hoàn hảo với bản phiên mã đích). Sợi có nghĩa được xác định là bổ sung ngược với 21 nucleotit đầu tiên của sợi đối nghĩa 23mer. Các sợi kép được lựa chọn mà duy trì sự bắt cặp hoàn hảo với tất cả các loại bản phiên mã được chọn trên toàn bộ 23 nucleotit.

Các sợi đối nghĩa mà có chứa C hoặc G ở vị trí 5' thứ nhất được cải biến để có U ở vị trí 5' thứ nhất, trừ khi việc làm như vậy sẽ đưa vào loạt gồm 4 hoặc nhiều Us liên tiếp (5' → 3'), trong trường hợp đó chúng được cải biến để có A ở vị trí 5' thứ nhất. Các sợi có nghĩa để bắt cặp với các cặp đôi có các sợi đối nghĩa "được hoán đổi UA" được cải biến tương ứng để bảo toàn tính bổ sung. Các ví dụ được mô tả dưới đây bao gồm AD-62989 và AD-62993.

Tổng số 31 oligo 21/23mer có nghĩa và 31 oligo 21/23mer đối nghĩa có nguồn gốc từ người/cyno, 19 oligo 21/23mer có nghĩa và 19 oligo 21/23mer đối nghĩa có nguồn gốc từ người/cyno/chuột/chuột nhắt, và 48 oligo 21/23mer có nghĩa và 48 oligo 21/23mer đối nghĩa có nguồn gốc từ chuột/chuột nhắt được tổng hợp và tạo thành các cặp đôi liên hợp GalNAc.

Các trình tự của sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của các sợi kép cải biến được thể hiện trên Bảng 1, và các trình tự của sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của các sợi kép không được cải biến được thể hiện trên Bảng 2.

Bảng 1a. Các trình tự được cải biến HAO1

Tên cặp đôi	Trình tự sợi có nghĩa	SEQ ID NO:	Trình tự sợi đối nghĩa	SEQ ID NO:	Loài
AD-62933	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	18	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	89	Hs/Mm
AD-62939	UfsusUfuCfaAfuGfGfGfuGfuCfcUfaGfgAfL96	19	usCfscUfaGfgAfcAfcccAfuUfgAfaAfasgsu	90	Hs/Mm
AD-62944	GfsasAfaGfuCfaUfCfGfaCfaAfgAfcAfuUfL96	20	asAfsuGfuCfuUfgUfcgaUfgAfcUfuUfcsasc	91	Hs/Mm
AD-62949	UfscsAfuCfgAfcAfAfGfaCfaUfuGfgUfgAfL96	21	usCfsaCfcAfaUfgUfcuuGfuCfgAfuGfascsu	92	Hs/Mm
AD-62954	UfsusUfcAfaUfgGfGfUfgUfcCfuAfgGfaAfL96	22	usUfscCfuAfgGfaCfaccCfaUfuGfaAfasasg	93	Hs/Mm
AD-62959	AfsasUfgGfgUfgUfCfCfuAfgGfaAfcCfuUfL96	23	asAfsgGfuUfcCfuAfggaCfaCfcCfaUfusgsa	94	Hs/Mm
AD-62964	GfsasCfaGfuGfcAfCfAfaUfaUfuUfuCfcAfL96	24	usGfsgAfaAfaUfaUfuguGfcAfcUfgUfcsasg	95	Hs/Mm
AD-62969	AfscsUfuUfuCfaAfUfGfgGfuGfuCfcUfaAfL96	25	usUfsaGfgAfcAfcCfcauUfgAfaAfaGfuscsa	96	Hs/Mm
AD-62934	AfsasGfuCfaUfcGfAfCfaAfgAfcAfuUfgAfL96	26	usCfsaAfuGfuCfuUfgucGfaUfgAfcUfususc	97	Hs/Mm
AD-62940	AfsusCfgAfcAfaGfAfCfaUfuGfgUfgAfgAfL96	27	usCfsuCfaCfcAfaUfgucUfuGfuCfgAfusgsa	98	Hs/Mm

AD-62945	GfsgsGfaGfaAfaGfGfUfgUfuCfaAfgAfuAfL96	28	usAfsuCfuUfgAfaCfaccUfuUfcUfcCfcscsc	99	Hs/Mm
AD-62950	CfsusUfuUfcAfaUfGfGfgUfgUfcCfuAfgAfL96	29	usCfsuAfgGfaCfaCfccaUfuGfaAfaAfgsusc	100	Hs/Mm
AD-62955	UfscsAfaUfgGfgUfGfUfcCfuAfgGfaAfcAfL96	30	usGfsuUfcCfuAfgGfacaCfcCfaUfuGfasasa	101	Hs/Mm
AD-62960	UfsusGfaCfuUfuUfCfAfaUfgGfgUfgUfcAfL96	31	usGfsaCfaCfcCfaUfugaAfaAfgUfcAfasasa	102	Hs/Mm
AD-62965	AfsasAfgUfcAfuCfGfAfcAfaGfaCfaUfuAfL96	32	usAfsaUfgUfcUfuGfucgAfuGfaCfuUfuscsa	103	Hs/Mm
AD-62970	CfsasGfgGfgGfaGfAfAfaGfgUfgUfuCfaAfL96	33	usUfsgAfaCfaCfcUfuucUfcCfcCfcUfgsgsa	104	Hs/Mm
AD-62935	CfsasUfuGfgUfgAfGfGfaAfaAfaUfcCfuUfL96	34	asAfsgGfaUfuUfuUfccuCfaCfcAfaUfgsusc	105	Hs/Mm
AD-62941	AfscsAfuUfgGfuGfAfGfgAfaAfaAfuCfcUfL96	35	asGfsgAfuUfuUfuCfcucAfcCfaAfuGfuscsu	106	Hs/Mm
AD-62946	AfsgsGfgGfgAfgAfAfAfgGfuGfuUfcAfaAfL96	36	usUfsuGfaAfcAfcCfuuuCfuCfcCfcCfusgsg	107	Hs/Mm
AD-62951	AfsusGfgUfgGfuAfAfUfuUfgUfgAfuUfuUfL96	37	asAfsaAfuCfaCfaAfauuAfcCfaCfcAfuscsc	108	Hs
AD-62956	GfsasCfuUfgCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	38	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgCfaAfgUfcscsa	109	Hs
AD-62961	GfsgsAfaGfgGfaAfGfGfuAfgAfaGfuCfuUfL96	39	asAfsgAfcUfuCfuAfccuUfcCfcUfuCfcsasc	110	Hs

AD-62966	UfsgsUfcUfuCfuGfUfUfuAfgAfuUfuCfcUfL96	40	asGfsgAfaAfuCfuAfaacAfgAfaGfaCfasgsg	111	Hs
AD-62971	CfsusUfuGfgCfuGfUfUfuCfcAfaGfaUfcUfL96	41	asGfsaUfcUfuGfgAfaacAfgCfcAfaAfgsgsa	112	Hs
AD-62936	AfsasUfgUfgUfuUfGfGfgCfaAfcGfuCfaUfL96	42	asUfsgAfcGfuUfgCfccaAfaCfaCfaUfususu	113	Hs
AD-62942	UfsgsUfgAfcUfgUfGfGfaCfaCfcCfcUfuAfL96	43	usAfsaGfgGfgUfgUfccaCfaGfuCfaCfasasa	114	Hs
AD-62947	GfsasUfgGfgGfuGfCfCfaGfcUfaCfuAfuUfL96	44	asAfsuAfgUfaGfcUfggcAfcCfcCfaUfcscsa	115	Hs
AD-62952	GfsasAfaAfuGfuGfUfUfuGfgGfcAfaCfgUfL96	45	asCfsgUfuGfcCfcAfaacAfcAfuUfuUfcsasa	116	Hs
AD-62957	GfsgsCfuGfuUfuCfCfAfaGfaUfcUfgAfcAfL96	46	usGfsuCfaGfaUfcUfuggAfaAfcAfgCfcsasa	117	Hs
AD-62962	UfscsCfaAfcAfaAfAfUfaGfcCfaCfcCfcUfL96	47	asGfsgGfgUfgGfcUfauuUfuGfuUfgGfasasa	118	Hs
AD-62967	GfsusCfuUfcUfgUfUfUfaGfaUfuUfcCfuUfL96	48	asAfsgGfaAfaUfcUfaaaCfaGfaAfgAfcsasg	119	Hs
AD-62972	UfsgsGfaAfgGfgAfAfGfgUfaGfaAfgUfcUfL96	49	asGfsaCfuUfcUfaCfcuuCfcCfuUfcCfascsa	120	Hs
AD-62937	UfscsCfuUfuGfgCfUfGfuUfuCfcAfaGfaUfL96	50	asUfscUfuGfgAfaAfcagCfcAfaAfgGfasusu	121	Hs
AD-62943	CfsasUfcUfcUfcAfGfCfuGfgGfaUfgAfuAfL96	51	usAfsuCfaUfcCfcAfgcuGfaGfaGfaUfgsgsg	122	Hs

AD-62948	GfsgsGfgUfgCfcAfGfCfuAfcUfaUfuGfaUfL96	52	asUfscAfaUfaGfuAfgcuGfgCfaCfcCfcsasu	123	Hs
AD-62953	AfsusGfuGfuUfuGfGfGfcAfaCfgUfcAfuAfL96	53	usAfsuGfaCfgUfuGfcccAfaAfcAfcAfususu	124	Hs
AD-62958	CfsusGfuUfuAfgAfUfUfuCfcUfuAfaGfaAfL96	54	usUfscUfuAfaGfgAfaauCfuAfaAfcAfgsasa	125	Hs
AD-62963	AfsgsAfaAfgAfaAfUfGfgAfcUfuGfcAfuAfL96	55	usAfsuGfcAfaGfuCfcauUfuCfuUfuCfusasg	126	Hs
AD-62968	GfscsAfuCfcUfgGfAfAfaUfaUfaUfuAfaAfL96	56	usUfsuAfaUfaUfaUfuucCfaGfgAfuGfcsasa	127	Hs
AD-62973	CfscsUfgUfcAfgAfCfCfaUfgGfgAfaCfuAfL96	57	usAfsgUfuCfcCfaUfgguCfuGfaCfaGfgscsu	128	Hs
AD-62938	AfsasAfcAfuGfgUfGfUfgGfaUfgGfgAfuAfL96	58	usAfsuCfcCfaUfcCfacaCfcAfuGfuUfusasa	129	Hs
AD-62974	CfsusCfaGfgAfuGfAfAfaAfaUfuUfuGfaAfL96	59	usUfscAfaAfaUfuUfuucAfuCfcUfgAfgsusu	130	Hs
AD-62978	CfsasGfcAfuGfuAfUfUfaCfuUfgAfcAfaAfL96	60	usUfsuGfuCfaAfgUfaauAfcAfuGfcUfgsasa	131	Hs
AD-62982	UfsasUfgAfaCfaAfCfAfuGfcUfaAfaUfcAfL96	61	usGfsaUfuUfaGfcAfuguUfgUfuCfaUfasasu	132	Hs
AD-62986	AfsusAfuAfuCfcAfAfAfuGfuUfuUfaGfgAfL96	62	usCfscUfaAfaAfcAfuuuGfgAfuAfuAfususc	133	Hs
AD-62990	CfscsAfgAfuGfgAfAfGfcUfgUfaUfcCfaAfL96	63	usUfsgGfaUfaCfaGfcuuCfcAfuCfuGfgsasa	134	Hs

AD-62994	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	64	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	135	Hs
AD-62998	CfscsCfcGfgCfuAfAfUfuUfgUfaUfcAfaUfL96	65	asUfsuGfaUfaCfaAfauuAfgCfcGfgGfgsgsa	136	Hs
AD-63002	UfsusAfaAfcAfuGfGfCfuUfgAfaUfgGfgAfL96	66	usCfscCfaUfuCfaAfgccAfuGfuUfuAfascsa	137	Hs
AD-62975	AfsasUfgUfgUfuUfAfGfaCfaAfcGfuCfaUfL96	67	asUfsgAfcGfuUfgUfcuaAfaCfaCfaUfususu	138	Mm
AD-62979	AfscsUfaAfaGfgAfAfGfaAfuUfcCfgGfuUfL96	68	asAfscCfgGfaAfuUfcuuCfcUfuUfaGfusasu	139	Mm
AD-62983	UfsasUfaUfcCfaAfAfUfgUfuUfuAfgGfaUfL96	69	asUfscCfuAfaAfaCfauuUfgGfaUfaUfasusu	140	Mm
AD-62987	GfsusGfcGfgAfaAfGfGfcAfcUfgAfuGfuUfL96	70	asAfscAfuCfaGfuGfccuUfuCfcGfcAfcsasc	141	Mm
AD-62991	UfsasAfaAfcAfgUfGfGfuUfcUfuAfaAfuUfL96	71	asAfsuUfuAfaGfaAfccaCfuGfuUfuUfasasa	142	Mm
AD-62995	AfsusGfaAfaAfaUfUfUfuGfaAfaCfcAfgUfL96	72	asCfsuGfgUfuUfcAfaaaUfuUfuUfcAfuscsc	143	Mm
AD-62999	AfsasCfaAfaAfuAfGfCfaAfuCfcCfuUfuUfL96	73	asAfsaAfgGfgAfuUfgcuAfuUfuUfgUfusgsg	144	Mm
AD-63003	CfsusGfaAfaCfaGfAfUfcUfgUfcGfaCfuUfL96	74	asAfsgUfcGfaCfaGfaucUfgUfuUfcAfgscsa	145	Mm
AD-62976	UfsusGfuUfgCfaAfAfGfgGfcAfuUfuUfgAfL96	75	usCfsaAfaAfuGfcCfcuuUfgCfaAfcAfasusu	146	Mm

AD-62980	CfsusCfaUfuGfuUfUfAfuUfaAfcCfuGfuAfL96	76	usAfscAfgGfuUfaAfuaaAfcAfaUfgAfgsasu	147	Mm
AD-62984	CfsasAfcAfaAfaUfAfGfcAfaUfcCfcUfuUfL96	77	asAfsaGfgGfaUfuGfcuaUfuUfuGfuUfgsgsa	148	Mm
AD-62992	CfsasUfuGfuUfuAfUfUfaAfcCfuGfuAfuUfL96	78	asAfsuAfcAfgGfuUfaauAfaAfcAfaUfgsasg	149	Mm
AD-62996	UfsasUfcAfgCfuGfGfGfaAfgAfuAfuCfaAfL96	79	usUfsgAfuAfuCfuUfcccAfgCfuGfaUfasgsa	150	Mm
AD-63000	UfsgsUfcCfuAfgGfAfAfcCfuUfuUfaGfaAfL96	80	usUfscUfaAfaAfgGfuucCfuAfgGfaCfascsc	151	Mm
AD-63004	UfscsCfaAfcAfaAfAfUfaGfcAfaUfcCfcUfL96	81	asGfsgGfaUfuGfcUfauuUfuGfuUfgGfasasa	152	Mm
AD-62977	GfsgsUfgUfgCfgGfAfAfaGfgCfaCfuGfaUfL96	82	asUfscAfgUfgCfcUfuucCfgCfaCfaCfcscsc	153	Mm
AD-62981	UfsusGfaAfaCfcAfGfUfaCfuUfuAfuCfaUfL96	83	asUfsgAfuAfaAfgUfacuGfgUfuUfcAfasasa	154	Mm
AD-62985	UfsasCfuUfcCfaAfAfGfuCfuAfuAfuAfuAfL96	84	usAfsuAfuAfuAfgAfcuuUfgGfaAfgUfascsu	155	Mm
AD-62989	UfscsCfuAfgGfaAfCfCfuUfuUfaGfaAfaUfL96	85	asUfsuUfcUfaAfaAfgguUfcCfuAfgGfascsa	156	Mm
AD-62993	CfsusCfcUfgAfgGfAfAfaAfuUfuUfgGfaAfL96	86	usUfscCfaAfaAfuUfuucCfuCfaGfgAfgsasa	157	Mm
AD-62997	GfscsUfcCfgGfaAfUfGfuUfgCfuGfaAfaUfL96	87	asUfsuUfcAfgCfaAfcauUfcCfgGfaGfcsasu	158	Mm

AD-63001	GfsusGfuUfuGfuGfGfGfg AfgAfcCfaAfuAfL96	88	usAfsuUfgGfuCfuCfcccAfc AfaAfcAfcsasg	159	Mm

Bảng 1b: Các trình tự được cải biến HAO1 khác.

Tên cặp đôi	Trình tự sợi có nghĩa	SEQ ID NO:	Trình tự sợi đối nghĩa	SEQ ID NO:	Loài
AD-62933.2	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	18	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	89	Hs/Mm
AD-62939.2	UfsusUfuCfaAfuGfGfGfuGfuCfcUfaGfgAfL96	19	usCfscUfaGfgAfcAfcccAfuUfgAfaAfasgsu	90	Hs/Mm
AD-62944.2	GfsasAfaGfuCfaUfCfGfaCfaAfgAfcAfuUfL96	20	asAfsuGfuCfuUfgUfcgaUfgAfcUfuUfcsasc	91	Hs/Mm
AD-62949.2	UfscsAfuCfgAfcAfAfGfaCfaUfuGfgUfgAfL96	21	usCfsaCfcAfaUfgUfcuuGfuCfgAfuGfascsu	92	Hs/Mm
AD-62954.2	UfsusUfcAfaUfgGfGfUfgUfcCfuAfgGfaAfL96	22	usUfscCfuAfgGfaCfaccCfaUfuGfaAfasasg	93	Hs/Mm
AD-62959.2	AfsasUfgGfgUfgUfCfCfuAfgGfaAfcCfuUfL96	23	asAfsgGfuUfcCfuAfggaCfaCfcCfaUfusgsa	94	Hs/Mm
AD-62964.2	GfsasCfaGfuGfcAfCfAfaUfaUfuUfuCfcAfL96	24	usGfsgAfaAfaUfaUfuguGfcAfcUfgUfcsasg	95	Hs/Mm

AD-62969.2	AfscsUfuUfuCfaAfUfGfgGfuGfuCfcUfaAfL96	25	usUfsaGfgAfcAfcCfcauUfgAfaAfaGfuscsa	96	Hs/Mm
AD-62934.2	AfsasGfuCfaUfcGfAfCfaAfgAfcAfuUfgAfL96	26	usCfsaAfuGfuCfuUfgucGfaUfgAfcUfususc	97	Hs/Mm
AD-62940.2	AfsusCfgAfcAfaGfAfCfaUfuGfgUfgAfgAfL96	27	usCfsuCfaCfcAfaUfgucUfuGfuCfgAfusgsa	98	Hs/Mm
AD-62945.2	GfsgsGfaGfaAfaGfGfUfgUfuCfaAfgAfuAfL96	28	usAfsuCfuUfgAfaCfaccUfuUfcUfcCfcscsc	99	Hs/Mm
AD-62950.2	CfsusUfuUfcAfaUfGfGfgUfgUfcCfuAfgAfL96	29	usCfsuAfgGfaCfaCfccaUfuGfaAfaAfgsusc	100	Hs/Mm
AD-62955.2	UfscsAfaUfgGfgUfGfUfcCfuAfgGfaAfcAfL96	30	usGfsuUfcCfuAfgGfacaCfcCfaUfuGfasasa	101	Hs/Mm
AD-62960.2	UfsusGfaCfuUfuUfCfAfaUfgGfgUfgUfcAfL96	31	usGfsaCfaCfcCfaUfugaAfaAfgUfcAfasasa	102	Hs/Mm
AD-62965.2	AfsasAfgUfcAfuCfGfAfcAfaGfaCfaUfuAfL96	32	usAfsaUfgUfcUfuGfucgAfuGfaCfuUfuscsa	103	Hs/Mm

AD-62970.2	CfsasGfgGfgGfaGfAfAfaGfgUfgUfuCfaAfL96	33	usUfsgAfaCfaCfcUfuucUfcCfcCfcUfgsgsa	104	Hs/Mm
AD-62935.2	CfsasUfuGfgUfgAfGfGfaAfaAfaUfcCfuUfL96	34	asAfsgGfaUfuUfuUfccuCfaCfcAfaUfgsusc	105	Hs/Mm
AD-62941.2	AfscsAfuUfgGfuGfAfGfgAfaAfaAfuCfcUfL96	35	asGfsgAfuUfuUfuCfcucAfcCfaAfuGfuscsu	106	Hs/Mm
AD-62946.2	AfsgsGfgGfgAfgAfAfAfgGfuGfuUfcAfaAfL96	36	usUfsuGfaAfcAfcCfuuuCfuCfcCfcCfusgsg	107	Hs/Mm
AD-62951.2	AfsusGfgUfgGfuAfAfUfuUfgUfgAfuUfuUfL96	37	asAfsaAfuCfaCfaAfauuAfcCfaCfcAfuscsc	108	Hs
AD-62956.2	GfsasCfuUfgCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	38	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgCfaAfgUfcscsa	109	Hs
AD-62961.2	GfsgsAfaGfgGfaAfGfGfuAfgAfaGfuCfuUfL96	39	asAfsgAfcUfuCfuAfccuUfcCfcUfuCfcsasc	110	Hs
AD-62966.2	UfsgsUfcUfuCfuGfUfUfuAfgAfuUfuCfcUfL96	40	asGfsgAfaAfuCfuAfaacAfgAfaGfaCfasgsg	111	Hs

AD-62971.2	CfsusUfuGfgCfuGfUfUfuCfcAfaGfaUfcUfL96	41	asGfsaUfcUfuGfgAfaacAfgCfcAfaAfgsgsa	112	Hs
AD-62936.2	AfsasUfgUfgUfuUfGfGfgCfaAfcGfuCfaUfL96	42	asUfsgAfcGfuUfgCfccaAfaCfaCfaUfususu	113	Hs
AD-62942.2	UfsgsUfgAfcUfgUfGfGfaCfaCfcCfcUfuAfL96	43	usAfsaGfgGfgUfgUfccaCfaGfuCfaCfasasa	114	Hs
AD-62947.2	GfsasUfgGfgGfuGfCfCfaGfcUfaCfuAfuUfL96	44	asAfsuAfgUfaGfcUfggcAfcCfcCfaUfcscsa	115	Hs
AD-62952.2	GfsasAfaAfuGfuGfUfUfuGfgGfcAfaCfgUfL96	45	asCfsgUfuGfcCfcAfaacAfcAfuUfuUfcsasa	116	Hs
AD-62957.2	GfsgsCfuGfuUfuCfCfAfaGfaUfcUfgAfcAfL96	46	usGfsuCfaGfaUfcUfuggAfaAfcAfgCfcsasa	117	Hs
AD-62962.2	UfscsCfaAfcAfaAfAfUfaGfcCfaCfcCfcUfL96	47	asGfsgGfgUfgGfcUfauuUfuGfuUfgGfasasa	118	Hs
AD-62967.2	GfsusCfuUfcUfgUfUfUfaGfaUfuUfcCfuUfL96	48	asAfsgGfaAfaUfcUfaaaCfaGfaAfgAfcsasg	119	Hs

AD-62972.2	UfsgsGfaAfgGfgAfAfGfgUfaGfaAfgUfcUfL96	49	asGfsaCfuUfcUfaCfcuuCfcCfuUfcCfascsa	120	Hs
AD-62937.2	UfscsCfuUfuGfgCfUfGfuUfuCfcAfaGfaUfL96	50	asUfscUfuGfgAfaAfcagCfcAfaAfgGfasusu	121	Hs
AD-62943.2	CfsasUfcUfcUfcAfGfCfuGfgGfaUfgAfuAfL96	51	usAfsuCfaUfcCfcAfgcuGfaGfaGfaUfgsgsg	122	Hs
AD-62948.2	GfsgsGfgUfgCfcAfGfCfuAfcUfaUfuGfaUfL96	52	asUfscAfaUfaGfuAfgcuGfgCfaCfcCfcsasu	123	Hs
AD-62953.2	AfsusGfuGfuUfuGfGfGfcAfaCfgUfcAfuAfL96	53	usAfsuGfaCfgUfuGfcccAfaAfcAfcAfususu	124	Hs
AD-62958.2	CfsusGfuUfuAfgAfUfUfuCfcUfuAfaGfaAfL96	54	usUfscUfuAfaGfgAfaauCfuAfaAfcAfgsasa	125	Hs
AD-62963.2	AfsgsAfaAfgAfaAfUfGfgAfcUfuGfcAfuAfL96	55	usAfsuGfcAfaGfuCfcauUfuCfuUfuCfusasg	126	Hs
AD-62968.2	GfscsAfuCfcUfgGfAfAfaUfaUfaUfuAfaAfL96	56	usUfsuAfaUfaUfaUfuucCfaGfgAfuGfcsasa	127	Hs

AD-62973.2	CfscsUfgUfcAfgAfCfCfaUfgGfgAfaCfuAfL96	57	usAfsgUfuCfcCfaUfgguCfuGfaCfaGfgscsu	128	Hs
AD-62938.2	AfsasAfcAfuGfgUfGfUfgGfaUfgGfgAfuAfL96	58	usAfsuCfcCfaUfcCfacaCfcAfuGfuUfusasa	129	Hs
AD-62974.2	CfsusCfaGfgAfuGfAfAfaAfaUfuUfuGfaAfL96	59	usUfscAfaAfaUfuUfuucAfuCfcUfgAfgsusu	130	Hs
AD-62978.2	CfsasGfcAfuGfuAfUfUfaCfuUfgAfcAfaAfL96	60	usUfsuGfuCfaAfgUfaauAfcAfuGfcUfgsasa	131	Hs
AD-62982.2	UfsasUfgAfaCfaAfCfAfuGfcUfaAfaUfcAfL96	61	usGfsaUfuUfaGfcAfuguUfgUfuCfaUfasasu	132	Hs
AD-62986.2	AfsusAfuAfuCfcAfAfAfuGfuUfuUfaGfgAfL96	62	usCfscUfaAfaAfcAfuuuGfgAfuAfuAfususc	133	Hs
AD-62990.2	CfscsAfgAfuGfgAfAfGfcUfgUfaUfcCfaAfL96	63	usUfsgGfaUfaCfaGfcuuCfcAfuCfuGfgsasa	134	Hs
AD-62994.2	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	64	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	135	Hs

AD-62998.2	CfscsCfcGfgCfuAfAfUfuUfgUfaUfcAfaUfL96	65	asUfsuGfaUfaCfaAfauuAfgCfcGfgGfgsgsa	136	Hs
AD-63002.2	UfsusAfaAfcAfuGfGfCfuUfgAfaUfgGfgAfL96	66	usCfscCfaUfuCfaAfgccAfuGfuUfuAfascsa	137	Hs
AD-62975.2	AfsasUfgUfgUfuUfAfGfaCfaAfcGfuCfaUfL96	67	asUfsgAfcGfuUfgUfcuaAfaCfaCfaUfususu	138	Mm
AD-62979.2	AfscsUfaAfaGfgAfAfGfaAfuUfcCfgGfuUfL96	68	asAfscCfgGfaAfuUfcuuCfcUfuUfaGfusasu	139	Mm
AD-62983.2	UfsasUfaUfcCfaAfAfUfgUfuUfuAfgGfaUfL96	69	asUfscCfuAfaAfaCfauuUfgGfaUfaUfasusu	140	Mm
AD-62987.2	GfsusGfcGfgAfaAfGfGfcAfcUfgAfuGfuUfL96	70	asAfscAfuCfaGfuGfccuUfuCfcGfcAfcsasc	141	Mm
AD-62991.2	UfsasAfaAfcAfgUfGfGfuUfcUfuAfaAfuUfL96	71	asAfsuUfuAfaGfaAfccaCfuGfuUfuUfasasa	142	Mm
AD-62995.2	AfsusGfaAfaAfaUfUfUfuGfaAfaCfcAfgUfL96	72	asCfsuGfgUfuUfcAfaaaUfuUfuUfcAfuscsc	143	Mm

AD-62999.2	AfsasCfaAfaAfuAfGfCfaAfuCfcCfuUfuUfL96	73	asAfsaAfgGfgAfuUfgcuAfuUfuUfgUfusgsg	144	Mm
AD-63003.2	CfsusGfaAfaCfaGfAfUfcUfgUfcGfaCfuUfL96	74	asAfsgUfcGfaCfaGfaucUfgUfuUfcAfgscsa	145	Mm
AD-62976.2	UfsusGfuUfgCfaAfAfGfgGfcAfuUfuUfgAfL96	75	usCfsaAfaAfuGfcCfcuuUfgCfaAfcAfasusu	146	Mm
AD-62980.2	CfsusCfaUfuGfuUfUfAfuUfaAfcCfuGfuAfL96	76	usAfscAfgGfuUfaAfuaaAfcAfaUfgAfgsasu	147	Mm
AD-62984.2	CfsasAfcAfaAfaUfAfGfcAfaUfcCfcUfuUfL96	77	asAfsaGfgGfaUfuGfcuaUfuUfuGfuUfgsgsa	148	Mm
AD-62992.2	CfsasUfuGfuUfuAfUfUfaAfcCfuGfuAfuUfL96	78	asAfsuAfcAfgGfuUfaauAfaAfcAfaUfgsasg	149	Mm
AD-62996.2	UfsasUfcAfgCfuGfGfGfaAfgAfuAfuCfaAfL96	79	usUfsgAfuAfuCfuUfcccAfgCfuGfaUfasgsa	150	Mm
AD-63000.2	UfsgsUfcCfuAfgGfAfAfcCfuUfuUfaGfaAfL96	80	usUfscUfaAfaAfgGfuucCfuAfgGfaCfascsc	151	Mm

AD-63004.2	UfscsCfaAfcAfaAfAfUfaGfcAfaUfcCfcUfL96	81	asGfsgGfaUfuGfcUfauuUfuGfuUfgGfasasa	152	Mm
AD-62977.2	GfsgsUfgUfgCfgGfAfAfaGfgCfaCfuGfaUfL96	82	asUfscAfgUfgCfcUfuucCfgCfaCfaCfcscsc	153	Mm
AD-62981.2	UfsusGfaAfaCfcAfGfUfaCfuUfuAfuCfaUfL96	83	asUfsgAfuAfaAfgUfacuGfgUfuUfcAfasasa	154	Mm
AD-62985.2	UfsasCfuUfcCfaAfAfGfuCfuAfuAfuAfuAfL96	84	usAfsuAfuAfuAfgAfcuuUfgGfaAfgUfascsu	155	Mm
AD-62989.2	UfscsCfuAfgGfaAfCfCfuUfuUfaGfaAfaUfL96	85	asUfsuUfcUfaAfaAfgguUfcCfuAfgGfascsa	156	Mm
AD-62993.2	CfsusCfcUfgAfgGfAfAfaAfuUfuUfgGfaAfL96	86	usUfscCfaAfaAfuUfuucCfuCfaGfgAfgsasa	157	Mm
AD-62997.2	GfscsUfcCfgGfaAfUfGfuUfgCfuGfaAfaUfL96	87	asUfsuUfcAfgCfaAfcauUfcCfgGfaGfcsasu	158	Mm
AD-63001.2	GfsusGfuUfuGfuGfGfGfgAfgAfcCfaAfuAfL96	88	usAfsuUfgGfuCfuCfcccAfcAfaAfcAfcsasg	159	Mm

AD-62933.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	160	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	277	
AD-65630.1	Y44gsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	161	PusUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	278	
AD-65636.1	gsasauguGfaAfAfGfucauCfgacaaL96	162	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	279	
AD-65642.1	gsasauguGfaAfAfGfucaucgacaaL96	163	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	280	
AD-65647.1	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	164	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	281	
AD-65652.1	gsasauguGfaaaGfucaucGfacaaL96	165	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	282	
AD-65657.1	gsasaugugaaaGfucaucGfacaaL96	166	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	283	
AD-65662.1	gsasauguGfaaaGfucaucgacaaL96	167	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	284	

AD-65625.1	AfsusGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	168	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfususc	285	
AD-65631.1	asusguGfaAfAfGfucaucgacaaL96	169	usUfsgucGfaugacuuUfcAfcaususc	286	
AD-65637.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	170	usUfsgucGfaUfgAfcuuUfcAfcauucsusg	287	
AD-65643.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	171	usUfsgucGfaUfGfacuuUfcAfcauucsusg	288	
AD-65648.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	172	usUfsgucGfaugacuuUfcAfcauucsusg	289	
AD-65653.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	173	usUfsgucGfaugacuuUfcacauucsusg	290	
AD-65658.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	174	usUfsgucgaugacuuUfcacauucsusg	291	
AD-65663.1	gsasauguGfaAfAfGfucaucgacaaL96	175	usUfsgucGfaUfgAfcuuUfcAfcauucsusg	292	

AD-65626.1	gsasauguGfaAfAfGfucaucgacaaL96	176	usUfsgucGfaUfGfacuuUfcAfcauucsusg	293	
AD-65638.1	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	177	usUfsgucGfaUfgAfcuuUfcAfcauucsusg	294	
AD-65644.1	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	178	usUfsgucGfaUfGfacuuUfcAfcauucsusg	295	
AD-65649.1	gsasauguGfaaAfGfucaucgacaaL96	179	usUfsgucGfaugacuuUfcAfcauucsusg	296	
AD-65654.1	gsasaugugaaagucau(Cgn)gacaaL96	180	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	297	
AD-65659.1	gsasaugdTgaaagucau(Cgn)gacaaL96	181	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	298	
AD-65627.1	gsasaudGugaaadGucau(Cgn)gacaaL96	182	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	299	
AD-65633.1	gsasaugdTgaaadGucau(Cgn)gacaaL96	183	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	300	

AD-65639.1	gsasaugudGaaadGucau(Cgn)gacaaL96	184	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	301	
AD-65645.1	gsasaugugaaadGucaucdGacaaL96	185	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	302	
AD-65650.1	gsasaugugaaadGucaucdTacaaL96	186	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	303	
AD-65655.1	gsasaugugaaadGucaucY34acaaL96	187	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	304	
AD-65660.1	gsasaugugaaadGucadTcdTacaaL96	188	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	305	
AD-65665.1	gsasaugugaaadGucaucdGadCaaL96	189	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	306	
AD-65628.1	gsasaugugaaadGucaucdTadCaaL96	190	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	307	
AD-65634.1	gsasaugugaaadGucaucY34adCaaL96	191	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	308	

AD-65646.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	192	usdTsgucgaugdAcuudTcacauucsusg	309	
AD-65656.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	193	usUsgucgaugacuudTcacauucsusg	310	
AD-65661.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	194	usdTsgucdGaugacuudTcacauucsusg	311	
AD-65666.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	195	usUsgucdGaugacuudTcacauucsusg	312	
AD-65629.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	196	usdTsgucgaugacuudTcdAcauucsusg	313	
AD-65635.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	197	usdTsgucdGaugacuudTcdAcauucsusg	314	
AD-65641.1	gsasaugugaaadGucau(Cgn)gacaaL96	198	usdTsgucgaugdAcuudTcacauucsusg	315	
AD-62994.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	199	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	316	

AD-65595.1	gsascuuuCfaUfCfCfuggaAfauauaL96	200	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	317	
AD-65600.1	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauauaL96	201	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	318	
AD-65610.1	gsascuuuCfaucCfuggaaAfuauaL96	202	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	319	
AD-65615.1	gsascuuucaucCfuggaaAfuauaL96	203	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	320	
AD-65620.1	gsascuuuCfaucCfuggaaauauaL96	204	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	321	
AD-65584.1	CfsusUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	205	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgsusc	322	
AD-65590.1	csusuuCfaUfCfCfuggaaauauaL96	206	usAfsuauUfuccaggaUfgAfaagsusc	323	
AD-65596.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	207	usAfsuauUfuCfcAfggaUfgAfaagucscsa	324	

AD-65601.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	208	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	325	
AD-65606.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	209	usAfsuauUfuccaggaUfgAfaagucscsa	326	
AD-65611.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	210	usAfsuauUfuccaggaUfgaaagucscsa	327	
AD-65616.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	211	usAfsuauuuccaggaUfgaaagucscsa	328	
AD-65621.1	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauauaL96	212	usAfsuauUfuCfcAfggaUfgAfaagucscsa	329	
AD-65585.1	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauauaL96	213	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	330	
AD-65591.1	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauauaL96	214	usAfsuauUfuccaggaUfgAfaagucscsa	331	
AD-65597.1	gsascuuuCfauCfCfuggaaauauaL96	215	usAfsuauUfuCfcAfggaUfgAfaagucscsa	332	

AD-65602.1	gsascuuuCfauCfCfuggaaauauaL96	216	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	333	
AD-65607.1	gsascuuuCfauCfCfuggaaauauaL96	217	usAfsuauUfuccaggaUfgAfaagucscsa	334	
AD-65612.1	gsascuuucauccuggaa(Agn)uauaL96	218	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	335	
AD-65622.1	gsascuuucaucdCuggaa(Agn)uauaL96	219	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	336	
AD-65586.1	gsascudTucaucdCuggaa(Agn)uauaL96	220	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	337	
AD-65592.1	gsascuudTcaucdCuggaa(Agn)uauaL96	221	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	338	
AD-65598.1	gsascuuudCaucdCuggaa(Agn)uauaL96	222	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	339	
AD-65603.1	gsascuuucaucdCuggaadAuauaL96	223	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	340	

AD-65608.1	gsascuuucaucdCuggaadTuauaL96	224	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	341	
AD-65613.1	gsascuuucaucdCuggaaY34uauaL96	225	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	342	
AD-65618.1	gsascuuucaucdCuggdAadTuauaL96	226	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	343	
AD-65623.1	gsascuuucaucdCuggaadTudAuaL96	227	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	344	
AD-65587.1	gsascuuucaucdCuggaa(Agn)udAuaL96	228	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	345	
AD-65593.1	gsascuudTcaucdCuggaadAudAuaL96	229	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	346	
AD-65599.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	230	usdAsuauuuccdAggadTgaaagucscsa	347	
AD-65604.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	231	usdAsuauuuccaggadTgaaagucscsa	348	

AD-65609.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	232	usAsuauuuccaggadTgaaagucscsa	349	
AD-65614.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	233	usdAsuaudTuccaggadTgaaagucscsa	350	
AD-65619.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	234	usAsuaudTuccaggadTgaaagucscsa	351	
AD-65624.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	235	usdAsuauuuccaggadTgdAaagucscsa	352	
AD-65588.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	236	usdAsuaudTuccaggadTgdAaagucscsa	353	
AD-65594.1	gsascuuucaucdCuggaa(Agn)uauaL96	237	usdAsuauuuccdAggadTgaaagucscsa	354	
AD-68309.1	asgsaaagGfuGfUfUfcaagaugucaL96	238	usGfsacaUfcUfUfgaacAfcCfuuucuscsc	355	
AD-68303.1	csasuccuGfgAfAfAfuauauuaacuL96	239	asGfsuuaAfuAfUfauuuCfcAfggaugsasa	356	

AD-65626.5	gsasauguGfaAfAfGfucaucgacaaL96	240	usUfsgucGfaUfGfacuuUfcAfcauucsusg	357	
AD-68295.1	asgsugcaCfaAfUfAfuuuucccauaL96	241	usAfsuggGfaAfAfauauUfgUfgcacusgsu	358	
AD-68273.1	gsasaaguCfaUfCfGfacaagacauuL96	242	asAfsuguCfuUfGfucgaUfgAfcuuucsasc	359	
AD-68297.1	asasugugAfaAfGfUfcaucgacaaaL96	243	usUfsuguCfgAfUfgacuUfuCfacauuscsu	360	
AD-68287.1	csusggaaAfuAfUfAfuuaacguuaL96	244	usAfsacaGfuUfAfauauAfuUfuccagsgsa	361	
AD-68300.1	asusuuucCfcAfUfCfuguauuauuuL96	245	asAfsauaAfuAfCfagauGfgGfaaaausasu	362	
AD-68306.1	usgsucguUfcUfUfUfuccaacaaaaL96	246	usUfsuugUfuGfGfaaaaGfaAfcgacascsc	363	
AD-68292.1	asusccugGfaAfAfUfauauuaacuaL96	247	usAfsguuAfaUfAfuauuUfcCfaggausgsa	364	

AD-68298.1	gscsauuuUfgAfGfAfggugaugauaL96	248	usAfsucaUfcAfCfcucuCfaAfaaugcscsc	365	
AD-68277.1	csasggggGfaGfAfAfagguguucaaL96	249	usUfsgaaCfaCfCfuuucUfcCfcccugsgsa	366	
AD-68289.1	gsgsaaauAfuAfUfUfaacuguuaaaL96	250	usUfsuaaCfaGfUfuaauAfuAfuuuccsasg	367	
AD-68272.1	csasuuggUfgAfGfGfaaaaaauccuuL96	251	asAfsggaUfuUfUfuccuCfaCfcaaugsusc	368	
AD-68282.1	gsgsgagaAfaGfGfUfguucaagauaL96	252	usAfsucuUfgAfAfcaccUfuUfcucccscsc	369	
AD-68285.1	gsgscauuUfuGfAfGfaggugaugauL96	253	asUfscauCfaCfCfucucAfaAfaugccscsu	370	
AD-68290.1	usascaaaGfgGfUfGfucguucuuuuL96	254	asAfsaagAfaCfGfacacCfcUfuuguasusu	371	
AD-68296.1	usgsggauCfuUfGfGfugucgaaucaL96	255	usGfsauuCfgAfCfaccaAfgAfucccasusu	372	

AD-68288.1	csusgacaGfuGfCfAfcaauauuuuaL96	256	usAfsaaaUfaUfUfgugcAfcUfgucagsasu	373	
AD-68299.1	csasgugcAfcAfAfUfauuuucccauL96	257	asUfsgggAfaAfAfuauuGfuGfcacugsusc	374	
AD-68275.1	ascsuuuuCfaAfUfGfggugucccuaaL96	258	usUfsaggAfcAfCfccauUfgAfaaaguscsa	375	
AD-68274.1	ascsauugGfuGfAfGfgaaaaauccuL96	259	asGfsgauUfuUfUfccucAfcCfaauguscsu	376	
AD-68294.1	ususgcuuUfuGfAfCfuuuucaaugaL96	260	usCfsauuGfaAfAfagucAfaAfagcaasusg	377	
AD-68302.1	csasuuuuGfaGfAfGfgugaugaugaL96	261	usCfsaucAfuCfAfccucUfcAfaaaugscsc	378	
AD-68279.1	ususgacuUfuUfCfAfaugggugucaL96	262	usGfsacaCfcCfAfuugaAfaAfgucaasasa	379	
AD-68304.1	csgsacuuCfuGfUfUfuuaggacagaL96	263	usCfsuguCfcUfAfaaacAfgAfagucgsasc	380	

AD-68286.1	csuscugaGfuGfGfGfugccagaauaL96	264	usAfsuucUfgGfCfacccAfcUfcagagscsc	381	
AD-68291.1	gsgsgugcCfaGfAfAfugugaaaguaL96	265	usAfscuuUfcAfCfauucUfgGfcacccsasc	382	
AD-68283.1	uscsaaugGfgUfGfUfccuaggaacaL96	266	usGfsuucCfuAfGfgacaCfcCfauugasasa	383	
AD-68280.1	asasagucAfuCfGfAfcaagacauuaL96	267	usAfsaugUfcUfUfgucgAfuGfacuuuscsa	384	
AD-68293.1	asusuuugAfgAfGfGfugaugaugcaL96	268	usGfscauCfaUfCfaccuCfuCfaaaausgsc	385	
AD-68276.1	asuscgacAfaGfAfCfauuggugagaL96	269	usCfsucaCfcAfAfugucUfuGfucgausgsa	386	
AD-68308.1	gsgsugccAfgAfAfUfgugaaagucaL96	270	usGfsacuUfuCfAfcauuCfuGfgcaccscsa	387	
AD-68278.1	gsascaguGfcAfCfAfauauuuuccaL96	271	usGfsgaaAfaUfAfuuguGfcAfcugucsasg	388	

AD-68307.1	ascsaaagAfgAfCfAfcugugcagaaL96	272	usUfscugCfaCfAfguguCfuCfuuuguscsa	389	
AD-68284.1	ususuucaAfuGfGfGfuguccuaggaL96	273	usCfscuaGfgAfCfacccAfuUfgaaaasgsu	390	
AD-68301.1	cscsguuuCfcAfAfGfaucugacaguL96	274	asCfsuguCfaGfAfucuuGfgAfaacggscsc	391	
AD-68281.1	asgsggggAfgAfAfAfgguguucaaaL96	275	usUfsugaAfcAfCfcuuuCfuCfccccusgsg	392	
AD-68305.1	asgsucauCfgAfCfAfagacauugguL96	276	asCfscaaUfgUfCfuuguCfgAfugacususu	393	

Bảng 2a. Các trình tự không được cải biến HAO1 (người và người/chuột)

Tên cặp đôi	SEQ ID NO:	Trình tự sợi có nghĩa	SEQ ID NO:	Trình tự sợi đối nghĩa	Vị trí trong NM_017545.2
AD-62933	394	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	443	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-62939	395	UUUUCAAUGGGUGUCCUAGGA	444	UCCUAGGACACCCAUUGAAAAGU	1302-1324
AD-62944	396	GAAAGUCAUCGACAAGACAUU	445	AAUGUCUUGUCGAUGACUUUCAC	1078-1100
AD-62949	397	UCAUCGACAAGACAUUGGUGA	446	UCACCAAUGUCUUGUCGAUGACU	1083-1105
AD-62954	398	UUUCAAUGGGUGUCCUAGGAA	447	UUCCUAGGACACCCAUUGAAAAG	1303-1325
AD-62959	399	AAUGGGUGUCCUAGGAACCUU	448	AAGGUUCCUAGGACACCCAUUGA	1307-1329
AD-62964	400	GACAGUGCACAAUAUUUUCCA	449	UGGAAAAUAUUGUGCACUGUCAG	1134-1156_C21A
AD-62969	401	ACUUUUCAAUGGGUGUCCUAA	450	UUAGGACACCCAUUGAAAAGUCA	1300-1322_G21A

AD-62934	402	AAGUCAUCGACAAGACAUUGA	451	UCAAUGUCUUGUCGAUGACUUUC	1080-1102_G21A
AD-62940	403	AUCGACAAGACAUUGGUGAGA	452	UCUCACCAAUGUCUUGUCGAUGA	1085-1107_G21A
AD-62945	404	GGGAGAAAGGUGUUCAAGAUA	453	UAUCUUGAACACCUUUCUCCCCC	996-1018_G21A
AD-62950	405	CUUUUCAAUGGGUGUCCUAGA	454	UCUAGGACACCCAUUGAAAAGUC	1301-1323_G21A
AD-62955	406	UCAAUGGGUGUCCUAGGAACA	455	UGUUCCUAGGACACCCAUUGAAA	1305-1327_C21A
AD-62960	407	UUGACUUUUCAAUGGGUGUCA	456	UGACACCCAUUGAAAAGUCAAAA	1297-1319_C21A
AD-62965	408	AAAGUCAUCGACAAGACAUUA	457	UAAUGUCUUGUCGAUGACUUUCA	1079-1101_G21A
AD-62970	409	CAGGGGGAGAAAGGUGUUCAA	458	UUGAACACCUUUCUCCCCCUGGA	992-1014
AD-62935	410	CAUUGGUGAGGAAAAAUCCUU	459	AAGGAUUUUUCCUCACCAAUGUC	1095-1117

AD-62941	411	ACAUUGGUGAGGAAAAAUCCU	460	AGGAUUUUUCCUCACCAAUGUCU	1094-1116
AD-62946	412	AGGGGGAGAAAGGUGUUCAAA	461	UUUGAACACCUUUCUCCCCCUGG	993-1015_G21A
AD-62974	413	CUCAGGAUGAAAAAUUUUGAA	462	UUCAAAAUUUUUCAUCCUGAGUU	563-585
AD-62978	414	CAGCAUGUAUUACUUGACAAA	463	UUUGUCAAGUAAUACAUGCUGAA	1173-1195
AD-62982	415	UAUGAACAACAUGCUAAAUCA	464	UGAUUUAGCAUGUUGUUCAUAAU	53-75
AD-62986	416	AUAUAUCCAAAUGUUUUAGGA	465	UCCUAAAACAUUUGGAUAUAUUC	1679-1701
AD-62990	417	CCAGAUGGAAGCUGUAUCCAA	466	UUGGAUACAGCUUCCAUCUGGAA	156-178
AD-62994	418	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	467	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-62998	419	CCCCGGCUAAUUUGUAUCAAU	468	AUUGAUACAAAUUAGCCGGGGGA	29-51
AD-63002	420	UUAAACAUGGCUUGAAUGGGA	469	UCCCAUUCAAGCCAUGUUUAACA	765-787
AD-62975	421	AAUGUGUUUAGACAACGUCAU	470	AUGACGUUGUCUAAACACAUUUU	1388-1410
AD-62979	422	ACUAAAGGAAGAAUUCCGGUU	471	AACCGGAAUUCUUCCUUUAGUAU	1027-1049

AD-62983	423	UAUAUCCAAAUGUUUUAGGAU	472	AUCCUAAAACAUUUGGAUAUAUU	1680-1702
AD-62987	424	GUGCGGAAAGGCACUGAUGUU	473	AACAUCAGUGCCUUUCCGCACAC	902-924
AD-62991	425	UAAAACAGUGGUUCUUAAAUU	474	AAUUUAAGAACCACUGUUUUAAA	1521-1543
AD-62995	426	AUGAAAAAUUUUGAAACCAGU	475	ACUGGUUUCAAAAUUUUUCAUCC	569-591
AD-62999	427	AACAAAAUAGCAAUCCCUUUU	476	AAAAGGGAUUGCUAUUUUGUUGG	1264-1286
AD-63003	428	CUGAAACAGAUCUGUCGACUU	477	AAGUCGACAGAUCUGUUUCAGCA	195-217
AD-62976	429	UUGUUGCAAAGGGCAUUUUGA	478	UCAAAAUGCCCUUUGCAACAAUU	720-742
AD-62980	430	CUCAUUGUUUAUUAACCUGUA	479	UACAGGUUAAUAAACAAUGAGAU	1483-1505
AD-62984	431	CAACAAAAUAGCAAUCCCUUU	480	AAAGGGAUUGCUAUUUUGUUGGA	1263-1285
AD-62992	432	CAUUGUUUAUUAACCUGUAUU	481	AAUACAGGUUAAUAAACAAUGAG	1485-1507
AD-62996	433	UAUCAGCUGGGAAGAUAUCAA	482	UUGAUAUCUUCCCAGCUGAUAGA	670-692
AD-63000	434	UGUCCUAGGAACCUUUUAGAA	483	UUCUAAAAGGUUCCUAGGACACC	1313-1335

AD-63004	435	UCCAACAAAAUAGCAAUCCCU	484	AGGGAUUGCUAUUUUGUUGGAAA	1261-1283
AD-62977	436	GGUGUGCGGAAAGGCACUGAU	485	AUCAGUGCCUUUCCGCACACCCC	899-921
AD-62981	437	UUGAAACCAGUACUUUAUCAU	486	AUGAUAAAGUACUGGUUUCAAAA	579-601
AD-62985	438	UACUUCCAAAGUCUAUAUAUA	487	UAUAUAUAGACUUUGGAAGUACU	75-97_G21A
AD-62989	439	UCCUAGGAACCUUUUAGAAAU	488	AUUUCUAAAAGGUUCCUAGGACA	1315-1337_G21U
AD-62993	440	CUCCUGAGGAAAAUUUUGGAA	489	UUCCAAAAUUUUCCUCAGGAGAA	603-625_G21A
AD-62997	441	GCUCCGGAAUGUUGCUGAAAU	490	AUUUCAGCAACAUUCCGGAGCAU	181-203_C21U
AD-63001	442	GUGUUUGUGGGGAGACCAAUA	491	UAUUGGUCUCCCCACAAACACAG	953-975_C21A

Bảng 2b. Các trình tự không được cải biến HAO1 (ở chuột)

Tên cặp đôi	SEQ ID NO:	Trình tự sợi có nghĩa	SEQ ID NO:	Trình tự sợi đối nghĩa	Vị trí trong NM_010403.2
AD-62951	492	AUGGUGGUAAUUUGUGAUUUU	514	AAAAUCACAAAUUACCACCAUCC	1642-1664
AD-62956	493	GACUUGCAUCCUGGAAAUAUA	515	UAUAUUUCCAGGAUGCAAGUCCA	1338-1360
AD-62961	494	GGAAGGGAAGGUAGAAGUCUU	516	AAGACUUCUACCUUCCCUUCCAC	864-886
AD-62966	495	UGUCUUCUGUUUAGAUUUCCU	517	AGGAAAUCUAAACAGAAGACAGG	1506-1528
AD-62971	496	CUUUGGCUGUUUCCAAGAUCU	518	AGAUCUUGGAAACAGCCAAAGGA	1109-1131
AD-62936	497	AAUGUGUUUGGGCAACGUCAU	519	AUGACGUUGCCCAAACACAUUUU	1385-1407
AD-62942	498	UGUGACUGUGGACACCCCUUA	520	UAAGGGGUGUCCACAGUCACAAA	486-508

AD-6294 7	499	GAUGGGGUGCCAGCUA CUAUU	521	AAUAGUAGCUGGCACCC CAUCCA	814-836
AD-6295 2	500	GAAAAUGUGUUUGGGC AACGU	522	ACGUUGCCCAAACACAU UUUCAA	1382-1404
AD-6295 7	501	GGCUGUUUCCAAGAUC UGACA	523	UGUCAGAUCUUGGAAA CAGCCAA	1113-1135
AD-6296 2	502	UCCAACAAAAUAGCCAC CCCU	524	AGGGGUGGCUAUUUUG UUGGAAA	1258-1280
AD-6296 7	503	GUCUUCUGUUUAGAUU UCCUU	525	AAGGAAAUCUAAACAGA AGACAG	1507-1529
AD-6297 2	504	UGGAAGGGAAGGUAGA AGUCU	526	AGACUUCUACCUUCCCU UCCACA	863-885
AD-6293 7	505	UCCUUUGGCUGUUUCC AAGAU	527	AUCUUGGAAACAGCCAA AGGAUU	1107-1129
AD-6294 3	506	CAUCUCUCAGCUGGGA UGAUA	528	UAUCAUCCCAGCUGAGA GAUGGG	662-684

AD-6294 8	507	GGGGUGCCAGCUACUA UUGAU	529	AUCAAUAGUAGCUGGCA CCCCAU	817-839
AD-6295 3	508	AUGUGUUUGGGCAACG UCAUA	530	UAUGACGUUGCCCAAAC ACAUUU	1386-1408_C21 A
AD-6295 8	509	CUGUUUAGAUUUCCUU AAGAA	531	UUCUUAAGGAAAUCUA AACAGAA	1512-1534_C21 A
AD-6296 3	510	AGAAAGAAAUGGACUU GCAUA	532	UAUGCAAGUCCAUUUCU UUCUAG	1327-1349_C21 A
AD-6296 8	511	GCAUCCUGGAAAUAUA UUAAA	533	UUUAAUAUAUUUCCAG GAUGCAA	1343-1365_C21 A
AD-6297 3	512	CCUGUCAGACCAUGGGA ACUA	534	UAGUUCCCAUGGUCUG ACAGGCU	308-330_G21A
AD-6293 8	513	AAACAUGGUGUGGAUG GGAUA	535	UAUCCCAUCCACACCAU GUUUAA	763-785_C21A

Bảng 2c: Các trình tự không được cải biến HAO1 khác

Tên cặp đôi	SEQ ID NO:	Trình tự sợi có nghĩa	SEQ ID NO:	Trình tự sợi đối nghĩa	Vị trí trong NM_017545.2
AD-62933.2	394	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	443	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-62939.2	395	UUUUCAAUGGGUGUCCUAGGA	444	UCCUAGGACACCCAUUGAAAAGU	1302-1324
AD-62944.2	396	GAAAGUCAUCGACAAGACAUU	445	AAUGUCUUGUCGAUGACUUUCAC	1078-1100
AD-62949.2	397	UCAUCGACAAGACAUUGGUGA	446	UCACCAAUGUCUUGUCGAUGACU	1083-1105
AD-62954.2	398	UUUCAAUGGGUGUCCUAGGAA	447	UUCCUAGGACACCCAUUGAAAAG	1303-1325
AD-62959.2	399	AAUGGGUGUCCUAGGAACCUU	448	AAGGUUCCUAGGACACCCAUUGA	1307-1329
AD-62964.2	400	GACAGUGCACAAUAUUUUCCA	449	UGGAAAAUAUUGUGCACUGUCAG	1134-1156_C21A
AD-62969.2	401	ACUUUUCAAUGGGUGUCCUAA	450	UUAGGACACCCAUUGAAAAGUCA	1300-1322_G21A

AD-62934.2	402	AAGUCAUCGACAAGACAUUGA	451	UCAAUGUCUUGUCGAUGACUUUC	1080-1102_G21A
AD-62940.2	403	AUCGACAAGACAUUGGUGAGA	452	UCUCACCAAUGUCUUGUCGAUGA	1085-1107_G21A
AD-62945.2	404	GGGAGAAAGGUGUUCAAGAUA	453	UAUCUUGAACACCUUUCUCCCCC	996-1018_G21A
AD-62950.2	405	CUUUUCAAUGGGUGUCCUAGA	454	UCUAGGACACCCAUUGAAAAGUC	1301-1323_G21A
AD-62955.2	406	UCAAUGGGUGUCCUAGGAACA	455	UGUUCCUAGGACACCCAUUGAAA	1305-1327_C21A
AD-62960.2	407	UUGACUUUUCAAUGGGUGUCA	456	UGACACCCAUUGAAAAGUCAAAA	1297-1319_C21A
AD-62965.2	408	AAAGUCAUCGACAAGACAUUA	457	UAAUGUCUUGUCGAUGACUUUCA	1079-1101_G21A
AD-62970.2	409	CAGGGGGAGAAAGGUGUUCAA	458	UUGAACACCUUUCUCCCCCUGGA	992-1014
AD-62935.2	410	CAUUGGUGAGGAAAAAUCCUU	459	AAGGAUUUUUCCUCACCAAUGUC	1095-1117

AD-62941.2	411	ACAUUGGUGAGGAAAAAUCCU	460	AGGAUUUUUCCUCACCAAUGUCU	1094-1116
AD-62946.2	412	AGGGGGAGAAAGGUGUUCAAA	461	UUUGAACACCUUUCUCCCCCUGG	993-1015_G21A
AD-62974.2	413	CUCAGGAUGAAAAAUUUUGAA	462	UUCAAAAUUUUUCAUCCUGAGUU	563-585
AD-62978.2	414	CAGCAUGUAUUACUUGACAAA	463	UUUGUCAAGUAAUACAUGCUGAA	1173-1195
AD-62982.2	415	UAUGAACAACAUGCUAAAUCA	464	UGAUUUAGCAUGUUGUUCAUAAU	53-75
AD-62986.2	416	AUAUAUCCAAAUGUUUUAGGA	465	UCCUAAAACAUUUGGAUAUAUUC	1679-1701
AD-62990.2	417	CCAGAUGGAAGCUGUAUCCAA	466	UUGGAUACAGCUUCCAUCUGGAA	156-178
AD-62994.2	418	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	467	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-62998.2	419	CCCCGGCUAAUUUGUAUCAAU	468	AUUGAUACAAAUUAGCCGGGGGA	29-51
AD-63002.2	420	UUAAACAUGGCUUGAAUGGGA	469	UCCCAUUCAAGCCAUGUUUAACA	765-787
AD-62975.2	421	AAUGUGUUUAGACAACGUCAU	470	AUGACGUUGUCUAAACACAUUUU	1388-1410
AD-62979.2	422	ACUAAAGGAAGAAUUCCGGUU	471	AACCGGAAUUCUUCCUUUAGUAU	1027-1049

AD-62983.2	423	UAUAUCCAAAUGUUUUAGGAU	472	AUCCUAAAACAUUUGGAUAUAUU	1680-1702
AD-62987.2	424	GUGCGGAAAGGCACUGAUGUU	473	AACAUCAGUGCCUUUCCGCACAC	902-924
AD-62991.2	425	UAAAACAGUGGUUCUUAAAUU	474	AAUUUAAGAACCACUGUUUUAAA	1521-1543
AD-62995.2	426	AUGAAAAAUUUUGAAACCAGU	475	ACUGGUUUCAAAAUUUUUCAUCC	569-591
AD-62999.2	427	AACAAAAUAGCAAUCCCUUUU	476	AAAAGGGAUUGCUAUUUUGUUGG	1264-1286
AD-63003.2	428	CUGAAACAGAUCUGUCGACUU	477	AAGUCGACAGAUCUGUUUCAGCA	195-217
AD-62976.2	429	UUGUUGCAAAGGGCAUUUUGA	478	UCAAAAUGCCCUUUGCAACAAUU	720-742
AD-62980.2	430	CUCAUUGUUUAUUAACCUGUA	479	UACAGGUUAAUAAACAAUGAGAU	1483-1505
AD-62984.2	431	CAACAAAAUAGCAAUCCCUUU	480	AAAGGGAUUGCUAUUUUGUUGGA	1263-1285
AD-62992.2	432	CAUUGUUUAUUAACCUGUAUU	481	AAUACAGGUUAAUAAACAAUGAG	1485-1507
AD-62996.2	433	UAUCAGCUGGGAAGAUAUCAA	482	UUGAUAUCUUCCCAGCUGAUAGA	670-692
AD-63000.2	434	UGUCCUAGGAACCUUUUAGAA	483	UUCUAAAAGGUUCCUAGGACACC	1313-1335

AD-63004.2	435	UCCAACAAAAUAGCAAUCCCU	484	AGGGAUUGCUAUUUUGUUGGAAA	1261-1283
AD-62977.2	436	GGUGUGCGGAAAGGCACUGAU	485	AUCAGUGCCUUUCCGCACACCCC	899-921
AD-62981.2	437	UUGAAACCAGUACUUUAUCAU	486	AUGAUAAAGUACUGGUUUCAAAA	579-601
AD-62985.2	438	UACUUCCAAAGUCUAUAUAUA	487	UAUAUAUAGACUUUGGAAGUACU	75-97_G21A
AD-62989.2	439	UCCUAGGAACCUUUUAGAAAU	488	AUUUCUAAAAGGUUCCUAGGACA	1315-1337_G21U
AD-62993.2	440	CUCCUGAGGAAAAUUUUGGAA	489	UUCCAAAAUUUUCCUCAGGAGAA	603-625_G21A
AD-62997.2	441	GCUCCGGAAUGUUGCUGAAAU	490	AUUUCAGCAACAUUCCGGAGCAU	181-203_C21U
AD-63001.2	442	GUGUUUGUGGGGAGACCAAUA	491	UAUUGGUCUCCCCACAAACACAG	953-975_C21A
AD-62951.2	492	AUGGUGGUAAUUUGUGAUUUU	514	AAAAUCACAAAUUACCACCAUCC	1642-1664
AD-62956.2	493	GACUUGCAUCCUGGAAAUAUA	515	UAUAUUUCCAGGAUGCAAGUCCA	1338-1360

AD-62961.2	494	GGAAGGGAAGGUAGAAGUCUU	516	AAGACUUCUACCUUCCCUUCCAC	864-886
AD-62966.2	495	UGUCUUCUGUUUAGAUUUCCU	517	AGGAAAUCUAAACAGAAGACAGG	1506-1528
AD-62971.2	496	CUUUGGCUGUUUCCAAGAUCU	518	AGAUCUUGGAAACAGCCAAAGGA	1109-1131
AD-62936.2	497	AAUGUGUUUGGGCAACGUCAU	519	AUGACGUUGCCCAAACACAUUUU	1385-1407
AD-62942.2	498	UGUGACUGUGGACACCCCUUA	520	UAAGGGGUGUCCACAGUCACAAA	486-508
AD-62947.2	499	GAUGGGGUGCCAGCUACUAUU	521	AAUAGUAGCUGGCACCCCAUCCA	814-836
AD-62952.2	500	GAAAAUGUGUUUGGGCAACGU	522	ACGUUGCCCAAACACAUUUUCAA	1382-1404
AD-62957.2	501	GGCUGUUUCCAAGAUCUGACA	523	UGUCAGAUCUUGGAAACAGCCAA	1113-1135
AD-62962.2	502	UCCAACAAAAUAGCCACCCCU	524	AGGGGUGGCUAUUUUGUUGGAAA	1258-1280
AD-62967.2	503	GUCUUCUGUUUAGAUUUCCUU	525	AAGGAAAUCUAAACAGAAGACAG	1507-1529
AD-62972.2	504	UGGAAGGGAAGGUAGAAGUCU	526	AGACUUCUACCUUCCCUUCCACA	863-885
AD-62937.2	505	UCCUUUGGCUGUUUCCAAGAU	527	AUCUUGGAAACAGCCAAAGGAUU	1107-1129

AD-62943.2	506	CAUCUCUCAGCUGGGAUGAUA	528	UAUCAUCCCAGCUGAGAGAUGGG	662-684
AD-62948.2	507	GGGGUGCCAGCUACUAUUGAU	529	AUCAAUAGUAGCUGGCACCCCAU	817-839
AD-62953.2	508	AUGUGUUUGGGCAACGUCAUA	530	UAUGACGUUGCCCAAACACAUUU	1386-1408_C21A
AD-62958.2	509	CUGUUUAGAUUUCCUUAAGAA	531	UUCUUAAGGAAAUCUAAACAGAA	1512-1534_C21A
AD-62963.2	510	AGAAAGAAAUGGACUUGCAUA	532	UAUGCAAGUCCAUUUCUUUCUAG	1327-1349_C21A
AD-62968.2	511	GCAUCCUGGAAAUAUAUUAAA	533	UUUAAUAUAUUUCCAGGAUGCAA	1343-1365_C21A
AD-62973.2	512	CCUGUCAGACCAUGGGAACUA	534	UAGUUCCCAUGGUCUGACAGGCU	308-330_G21A
AD-62938.2	513	AAACAUGGUGUGGAUGGGAUA	535	UAUCCCAUCCACACCAUGUUUAA	763-785_C21A
AD-62933.1	536	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	653	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65630.1	537	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	654	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094

AD-65636.1	538	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	655	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65642.1	539	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	656	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65647.1	540	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	657	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65652.1	541	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	658	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65657.1	542	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	659	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65662.1	543	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	660	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65625.1	544	AUGUGAAAGUCAUCGACAA	661	UUGUCGAUGACUUUCACAUUC	1072-1094
AD-65631.1	545	AUGUGAAAGUCAUCGACAA	662	UUGUCGAUGACUUUCACAUUC	1072-1094
AD-65637.1	546	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	663	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65643.1	547	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	664	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65648.1	548	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	665	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65653.1	549	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	666	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094

AD-65658.1	550	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	667	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65663.1	551	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	668	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65626.1	552	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	669	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65638.1	553	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	670	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65644.1	554	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	671	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65649.1	555	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	672	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65654.1	556	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	673	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65659.1	557	GAAUGTGAAAGUCAUCGACAA	674	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65627.1	558	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	675	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65633.1	559	GAAUGTGAAAGUCAUCGACAA	676	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65639.1	560	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	677	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65645.1	561	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	678	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094

AD-65650.1	562	GAAUGUGAAAGUCAUCTACAA	679	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65655.1	563	GAAUGUGAAAGUCAUCACAA	680	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65660.1	564	GAAUGUGAAAGUCATCTACAA	681	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65665.1	565	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	682	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65628.1	566	GAAUGUGAAAGUCAUCTACAA	683	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65634.1	567	GAAUGUGAAAGUCAUCACAA	684	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-65646.1	568	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	685	UTGUCGAUGACUUTCACAUUCUG	1072-1094
AD-65656.1	569	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	686	UUGUCGAUGACUUTCACAUUCUG	1072-1094
AD-65661.1	570	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	687	UTGUCGAUGACUUTCACAUUCUG	1072-1094
AD-65666.1	571	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	688	UUGUCGAUGACUUTCACAUUCUG	1072-1094
AD-65629.1	572	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	689	UTGUCGAUGACUUTCACAUUCUG	1072-1094
AD-65635.1	573	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	690	UTGUCGAUGACUUTCACAUUCUG	1072-1094

AD-65641.1	574	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	691	UTGUCGAUGACUUTCACAUUCUG	1072-1094
AD-62994.1	575	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	692	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65595.1	576	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	693	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65600.1	577	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	694	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65610.1	578	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	695	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65615.1	579	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	696	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65620.1	580	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	697	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65584.1	581	CUUUCAUCCUGGAAAUAUA	698	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUC	1341-1361
AD-65590.1	582	CUUUCAUCCUGGAAAUAUA	699	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUC	1341-1361
AD-65596.1	583	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	700	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65601.1	584	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	701	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65606.1	585	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	702	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363

AD-65611.1	586	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	703	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65616.1	587	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	704	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65621.1	588	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	705	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65585.1	589	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	706	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65591.1	590	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	707	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65597.1	591	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	708	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65602.1	592	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	709	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65607.1	593	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	710	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65612.1	594	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	711	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65622.1	595	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	712	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65586.1	596	GACUTUCAUCCUGGAAAUAUA	713	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65592.1	597	GACUUTCAUCCUGGAAAUAUA	714	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363

AD-65598.1	598	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	715	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65603.1	599	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	716	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65608.1	600	GACUUUCAUCCUGGAATUAUA	717	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65613.1	601	GACUUUCAUCCUGGAAUAUA	718	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65618.1	602	GACUUUCAUCCUGGAATUAUA	719	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65623.1	603	GACUUUCAUCCUGGAATUAUA	720	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65587.1	604	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	721	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65593.1	605	GACUUTCAUCCUGGAAAUAUA	722	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65599.1	606	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	723	UAUAUUUCCAGGATGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65604.1	607	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	724	UAUAUUUCCAGGATGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65609.1	608	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	725	UAUAUUUCCAGGATGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65614.1	609	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	726	UAUAUTUCCAGGATGAAAGUCCA	1341-1363

AD-65619.1	610	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	727	UAUAUTUCCAGGATGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65624.1	611	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	728	UAUAUUUCCAGGATGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65588.1	612	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	729	UAUAUTUCCAGGATGAAAGUCCA	1341-1363
AD-65594.1	613	GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA	730	UAUAUUUCCAGGATGAAAGUCCA	1341-1363
AD-68309.1	614	AGAAAGGUGUUCAAGAUGUCA	731	UGACAUCUUGAACACCUUUCUCC	1001-1022_C21A
AD-68303.1	615	CAUCCUGGAAAUAUAUUAACU	732	AGUUAAUAUAUUUCCAGGAUGAA	1349-1370
AD-65626.5	616	GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA	733	UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG	1072-1094
AD-68295.1	617	AGUGCACAAUAUUUUCCCAUA	734	UAUGGGAAAAUAUUGUGCACUGU	1139-1160_C21A
AD-68273.1	618	GAAAGUCAUCGACAAGACAUU	735	AAUGUCUUGUCGAUGACUUUCAC	1080-1100
AD-68297.1	619	AAUGUGAAAGUCAUCGACAAA	736	UUUGUCGAUGACUUUCACAUUCU	1075-1096_G21A
AD-68287.1	620	CUGGAAAUAUAUUAACUGUUA	737	UAACAGUUAAUAUAUUUCCAGGA	1353-1374

AD-68300.1	621	AUUUUCCCAUCUGUAUUAUUU	738	AAAUAAUACAGAUGGGAAAAUAU	1149-1170
AD-68306.1	622	UGUCGUUCUUUUCCAACAAAA	739	UUUUGUUGGAAAAGAACGACACC	1252-1273
AD-68292.1	623	AUCCUGGAAAUAUAUUAACUA	740	UAGUUAAUAUAUUUCCAGGAUGA	1350-1371_G21A
AD-68298.1	624	GCAUUUUGAGAGGUGAUGAUA	741	UAUCAUCACCUCUCAAAAUGCCC	734-755_G21A
AD-68277.1	625	CAGGGGGAGAAAGGUGUUCAA	742	UUGAACACCUUUCUCCCCCUGGA	994-1014
AD-68289.1	626	GGAAAUAUAUUAACUGUUAAA	743	UUUAACAGUUAAUAUAUUUCCAG	1355-1376
AD-68272.1	627	CAUUGGUGAGGAAAAAUCCUU	744	AAGGAUUUUUCCUCACCAAUGUC	1097-1117
AD-68282.1	628	GGGAGAAAGGUGUUCAAGAUA	745	UAUCUUGAACACCUUUCUCCCCC	998-1018_G21A
AD-68285.1	629	GGCAUUUUGAGAGGUGAUGAU	746	AUCAUCACCUCUCAAAAUGCCCU	733-754
AD-68290.1	630	UACAAAGGGUGUCGUUCUUUU	747	AAAAGAACGACACCCUUUGUAUU	1243-1264
AD-68296.1	631	UGGGAUCUUGGUGUCGAAUCA	748	UGAUUCGACACCAAGAUCCCAUU	783-804

AD-68288.1	632	CUGACAGUGCACAAUAUUUUA	749	UAAAAUAUUGUGCACUGUCAGAU	1134-1155_C21A
AD-68299.1	633	CAGUGCACAAUAUUUUCCCAU	750	AUGGGAAAAUAUUGUGCACUGUC	1138-1159
AD-68275.1	634	ACUUUUCAAUGGGUGUCCUAA	751	UUAGGACACCCAUUGAAAAGUCA	1302-1322_G21A
AD-68274.1	635	ACAUUGGUGAGGAAAAAUCCU	752	AGGAUUUUUCCUCACCAAUGUCU	1096-1116
AD-68294.1	636	UUGCUUUUGACUUUUCAAUGA	753	UCAUUGAAAAGUCAAAAGCAAUG	1293-1314_G21A
AD-68302.1	637	CAUUUUGAGAGGUGAUGAUGA	754	UCAUCAUCACCUCUCAAAAUGCC	735-756_C21A
AD-68279.1	638	UUGACUUUUCAAUGGGUGUCA	755	UGACACCCAUUGAAAAGUCAAAA	1299-1319_C21A
AD-68304.1	639	CGACUUCUGUUUUAGGACAGA	756	UCUGUCCUAAAACAGAAGUCGAC	212-233
AD-68286.1	640	CUCUGAGUGGGUGCCAGAAUA	757	UAUUCUGGCACCCACUCAGAGCC	1058-1079_G21A

AD-68291.1	641	GGGUGCCAGAAUGUGAAAGUA	758	UACUUUCACAUUCUGGCACCCAC	1066-1087_C21A
AD-68283.1	642	UCAAUGGGUGUCCUAGGAACA	759	UGUUCCUAGGACACCCAUUGAAA	1307-1327_C21A
AD-68280.1	643	AAAGUCAUCGACAAGACAUUA	760	UAAUGUCUUGUCGAUGACUUUCA	1081-1101_G21A
AD-68293.1	644	AUUUUGAGAGGUGAUGAUGCA	761	UGCAUCAUCACCUCUCAAAAUGC	736-757_C21A
AD-68276.1	645	AUCGACAAGACAUUGGUGAGA	762	UCUCACCAAUGUCUUGUCGAUGA	1087-1107_G21A
AD-68308.1	646	GGUGCCAGAAUGUGAAAGUCA	763	UGACUUUCACAUUCUGGCACCCA	1067-1088
AD-68278.1	647	GACAGUGCACAAUAUUUUCCA	764	UGGAAAAUAUUGUGCACUGUCAG	1136-1156_C21A
AD-68307.1	648	ACAAAGAGACACUGUGCAGAA	765	UUCUGCACAGUGUCUCUUUGUCA	1191-1212_G21A
AD-68284.1	649	UUUUCAAUGGGUGUCCUAGGA	766	UCCUAGGACACCCAUUGAAAAGU	1304-1324

AD-68301.1	650	CCGUUUCCAAGAUCUGACAGU	767	ACUGUCAGAUCUUGGAAACGGCC	1121-1142
AD-68281.1	651	AGGGGGAGAAAGGUGUUCAAA	768	UUUGAACACCUUUCUCCCCCUGG	995-1015_G21A
AD-68305.1	652	AGUCAUCGACAAGACAUUGGU	769	ACCAAUGUCUUGUCGAUGACUUU	1083-1104

Ví dụ 2. Sàng lọc liều lượng đơn lẻ *in vitro* ở tế bào gan khỉ sơ cấp.

Các cặp đôi siARN HAO1 được cải biến và được liên hợp được đánh giá về hiệu lực bằng thử nghiệm chuyển nạp ở tế bào gan khỉ sơ cấp. siARN HAO1 được chuyển nạp ở hai liều lượng, 10 nM và 0,1 nM. Kết quả của các thử nghiệm này được thể hiện trên Bảng 3 và dữ liệu được biểu diễn dưới dạng phân số của thông tin còn lại trong tế bào được chuyển nhiễm bằng siARN hướng đích HAO1, với tế bào được chuyển nhiễm bằng siARN đối chứng âm, AD-1955 ± độ lệch chuẩn (SD).

Kết quả cũng được thể hiện trên Hình 3A. Hình 3B minh họa đáp ứng liều lượng với một trong số các thể liên hợp có hoạt tính nhất (#31) (AD-62933) từ sàng lọc hai liều lượng sơ cấp; IC50 bằng ~19 pM.

Bảng 3a. Sàng lọc liều lượng đơn lẻ HAO1 ở tế bào gan khỉ.

ID CẶP ĐÔI	**Loài**	**10nM PCH**	**0,1nM PCH**	SD 10nM PCH	SD 0,1nM PCH
AD-62974	Hs	5,3	29,8	1,87	11,11
AD-62975	Hs	7,6	31,3	0,34	1,99
AD-62976	Hs	4,7	35,5	0,34	13,90
AD-62977	Hs	29,2	66,9	8,32	43,88
AD-62978	Hs	3,8	8,9	0,15	4,29

AD-62979	Hs	27,5	80,7	1,35	19,58
AD-62980	Hs	7,4	32,2	1,26	1,42
AD-62981	Hs	18,7	49,9	3,46	12,83
AD-62982	Hs	2,2	8,5	0,10	7,71
AD-62983	Hs	19,4	41,0	11,19	6,60
AD-62984	Hs	6,7	13,3	1,05	2,60
AD-62985	Hs	2,3	8,3	0,24	2,68
AD-62986	Hs	39,0	57,2	3,82	16,31
AD-62987	Hs	11,5	17,8	14,62	15,39
AD-62989	Hs	10,6	34,2	2,23	2,68
AD-62990	Hs	12,0	18,4	9,11	5,23
AD-62991	Hs	7,2	14,2	1,30	2,96
AD-62992	Hs	3,9	16,0	1,15	1,80
AD-62993	Hs	22,3	58,4	9,91	6,28
AD-62994	Hs	3,2	10,8	1,21	1,69
AD-62995	Hs	5,5	17,6	4,58	3,25
AD-62996	Hs	3,4	20,7	2,16	3,73
AD-62997	Hs	4,5	24,2	0,67	3,32
AD-62998	Hs	4,3	14,7	0,49	0,29
AD-62999	Hs	11,4	15,5	1,23	2,50
AD-63000	Hs	45,5	90,6	13,41	43,49
AD-63001	Hs	13,3	31,0	0,20	2,13
AD-63002	Hs	6,6	22,0	0,26	5,75

AD-63003	Hs	36,8	5,1	47,09	0,60
AD-63004	Hs	12,7	35,4	1,55	9,42
AD-62933	Hs/Mm	5,8	13,4	0,71	0,13
AD-62934	Hs/Mm	52,2	35,9	6,64	5,08
AD-62935	Hs/Mm	7,7	22,7	1,53	4,97
AD-62939	Hs/Mm	25,1	49,0	9,48	2,88
AD-62940	Hs/Mm	11,9	50,4	4,12	13,91
AD-62941	Hs/Mm	9,6	30,3	7,28	3,11
AD-62944	Hs/Mm	8,0	18,5	1,40	5,63
AD-62945	Hs/Mm	22,9	36,5	17,16	13,81
AD-62946	Hs/Mm	19,3	29,5	15,29	1,74
AD-62949	Hs/Mm	34,1	84,2	18,11	18,42
AD-62950	Hs/Mm	12,7	36,2	5,69	6,54
AD-62954	Hs/Mm	46,0	53,2	37,57	10,61
AD-62955	Hs/Mm	24,6	36,0	0,97	16,36
AD-62959	Hs/Mm	32,3	37,4	12,49	12,08
AD-62960	Hs/Mm	18,1	37,5	2,12	3,12
AD-62964	Hs/Mm	16,2	52,4	5,59	22,40
AD-62965	Hs/Mm	18,5	34,5	3,77	22,38
AD-62969	Hs/Mm	11,7	34,0	0,17	12,55
AD-62970	Hs/Mm	13,6	21,2	1,13	5,85
AD-62936	Mm	91,3	55,6	16,03	0,27
AD-62937	Mm	45,8	77,7	22,77	47,01

AD-62938	Mm	78,3	55,1	8,81	2,70
AD-62942	Mm	18,8	21,7	7,34	8,00
AD-62943	Mm	6,7	31,0	0,79	7,22
AD-62947	Mm	27,9	82,0	14,01	2,01
AD-62948	Mm	21,9	52,5	6,56	21,01
AD-62951	Mm	40,1	77,4	8,76	3,03
AD-62952	Mm	33,7	69,9	17,76	1,71
AD-62953	Mm	79,9	65,1	96,61	22,79
AD-62956	Mm	7,6	16,4	1,01	12,39
AD-62957	Mm	6,7	21,3	0,99	3,02
AD-62958	Mm	38,9	54,4	21,66	29,39
AD-62961	Mm	35,3	66,0	0,35	24,65
AD-62962	Mm	70,7	63,7	21,17	26,36
AD-62963	Mm	35,1	66,5	35,49	9,42
AD-62966	Mm	69,0	100,3	17,07	3,44
AD-62967	Mm	90,7	116,7	22,01	47,77
AD-62968	Mm	46,3	72,2	28,37	67,08
AD-62971	Mm	17,9	46,3	1,23	23,41
AD-62972	Mm	75,6	122,9	24,75	18,00
AD-62973	Mm	102,8	73,9	22,49	14,39

Bảng 3b. Sàng lọc liều lượng đơn lẻ HAO1 khác ở tế bào gan khỉ sơ cấp.

ID CẶP ĐÔI	Loài	10nM PCH	0,1nM PCH	SD 10nM PCH	SD 0,1nM PCH
AD-62974.2	Hs	5,3	29,8	1,87	11,11
AD-62975.2	Hs	7,6	31,3	0,34	1,99
AD-62976.2	Hs	4,7	35,5	0,34	13,90
AD-62977.2	Hs	29,2	66,9	8,32	43,88
AD-62978.2	Hs	3,8	8,9	0,15	4,29
AD-62979.2	Hs	27,5	80,7	1,35	19,58
AD-62980.2	Hs	7,4	32,2	1,26	1,42
AD-62981.2	Hs	18,7	49,9	3,46	12,83
AD-62982.2	Hs	2,2	8,5	0,10	7,71
AD-62983.2	Hs	19,4	41,0	11,19	6,60
AD-62984.2	Hs	6,7	13,3	1,05	2,60
AD-62985.2	Hs	2,3	8,3	0,24	2,68
AD-62986.2	Hs	39,0	57,2	3,82	16,31
AD-62987.2	Hs	11,5	17,8	14,62	15,39
AD-62989.2	Hs	10,6	34,2	2,23	2,68
AD-62990.2	Hs	12,0	18,4	9,11	5,23
AD-62991.2	Hs	7,2	14,2	1,30	2,96
AD-62992.2	Hs	3,9	16,0	1,15	1,80
AD-62993.2	Hs	22,3	58,4	9,91	6,28

AD-62994.2	Hs	3,2	10,8	1,21	1,69
AD-62995.2	Hs	5,5	17,6	4,58	3,25
AD-62996.2	Hs	3,4	20,7	2,16	3,73
AD-62997.2	Hs	4,5	24,2	0,67	3,32
AD-62998.2	Hs	4,3	14,7	0,49	0,29
AD-62999.2	Hs	11,4	15,5	1,23	2,50
AD-63000.2	Hs	45,5	90,6	13,41	43,49
AD-63001.2	Hs	13,3	31,0	0,20	2,13
AD-63002.2	Hs	6,6	22,0	0,26	5,75
AD-63003.2	Hs	36,8	5,1	47,09	0,60
AD-63004.2	Hs	12,7	35,4	1,55	9,42
AD-62933.2	Hs/Mm	5,8	13,4	0,71	0,13
AD-62934.2	Hs/Mm	52,2	35,9	6,64	5,08
AD-62935.2	Hs/Mm	7,7	22,7	1,53	4,97
AD-62939.2	Hs/Mm	25,1	49,0	9,48	2,88
AD-62940.2	Hs/Mm	11,9	50,4	4,12	13,91
AD-62941.2	Hs/Mm	9,6	30,3	7,28	3,11
AD-62944.2	Hs/Mm	8,0	18,5	1,40	5,63
AD-62945.2	Hs/Mm	22,9	36,5	17,16	13,81
AD-62946.2	Hs/Mm	19,3	29,5	15,29	1,74
AD-62949.2	Hs/Mm	34,1	84,2	18,11	18,42
AD-62950.2	Hs/Mm	12,7	36,2	5,69	6,54
AD-62954.2	Hs/Mm	46,0	53,2	37,57	10,61

AD-62955.2	Hs/Mm	24,6	36,0	0,97	16,36
AD-62959.2	Hs/Mm	32,3	37,4	12,49	12,08
AD-62960.2	Hs/Mm	18,1	37,5	2,12	3,12
AD-62964.2	Hs/Mm	16,2	52,4	5,59	22,40
AD-62965.2	Hs/Mm	18,5	34,5	3,77	22,38
AD-62969.2	Hs/Mm	11,7	34,0	0,17	12,55
AD-62970.2	Hs/Mm	13,6	21,2	1,13	5,85
AD-62936.2	Mm	91,3	55,6	16,03	0,27
AD-62937.2	Mm	45,8	77,7	22,77	47,01
AD-62938.2	Mm	78,3	55,1	8,81	2,70
AD-62942.2	Mm	18,8	21,7	7,34	8,00
AD-62943.2	Mm	6,7	31,0	0,79	7,22
AD-62947.2	Mm	27,9	82,0	14,01	2,01
AD-62948.2	Mm	21,9	52,5	6,56	21,01
AD-62951.2	Mm	40,1	77,4	8,76	3,03
AD-62952.2	Mm	33,7	69,9	17,76	1,71
AD-62953.2	Mm	79,9	65,1	96,61	22,79
AD-62956.2	Mm	7,6	16,4	1,01	12,39
AD-62957.2	Mm	6,7	21,3	0,99	3,02
AD-62958.2	Mm	38,9	54,4	21,66	29,39
AD-62961.2	Mm	35,3	66,0	0,35	24,65
AD-62962.2	Mm	70,7	63,7	21,17	26,36
AD-62963.2	Mm	35,1	66,5	35,49	9,42

AD-62966.2	Mm	69,0	100,3	17,07	3,44
AD-62967.2	Mm	90,7	116,7	22,01	47,77
AD-62968.2	Mm	46,3	72,2	28,37	67,08
AD-62971.2	Mm	17,9	46,3	1,23	23,41
AD-62972.2	Mm	75,6	122,9	24,75	18,00
AD-62973.2	Mm	102,8	73,9	22,49	14,39

Ví dụ 3. Sàng lọc liều lượng đơn lẻ *in vitro* ở tế bào gan chuột sơ cấp.

Các cặp đôi siARN HAO1 được cải biến và được liên hợp được đánh giá về hiệu lực bằng thử nghiệm chuyển nạp ở tế bào gan chuột sơ cấp. siARN HAO1 được chuyển nạp ở hai liều lượng, 20 nM và 0,2 nM. Kết quả của các thử nghiệm này được thể hiện trên Bảng 4 và dữ liệu được biểu diễn dưới dạng phân số của thông tin còn lại trong tế bào được chuyển nhiễm bằng siARN hướng đích HAO1, với tế bào được chuyển nhiễm bằng siARN đối chứng âm, AD-1955 ± độ lệch chuẩn (SD).

Bảng 4a. Sàng lọc liều lượng đơn lẻ HAO1 ở tế bào gan chuột sơ cấp.

ID CẶP ĐÔI	Loài	20nM PMH	0,2nM PMH	SD 20nM PMH	SD 0,2nM PMH
AD-62974	Hs	1,5	11,5	0,3	8,5
AD-62975	Hs	6,2	24,5	1,9	19,4
AD-62976	Hs	8,3	60,0	3,9	7,9
AD-62977	Hs	69,1	106,9	44,8	18,3
AD-62978	Hs	30,0	46,3	26,0	27,3
AD-62979	Hs	50,7	59,5	45,6	43,4
AD-62980	Hs	65,4	89,5	68,9	29,3

AD-62981	Hs	65,8	83,3	31,9	23,7
AD-62982	Hs	86,6	67,0	92,1	65,5
AD-62983	Hs	81,5	103,6	61,3	68,0
AD-62984	Hs	13,5	51,8	1,2	37,7
AD-62985	Hs	53,8	37,7	38,1	26,3
AD-62986	Hs	138,5	153,4	140,7	119,6
AD-62987	Hs	39,0	99,6	44,9	110,7
AD-62989	Hs	17,1	2,2	23,1	1,6
AD-62990	Hs	4,3	46,3	4,6	46,4
AD-62991	Hs	125,2	102,6	111,9	92,9
AD-62992	Hs	64,7	65,6	67,8	55,8
AD-62993	Hs	83,8	79,0	63,0	22,2
AD-62994	Hs	1,9	5,4	1,5	0,2
AD-62995	Hs	2,9	17,4	1,8	13,8
AD-62996	Hs	49,3	61,4	43,6	49,9
AD-62997	Hs	60,2	83,4	19,1	45,7
AD-62998	Hs	73,5	86,7	71,5	69,4
AD-62999	Hs	38,7	50,0	29,5	22,7
AD-63000	Hs	27,3	56,6	26,1	41,4
AD-63001	Hs	56,6	83,8	52,9	13,5
AD-63002	Hs	81,6	74,2	67,4	70,5
AD-63003	Hs	46,4	47,7	42,4	21,4
AD-63004	Hs	28,6	64,5	17,0	44,5

AD-62933	Hs/Mm	1,1	4,6	0,5	4,0
AD-62934	Hs/Mm	7,6	43,4	0,6	32,6
AD-62935	Hs/Mm	1,3	7,0	0,3	3,4
AD-62939	Hs/Mm	6,1	21,4	2,2	14,5
AD-62940	Hs/Mm	6,0	16,9	1,4	3,8
AD-62941	Hs/Mm	5,6	8,5	3,9	6,3
AD-62944	Hs/Mm	3,3	4,3	2,9	4,5
AD-62945	Hs/Mm	6,4	7,0	1,0	7,2
AD-62946	Hs/Mm	18,3	21,4	19,2	21,1
AD-62949	Hs/Mm	11,4	43,7	8,9	38,3
AD-62950	Hs/Mm	9,9	21,9	4,7	20,8
AD-62954	Hs/Mm	9,4	65,5	0,2	64,3
AD-62955	Hs/Mm	5,8	21,8	5,5	5,8
AD-62959	Hs/Mm	4,2	9,6	1,8	5,3
AD-62960	Hs/Mm	5,4	10,1	3,8	2,5
AD-62964	Hs/Mm	3,7	21,2	0,9	12,7
AD-62965	Hs/Mm	8,0	20,8	5,3	23,5
AD-62969	Hs/Mm	6,4	4,7	3,8	5,1
AD-62970	Hs/Mm	19,6	5,2	14,6	6,1
AD-62936	Mm	7,0	17,5	0,1	9,9
AD-62937	Mm	4,0	16,9	0,8	10,2
AD-62938	Mm	4,0	49,1	0,7	42,4
AD-62942	Mm	3,4	4,9	1,2	5,3

AD-62943	Mm	3,8	14,9	2,2	10,6
AD-62947	Mm	10,9	6,4	9,6	1,6
AD-62948	Mm	6,7	18,7	6,9	15,8
AD-62951	Mm	8,1	11,8	8,6	14,5
AD-62952	Mm	9,4	23,2	10,1	29,2
AD-62953	Mm	11,3	10,3	13,7	12,1
AD-62956	Mm	2,2	3,9	1,8	1,6
AD-62957	Mm	3,2	22,5	3,1	20,0
AD-62958	Mm	7,5	16,0	5,8	13,2
AD-62961	Mm	4,3	6,9	2,8	5,6
AD-62962	Mm	17,1	42,4	14,2	49,5
AD-62963	Mm	2,3	10,8	0,6	8,3
AD-62966	Mm	5,7	11,6	5,8	5,6
AD-62967	Mm	3,8	21,7	2,0	23,0
AD-62968	Mm	3,5	9,4	0,3	9,0
AD-62971	Mm	4,6	3,1	5,0	2,7
AD-62972	Mm	13,8	22,7	17,0	24,9
AD-62973	Mm	19,3	51,9	19,7	21,9

Bảng 4b. Sàng lọc liều lượng đơn lẻ HAO1 khác ở tế bào gan chuột sơ cấp.

ID CẶP ĐÔI	Loài	Tên oligo có nghĩa	20nM PMH	0,2nM PMH	SD 20nM PMH	SD 0,2nM PMH
AD-62974.2	Hs	A-126176.1	1,5	11,5	0,3	8,5
AD-62975.2	Hs	A-126192.1	6,2	24,5	1,9	19,4
AD-62976.2	Hs	A-126208.1	8,3	60,0	3,9	7,9
AD-62977.2	Hs	A-126224.1	69,1	106,9	44,8	18,3
AD-62978.2	Hs	A-126178.1	30,0	46,3	26,0	27,3
AD-62979.2	Hs	A-126194.1	50,7	59,5	45,6	43,4
AD-62980.2	Hs	A-126210.1	65,4	89,5	68,9	29,3
AD-62981.2	Hs	A-126226.1	65,8	83,3	31,9	23.7
AD-62982.2	Hs	A-126180.1	86,6	67,0	92,1	65,5
AD-62983.2	Hs	A-126196.1	81,5	103,6	61,3	68,0
AD-62984.2	Hs	A-126212.1	13,5	51,8	1,2	37,7
AD-62985.2	Hs	A-126228.1	53,8	37,7	38,1	26,3
AD-62986.2	Hs	A-126182.1	138,5	153,4	140,7	119,6
AD-62987.2	Hs	A-126198.1	39,0	99,6	44,9	110,7
AD-62989.2	Hs	A-126230.1	17,1	2,2	23,1	1,6
AD-62990.2	Hs	A-126184.1	4,3	46,3	4,6	46,4
AD-62991.2	Hs	A-126200.1	125,2	102,6	111,9	92,9
AD-62992.2	Hs	A-126216.1	64,7	65,6	67,8	55,8
AD-62993.2	Hs	A-126232.1	83,8	79,0	63,0	22,2

AD-62994.2	Hs	A-126186.1	1,9	5,4	1,5	0,2
AD-62995.2	Hs	A-126202.1	2,9	17,4	1,8	13,8
AD-62996.2	Hs	A-126218.1	49,3	61,4	43,6	49,9
AD-62997.2	Hs	A-126234.1	60,2	83,4	19,1	45,7
AD-62998.2	Hs	A-126188.1	73,5	86,7	71,5	69,4
AD-62999.2	Hs	A-126204.1	38,7	50,0	29,5	22,7
AD-63000.2	Hs	A-126220.1	27,3	56,6	26,1	41,4
AD-63001.2	Hs	A-126236.1	56,6	83,8	52,9	13,5
AD-63002.2	Hs	A-126190.1	81,6	74,2	67,4	70,5
AD-63003.2	Hs	A-126206.1	46,4	47,7	42,4	21,4
AD-63004.2	Hs	A-126222.1	28,6	64,5	17,0	44,5
AD-62933.2	Hs/Mm	A-126094.1	1,1	4,6	0,5	4,0
AD-62934.2	Hs/Mm	A-126110.1	7,6	43,4	0,6	32,6
AD-62935.2	Hs/Mm	A-126126.1	1,3	7,0	0,3	3,4
AD-62939.2	Hs/Mm	A-126096.1	6,1	21,4	2,2	14,5
AD-62940.2	Hs/Mm	A-126112.1	6,0	16,9	1,4	3,8
AD-62941.2	Hs/Mm	A-126128.1	5,6	8,5	3,9	6,3
AD-62944.2	Hs/Mm	A-126098.1	3,3	4,3	2,9	4,5
AD-62945.2	Hs/Mm	A-126114.1	6,4	7,0	1,0	7,2
AD-62946.2	Hs/Mm	A-126130.1	18,3	21,4	19,2	21,1
AD-62949.2	Hs/Mm	A-126100.1	11,4	43,7	8,9	38,3
AD-62950.2	Hs/Mm	A-126116.1	9,9	21,9	4,7	20,8
AD-62954.2	Hs/Mm	A-126102.1	9,4	65,5	0,2	64,3

AD-62955.2	Hs/Mm	A-126118.1	5,8	21,8	5,5	5,8
AD-62959.2	Hs/Mm	A-126104.1	4,2	9,6	1,8	5,3
AD-62960.2	Hs/Mm	A-126120.1	5,4	10,1	3,8	2,5
AD-62964.2	Hs/Mm	A-126106.1	3,7	21,2	0,9	12,7
AD-62965.2	Hs/Mm	A-126122.1	8,0	20,8	5,3	23,5
AD-62969.2	Hs/Mm	A-126108.1	6,4	4,7	3,8	5,1
AD-62970.2	Hs/Mm	A-126124.1	19,6	5,2	14,6	6,1
AD-62936.2	Mm	A-126142.1	7,0	17,5	0,1	9,9
AD-62937.2	Mm	A-126158.1	4,0	16,9	0,8	10,2
AD-62938.2	Mm	A-126174.1	4,0	49,1	0,7	42,4
AD-62942.2	Mm	A-126144.1	3,4	4,9	1,2	5,3
AD-62943.2	Mm	A-126160.1	3,8	14,9	2,2	10,6
AD-62947.2	Mm	A-126146.1	10,9	6,4	9,6	1,6
AD-62948.2	Mm	A-126162.1	6,7	18,7	6,9	15,8
AD-62951.2	Mm	A-126132.1	8,1	11,8	8,6	14,5
AD-62952.2	Mm	A-126148.1	9,4	23,2	10,1	29,2
AD-62953.2	Mm	A-126164.1	11,3	10,3	13,7	12,1
AD-62956.2	Mm	A-126134.1	2,2	3,9	1,8	1,6
AD-62957.2	Mm	A-126150.1	3,2	22,5	3,1	20,0
AD-62958.2	Mm	A-126166.1	7,5	16,0	5,8	13,2
AD-62961.2	Mm	A-126136.1	4,3	6,9	2,8	5,6
AD-62962.2	Mm	A-126152.1	17,1	42,4	14,2	49,5
AD-62963.2	Mm	A-126168.1	2,3	10,8	0,6	8,3

AD-62966.2	Mm	A-126138.1	5,7	11,6	5,8	5,6
AD-62967.2	Mm	A-126154.1	3,8	21,7	2,0	23,0
AD-62968.2	Mm	A-126170.1	3,5	9,4	0,3	9,0
AD-62971.2	Mm	A-126140.1	4,6	3,1	5,0	2,7
AD-62972.2	Mm	A-126156.1	13,8	22,7	17,0	24,9
AD-62973.2	Mm	A-126172.1	19,3	51,9	19,7	21,9

Ví dụ 4. Sàng lọc đáp ứng liều lượng ở tế bào gan khỉ sơ cấp.

IC50 của các cặp đôi siARN HAO1 được cải biến và được liên hợp được xác định ở tế bào gan khỉ sơ cấp. siARN HAO1 được chuyển nạp trong khoảng liều lượng của nồng độ cặp đôi cuối cùng từ 10nM đến 36fM qua các dịch pha loãng 8, 6 lần. Kết quả của các thử nghiệm này được thể hiện trên Bảng 5.

Bảng 5a. Sàng lọc đáp ứng liều lượng HAO1 ở tế bào gan chuột sơ cấp.

ID CẶP ĐÔI	Loài	IC50 PCH (nM)
AD-62984	Hs	0,017
AD-62994	Hs	0,029
AD-62989	Hs	0,175
AD-62974	Hs	0,288
AD-62975	Hs	0,399
AD-62933	Hs/Mm	0,019
AD-62944	Hs/Mm	0,027
AD-62935	Hs/Mm	0,137
AD-62965	Hs/Mm	0,155
AD-62941	Hs/Mm	0,245

AD-62940	Hs/Mm	0,927

Bảng 5b. Sàng lọc đáp ứng liều lượng HAO1 khác ở tế bào gan chuột sơ cấp.

ID CẶP ĐÔI	Loài	IC50 PCH (nM)
AD-62984.2	Hs	0,017
AD-62994.2	Hs	0,029
AD-62989.2	Hs	0,175
AD-62974.2	Hs	0,288
AD-62975.2	Hs	0,399
AD-62933.2	Hs/Mm	0,019
AD-62944.2	Hs/Mm	0,027
AD-62935.2	Hs/Mm	0,137
AD-62965.2	Hs/Mm	0,155
AD-62941.2	Hs/Mm	0,245
AD-62940.2	Hs/Mm	0,927

Ví dụ 5. Sàng lọc đáp ứng liều lượng ở tế bào gan chuột sơ cấp.

IC50 của các cặp đôi siARN HAO1 được cải biến và được liên hợp được xác định ở tế bào gan chuột sơ cấp. siARN HAO1 được chuyển nạp trong khoảng liều lượng của nồng độ cặp đôi cuối cùng từ 10nM đến 36fM qua các dịch pha loãng 8, 6 lần. Kết quả của các thử nghiệm này được thể hiện trên Bảng 6.

Bảng 6a. Sàng lọc đáp ứng liều lượng HAO1 ở tế bào gan chuột sơ cấp.

ID CẶP ĐÔI	Loài	IC50 PMH (nM)
AD-62989	Hs	0,003
AD-62994	Hs	0,006
AD-62975	Hs	0,059
AD-62974	Hs	0,122
AD-62984	Hs	0,264
AD-62944	Hs/Mm	0,002
AD-62935	Hs/Mm	0,007
AD-62965	Hs/Mm	0,008
AD-62933	Hs/Mm	0,008
AD-62941	Hs/Mm	0,087
AD-62940	Hs/Mm	0,090

Bảng 6b. Sàng lọc đáp ứng liều lượng HAO1 khác ở tế bào gan chuột sơ cấp.

ID CẶP ĐÔI	Loài	IC50 PMH (nM)
AD-62989.2	Hs	0,003
AD-62994.2	Hs	0,006
AD-62975.2	Hs	0,059
AD-62974.2	Hs	0,122
AD-62984.2	Hs	0,264

AD-62944.2	Hs/Mm	0,002
AD-62935.2	Hs/Mm	0,007
AD-62965.2	Hs/Mm	0,008
AD-62933.2	Hs/Mm	0,008
AD-62941.2	Hs/Mm	0,087
AD-62940.2	Hs/Mm	0,090

Bảng 7. Sàng lọc liều lượng đơn lẻ HAO1 khác tế bào gan Cyno và chuột sơ cấp

ID cặp đôi	10nM PCH	0,1nM PCH	SD 10nM PCH	SD 0,1nM PCH	10nM PMH	0,1nM PMH	SD 10nM PMH	SD 0,1nM PMH
AD-62933.1	26,1	22,8	17,0	6,0	9,0	26,3	6,0	7,6
AD-65584.1	12,9	28,0	5,1	6,0	3,8	12,3	0,7	7,3
AD-65585.1	9,8	21,0	4,1	1,0	6,8	11,6	4,5	5,7
AD-65586.1	24,3	24,2	10,9	2,7	16,7	19,0	5,1	1,8
AD-65587.1	24,7	31,7	10,2	21,9	13,6	27,1	5,7	10,3
AD-65588.1	39,2	33,0	35,6	5,6	27,1	33,5	11,0	8,3

AD-65590.1	5,6	15,4	0,4	6,6	4,2	8,7	1,1	0,5
AD-65591.1	13,9	20,4	5,0	4,9	7,6	18,4	0,1	2,9
AD-65592.1	15,6	24,3	7,4	3,7	10,1	24,5	3,1	1,0
AD-65593.1	30,8	37,5	4,4	8,7	38,4	41,3	5,2	10,4
AD-65594.1	18,0	21,8	5,6	2,6	24,7	25,3	0,5	7,6
AD-65595.1	19,9	31,9	0,1	11,3	9,1	12,2	5,0	5,7
AD-65596.1	12,3	19,2	0,6	1,6	10,0	19,9	1,0	1,9
AD-65597.1	10,2	34,8	2,8	10,1	22,8	32,0	6,2	5,7
AD-65598.1	14,4	21,2	3,2	8,6	10,8	22,0	2,6	8,8
AD-65599.1	15,0	28,3	2,5	21,3	18,0	25,4	1,7	8,3
AD-65600.1	11,8	13,7	5,6	0,3	6,4	14,5	5,7	6,8
AD-65601.1	15,4	20,5	0,5	1,6	5,5	17,2	0,3	3,9
AD-65602.1	12,9	23,3	0,8	12,0	11,0	25,4	2,6	2,6

AD-65603.1	33,8	41,0	2,2	6,8	37,4	58,6	3,0	10,5
AD-65604.1	10,4	18,7	1,3	2,3	12,9	24,5	0,9	9,2
AD-65606.1	14,3	12,3	0,2	3,1	4,8	14,0	2,0	4,2
AD-65607.1	9,2	18,5	2,1	3,6	14,4	32,8	1,9	1,6
AD-65608.1	36,6	31,1	7,9	11,6	27,5	29,8	8,5	4,6
AD-65609.1	14,2	19,8	5,1	0,8	14,6	23,6	5,3	1,5
AD-65610.1	59,1	59,6	15,0	13,3	35,0	70,9	10,0	0,1
AD-65611.1	12,9	14,2	5,4	1,8	4,5	17,3	0,6	2,2
AD-65612.1	19,3	20,5	1,5	9,0	16,2	23,3	3,8	1,7
AD-65613.1	20,0	19,3	5,7	0,7	11,0	23,9	1,0	5,4
AD-65614.1	12,4	27,1	2,2	0,5	14,2	16,7	3,8	11,9
AD-65615.1	53,1	60,3	1,4	7,7	48,2	80,9	9,9	39,4
AD-65616.1	21,7	12,5	17,8	5,5	5,3	13,3	0,5	7,2

AD-65618.1	19,4	67,6	3,4	35,9	16,7	21,6	4,2	4,8
AD-65619.1	17,0	27,2	0,5	12,4	12,5	26,3	3,2	2,3
AD-65620.1	58,0	70,5	21,8	2,8	37,9	54,8	0,4	12,7
AD-65621.1	12,3	17,5	4,6	2,3	3,8	11,3	1,3	0,3
AD-65622.1	17,7	20,4	6,1	0,9	10,8	13,9	6,3	3,1
AD-65623.1	44,4	32,9	7,9	Không áp dụng	37,7	20,6	28,5	0,9
AD-65624.1	13,0	23,3	5,0	9,8	9,2	7,9	2,8	0,4
AD-65625.1	9,8	13,3	0,6	1,5	10,0	19,2	4,6	1,6
AD-65626.1	7,7	15,0	1,1	4,9	8,6	14,7	3,6	2,4
AD-65627.1	18,8	24,8	7,8	1,8	19,7	18,5	8,1	12,0
AD-65628.1	27,3	31,7	4,9	3,9	29,7	43,4	6,4	19,6
AD-65629.1	12,8	20,8	1,0	8,1	18,9	23,2	3,2	13,9
AD-65630.1	7,2	14,0	0,3	5,3	6,1	8,5	1,3	2,1

AD-65631.1	6,7	17,2	0,7	5,7	12,0	23,1	4,0	0,9
AD-65633.1	13,8	28,6	3,4	5,4	17,0	26,2	1,2	3,9
AD-65634.1	12,2	23,6	6,6	1,2	21,6	35,2	1,4	8,2
AD-65635.1	11,7	27,7	5,7	4,7	18,5	38,4	2,5	6,5
AD-65636.1	13,1	29,4	0,6	12,9	21,3	35,6	3,1	13,1
AD-65637.1	16,0	22,8	5,1	9,6	8,3	18,5	0,6	0,4
AD-65638.1	11,5	15,9	4,3	2,1	20,8	31,8	3,5	3,2
AD-65639.1	14,6	28,3	7,4	5,5	18,6	35,2	0,2	0,3
AD-65641.1	32,3	49,3	3,4	8,9	29,1	34,0	4,8	8,8
AD-65642.1	10,4	23,0	0,1	4,7	10,1	21,3	1,0	6,5
AD-65643.1	12,6	13,7	0,3	2,5	5,3	20,6	1,8	6,8
AD-65644.1	8,1	13,5	0,1	0,3	16,4	24,1	3,4	4,2
AD-65645.1	69,5	88,7	6,3	26,6	81,8	75,5	13,6	5,8

AD-65646.1	8,9	47,0	0,9	15,6	26,5	37,7	3,7	4,7
AD-65647.1	11,0	14,0	2,9	0,3	16,6	23,7	2,6	0,7
AD-65648.1	7,3	25,4	3,3	2,9	5,9	13,9	2,1	0,9
AD-65649.1	11,6	23,0	1,9	3,4	20,7	29,8	2,1	3,6
AD-65650.1	27,9	40,6	13,1	14,0	27,6	30,6	9,7	6,8
AD-65652.1	73,4	72,2	5,2	1,8	47,6	59,7	7,5	21,4
AD-65653.1	9,6	32,4	2,7	4,7	5,9	24,3	0,0	6,7
AD-65654.1	41,6	45,5	10,4	11,7	22,8	35,7	2,9	3,1
AD-65655.1	19,2	18,3	0,1	4,8	17,8	18,8	3,8	3,9
AD-65656.1	10,8	16,1	4,7	3,1	6,2	13,8	1,6	1,8
AD-65657.1	107,8	114,5	8,7	6,7	36,3	51,2	1,6	14,1
AD-65658.1	9,6	13,5	0,7	1,3	4,8	11,7	0,2	3,3
AD-65659.1	17,5	39,8	1,1	1,4	13,0	24,6	3,5	3,3

AD-65660.1	21,5	33,1	5,4	1,6	14,6	29,0	0,5	4,1
AD-65661.1	13,9	40,1	2,2	12,8	13,2	27,3	6,8	7,1
AD-65662.1	111,2	242,2	29,9	179,6	42,5	47,9	4,6	1,6
AD-65663.1	11,5	28,2	3,8	Không áp dụng	5,5	7,6	1,4	0,1
AD-65665.1	104,8	141,7	13,0	26,9	39,4	44,2	13,1	5,3
AD-65666.1	14,4	28,1	6,9	1,8	3,8	12,7	0,3	4,8

Bảng 8. Sàng lọc liều lượng đơn lẻ khác ở tế bào gan cyno sơ cấp.

Cặp đôi	10nM PCH	10nM PCH SD	0,1nM PCH	0,1nM {CH SD
AD-65626.5	7,1	0,7	23,5	3,7
AD-68272.1	10,1	1,9	39,5	10,3
AD-68273.1	6,8	2,2	29,7	10,1
AD-68274.1	15,7	4,7	49,4	12,1
AD-68275.1	15,5	2,7	47,4	10,4

AD-68276.1	22,3	8,1	83,0	21,7
AD-68277.1	14,2	1,1	25,2	7,9
AD-68278.1	18,6	3,2	97,5	25,4
AD-68279.1	14,7	3,8	62,5	19,6
AD-68280.1	24,9	2,6	54,7	8,1
AD-68281.1	38,3	18,6	70,7	8,8
AD-68282.1	11,3	3,1	35,9	3,6
AD-68283.1	14,4	3,6	79,9	26,5
AD-68284.1	25,1	4,7	82,3	8,2
AD-68285.1	10,4	1,3	39,3	10,3
AD-68286.1	14,7	4,5	71,9	18,3
AD-68287.1	8,0	2,3	28,4	3,5

AD-68288.1	14,8	3,5	31,7	6,3
AD-68289.1	11,8	2,5	30,8	3,5
AD-68290.1	11,5	4,9	40,3	8,4
AD-68291.1	15,8	6,3	69,9	6,6
AD-68292.1	9,8	3,0	37,3	20,7
AD-68293.1	20,2	6,1	85,2	20,8
AD-68294.1	12,9	5,0	68,7	21,6
AD-68295.1	7,5	1,4	22,6	3,9
AD-68296.1	8,5	1,1	51,3	7,0
AD-68297.1	8,2	2,4	27,4	4,0
AD-68298.1	10,1	2,8	35,6	10,4
AD-68299.1	11,8	2,4	47,7	16,2

AD-68300.1	7,2	1,7	33,8	4,6
AD-68301.1	34,2	14,3	78,3	25,8
AD-68302.1	15,6	5,8	57,1	10,0
AD-68303.1	7,0	2,0	23,9	4,5
AD-68304.1	14,8	2,4	64,2	12,1
AD-68305.1	25,3	3,8	106,5	23,8
AD-68306.1	12,4	2,0	19,8	1,8
AD-68307.1	22,2	8,9	93,1	22,6
AD-68308.1	22,2	4,0	79,6	7,8
AD-68309.1	8,0	2,7	19,9	3,7

Ví dụ 6. Sự đánh giá in vivo của thể liên hợp GO-GalNAc ở chuột C57B6

Thể liên hợp GO-GalNAc được dùng liều lượng dưới da ở chuột C57B6 ở 10, 5, 2,5, hoặc 1,25 mg/kg và sự bất hoạt mARN ở gan được đánh giá sau 72 giờ sau khi dùng liều lượng bằng cách sử dụng qPCR. ED50 liều lượng đơn lẻ bằng xấp xỉ 1,25 và 2,5 mg/kg lần lượt đối với hợp chất A (AD-62994) và hợp chất B (AD-62933). Trong các nghiên cứu liều

lượng lặp lại thể liên hợp được dùng liều lượng dưới da hàng tuần (QW) trong thời gian 4 tuần và hàm lượng mARN GO ở gan được đánh giá vào 72 giờ sau liều thứ 4. ED50 liều lượng lặp lại bằng ~0,3 mg/kg đối với cả hai hợp chất. Kết quả được thể hiện trên Hình 4.

Ví dụ 7. Sự đánh giá in vivo của sự bất hoạt GO và ảnh hưởng lên hàm lượng oxalat ở chuột KO AGXT.

siARN GO (AD-40257) trong hạt nano lipit (LNP) được dùng liều lượng trong tĩnh mạch ở chuột KO AGXT (Salido et al (2006) PNAS 103:18249) ở liều lượng 1 mg/kg. Hàm lượng oxalat hoặc glycolat trong nước tiểu được đo vào ngày 15 bằng cách sử dụng sắc ký ion/quang phổ khối. Kết quả được thể hiện trên Hình 5. Dữ liệu được biểu hiện với các giá trị tiền liều lượng và được chuẩn hóa đối với creatinin (Cr) để kiểm soát độ loãng nước tiểu. N=4 con chuột trong mỗi nhóm và thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn.

Ví dụ 8. Sự đánh giá in vivo của thể liên hợp GO-GalNAc ở mẫu bất hoạt AGXT chuột nhắt.

Để tạo ra mẫu PH1 ở chuột nhắt, siARN AGXT (AD-63102) ở LNP (AF-011-63102) được dùng liều lượng 1 mg/kg trong tĩnh mạch cho chuột nhắt cái Sprague Dawley vào ngày 1 và ngày 7 để duy trì sự bất hoạt của AGXT ở gan chuột nhắt và 1% Etylen Glycol được bổ sung vào nước uống để kích thích thêm sự sản xuất oxalat. Vào ngày 0 và ngày 7 một số con chuột nhắt còn được cho dùng liều lượng thể liên hợp GO GalNAc-siARN (AD-62994) hoặc đối chứng PBS. Kết quả được thể hiện trên Hình 6. Hình 6A thể hiện sự định lượng của hàm lượng mARN AGXT ở gan 72 giờ sau liều lượng 1 mg/kg đơn lẻ của siARN AGXT trong LNP. Trên Hình 6B, hàm lượng của oxalat trong nước tiểu được định lượng từ nước tiểu 24 giờ thu được từ ngày -1 đến 0, từ ngày 3 đến 4, từ ngày 5 đến 6, và từ ngày 7 đến 8. Dữ liệu được chuẩn hóa đối với creatinin để kiểm soát đối với độ loãng của nước tiểu. N=3 đối với các nhóm AGXT và N=2 đối với nhóm đối chứng PBS. Trên Hình 6C, cùng các con chuột nhắt này (như trên Hình 6B) được theo dõi đến 49 ngày với việc dùng liều lượng hàng tuần liên tục vào ngày 14 và 21 của cả AF-011-63102 và AD-62994 và lấy nước tiểu 24 giờ như được thể hiện. Etylen glycol vẫn còn trong nước uống đến tận ngày 28. Trên Hình 6D, khoảng thời gian bất hoạt HAO1 ở chuột nhắt được thể hiện bằng cách đo hàm lượng mARN một tuần hoặc bốn tuần sau khi kết thúc 4 liều lượng (tương ứng với

ngày 28 và 49 trên Hình 6C) và được biểu diễn tương ứng với hàm lượng được nhìn thấy ở chuột nhắt được điều trị bằng PBS. Thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn từ đầu đến cuối.

Tên cặp đôi	đích	Tên Wks có nghĩa
AD-40257.1	HAO1	NM_017545,2_1306-1324_s
AD-40257.2	HAO1	NM_017545,2_1306-1324_s
AD-63102.1	AGXT	NM_016702,3_1109-1127_s
AD-63102.2	AGXT	NM_016702,3_1109-1127_s
AD-63102.3	AGXT	NM_016702,3_1109-1127_s

Tên cặp đôi	Trình tự sợi có nghĩa được cải biến	Trình tự sợi có nghĩa không được cải biến	SEQ ID NO:
AD-40257.1	uucAAuGGGuGuccuAGGAdTsdT	UUCAAUGGGUGUCCUAGGA	770 & 771
AD-40257.2	uucAAuGGGuGuccuAGGAdTsdT	UUCAAUGGGUGUCCUAGGA	770 & 771
AD-63102.1	AcAAcuGGAGGGAcAucGudTsdT	ACAACUGGAGGGACAUCGU	772 & 773

AD-63102.2	AcAAcuGGAGGGAcAucGudTsdT	ACAACUGGAGGGACAUCGU	772 & 773
AD-63102.3	AcAAcuGGAGGGAcAucGudTsdT	ACAACUGGAGGGACAUCGU	772 & 773

Tên cặp đôi	Trình tự sợi đối nghĩa được cải biến	Trình tự sợi đối nghĩa không được cải biến	SEQ ID NO:
AD-40257.1	UCCuAGGAcACCcAUUGAAdTsdT	UCCUAGGACACCCAUUGAA	774 & 775
AD-40257.2	UCCuAGGAcACCcAUUGAAdTsdT	UCCUAGGACACCCAUUGAA	774 & 775
AD-63102.1	ACGAUGUCCCUCcAGUUGUdTsdT	ACGAUGUCCCUCCAGUUGU	776 & 777
AD-63102.2	ACGAUGUCCCUCcAGUUGUdTsdT	ACGAUGUCCCUCCAGUUGU	776 & 777
AD-63102.3	ACGAUGUCCCUCcAGUUGUdTsdT	ACGAUGUCCCUCCAGUUGU	776 & 777

Ví dụ 9: Sự đánh giá in vivo của thể liên hợp GO-GalNAc

Chuột cái C57BL/6, 6-8 tuần tuổi, được dùng liều dưới da đơn lẻ của thể liên hợp GO siARN-GalNac trên Bảng 7. Các con chuột bị giết sau 72 giờ và gan được thử nghiệm về mARN HAO bằng phân tích bADN. Kết quả được thể hiện trên Hình 13.

Bảng 7: Thể liên hợp GO (HAO) siARN-GalNac.

Tên cặp đôi	Trình tự sợi có nghĩa được cải biến	SEQ ID NO:
AD-62989.2	UfscsCfuAfgGfaAfCfCfuUfuUfaGfaAfaUfL96	778
AD-62994.2	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	779
AD-62933.2	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	780
AD-62935.2	CfsasUfuGfgUfgAfGfGfaAfaAfaUfcCfuUfL96	781
AD-62940.2	AfsusCfgAfcAfaGfAfCfaUfuGfgUfgAfgAfL96	782
AD-62941.2	AfscsAfuUfgGfuGfAfGfgAfaAfaAfuCfcUfL96	783
AD-62944.2	GfsasAfaGfuCfaUfCfGfaCfaAfgAfcAfuUfL96	784
AD-62965.2	AfsasAfgUfcAfuCfGfAfcAfaGfaCfaUfuAfL96	785

Tên cặp đôi	Sợi đối nghĩa được cải biến	SEQ ID NO:
AD-62989.2	asUfsuUfcUfaAfaAfgguUfcCfuAfgGfascsa	786

AD-62994.2	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa787
AD-62933.2	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg788
AD-62935.2	asAfsgGfaUfuUfuUfccuCfaCfcAfaUfgsusc789
AD-62940.2	usCfsuCfaCfcAfaUfgucUfuGfuCfgAfusgsa790
AD-62941.2	asGfsgAfuUfuUfuCfcucAfcCfaAfuGfuscsu791
AD-62944.2	asAfsuGfuCfuUfgUfcgaUfgAfcUfuUfcsasc792
AD-62965.2	usAfsaUfgUfcUfuGfucgAfuGfaCfuUfuscsa793

Tên cặp đôi	Khả năng phản ứng chéo	Chuột đồng Trung Quốc?	MM cho chuột	MM cho GP
AD-62989.2	Hs	có	pos8	
AD-62994.2	Hs	không	pos16	pos2,12, 16
AD-62933.2	Hs/Mm	có		
AD-62935.2	Hs/Mm	có		

AD-62940.2	Hs/Mm	có
AD-62941.2	Hs/Mm	có
AD-62944.2	Hs/Mm	có
AD-62965.2	Hs/Mm	có

Ví dụ 10: Sự đánh giá in vivo của thể liên hợp GO-GalNAc ở chuột

Con chuột cái C57 BL/6 được dùng liều lượng 3 mg/kg dưới da đơn lẻ của một số lượng các thể liên hợp GO siARN-GalNac được mô tả trong bản mô tả này hoặc đối chứng PBS. Các con chuột bị giết sau 72 giờ và mARN bất hoạt HAO1 ở gan được đánh giá bằng cách sử dụng qPCR. Kết quả được thể hiện trên Hình 14, được biểu diễn tương ứng với đối chứng PBS.

Ví dụ 11: Sự đánh giá đáp ứng liều lượng của thể liên hợp GO-GalNAc ở chuột

Con chuột cái C57 BL/6 được dùng liều dưới da đơn lẻ bằng 1 hoặc 3 mg/kg của một trong số các thể liên hợp GO siARN-GalNac hợp chất A (AD-62994), hợp chất B (AD-62933), hợp chất C (AD-65644), hợp chất D (AD-65626), hợp chất E (AD-65590), hợp chất F (AD-65585) hoặc đối chứng PBS. Mười ngày sau các con chuột bị giết chết và mARN bất hoạt HAO1 ở gan được đánh giá bằng cách sử dụng qPCR. Trong các nghiên cứu liều lượng lặp lại, các hợp chất C, D, F hoặc đối chứng PBS được dùng liều lượng dưới da hàng tuần (QW) trong thời gian 4 tuần và hàm lượng mARN HAO1 ở gan được đánh giá 10 ngày sau liều lượng cuối cùng. Kết quả của liều lượng đơn lẻ được thể hiện trên Hình 15 và thí nghiệm liều lượng lặp lại được thể hiện trên Hình 16, được biểu diễn tương ứng với đối chứng PBS. Các dữ liệu này cho thấy hiệu lực được cải thiện đối với các hợp chất AD-65644 và AD-65626 với AD-62933 và đối với các hợp chất AD-65590 và AD-65585 với AD-62994.

Ví dụ 12: Sự đánh giá đáp ứng liều lượng của hợp chất D ở chuột

Con chuột cái C57 BL/6 được dùng liều dưới da đơn lẻ bằng 0,1, 0,3, 1, 3, hoặc 10 mg/kg AD-65626 hoặc đối chứng PBS. Mười ngày sau con chuột bị giết chết và mARN bất hoạt HAO1 ở gan được đánh giá bằng cách sử dụng qPCR với kết quả được biểu diễn tương ứng với đối chứng PBS như được thể hiện trên Hình 17. Các kết quả này chứng tỏ sự cải thiện lớn hơn 3 lần về hiệu lực so với hợp chất AD-62933.

Ví dụ 13: Mối quan hệ của sự bất hoạt mARN với hàm lượng glycolat trong huyết thanh ở chuột

Con chuột cái C57 BL/6 được dùng liều dưới da đơn lẻ của 0,1, 0,3, 1, 3, hoặc 10 mg/kg AD-65585 hoặc đối chứng PBS. Mười ngày sau con chuột bị giết chết và mARN bất hoạt HAO1 ở gan được đánh giá bằng cách sử dụng qPCR, với kết quả được biểu diễn tương ứng với đối chứng PBS. Hàm lượng glycolat trong các mẫu huyết thanh từ cùng con chuột được định lượng bằng cách sử dụng sắc ký ion ghép đôi với quang phổ khối như đã mô tả từ trước (Knight và cộng sự., Anal. Biochem. ngày 1 tháng 2 năm 2012; 421(1): 121–124). Kết quả của các thí nghiệm này được thể hiện trên Hình 18.

Các kết quả này chứng tỏ rằng AD-65585 có hiệu lực bằng với AD-65626, cả hai đều có ED50 liều lượng đơn lẻ bằng ~0,3 mg/kg ở chuột WT. Ngoài ra, việc làm câm mARN HAO1 dẫn đến sự tăng glycolat trong huyết thanh đáp ứng liều lượng lên đến 4 lần (xấp xỉ 200uM) ở hai liều lượng cao nhất.

Ví dụ 14: Mối quan hệ của sự bất hoạt mARN với hàm lượng glycolat trong huyết thanh ở chuột nhắt

Chuột nhắt đực Sprague Dawley được dùng liều dưới da đơn lẻ của 1, 3, hoặc 10 mg/kg AD-65626 hoặc đối chứng PBS. Mười bốn ngày sau các con chuột nhắt bị giết chết và mARN bất hoạt HAO1 ở gan được đánh giá bằng cách sử dụng qPCR, với kết quả được biểu diễn tương ứng với đối chứng PBS. Hàm lượng glycolat trong các mẫu huyết thanh từ cùng các con chuột nhắt này thu được cả trước và vào ngày 14 được định lượng bằng cách sử dụng sắc ký ion ghép đôi với quang phổ khối, như đã được mô tả (Knight và cộng sự., Anal. Biochem. ngày 1 tháng 2 năm 2012; 421(1): 121–124). Kết quả của các thí nghiệm này được thể hiện trên Hình 19.

Như quan sát được ở chuột kiểu dại, các kết quả này chứng tỏ rằng việc làm câm mARN HAO1 ở chuột nhắt Sprague Dawley dẫn đến sự tăng glycolat trong huyết thanh đáp ứng liều lượng lên đến 12 lần (xấp xỉ 140 μM) ở liều lượng cao nhất.

Ví dụ 15: Nghiên cứu dược lý với ALN-65585

Sự ức chế HAO1 ở tế bào gan.

Tế bào gan cyno sơ cấp được chuyển nạp bằng ARNimax (Invitrogen) với AD-65585 được pha loãng theo dãy (ALN-65585, "ALN-GO1") hoặc đối chứng mARN Luxiferaza không hướng đích (AD1955) ở 10 nM. Hàm lượng tương đối của mARN HAO1 được xác định bằng cách chuẩn hóa đối với hàm lượng mARN GAPDH như được định lượng bằng RT-PCR thời gian thực. Dữ liệu được dựng đồ thị để tính giá trị IC50 của 10 pM. Kết quả được thể hiện Hình 20.

Sự chuyển nạp in vitro của AD-65585 chứng tỏ ED50 bằng xấp xỉ 10pM ở tế bào gan cynomolgus sơ cấp.

Dược lý liều lượng đơn lẻ ở chuột

Dược lý ALN-GO1 được đánh giá ở chuột bằng cách định lượng hàm lượng mARN HAO1 trong gan và glycolat trong huyết thanh (Hình 21). Liều lượng SC đơn lẻ của ALN-GO1 dẫn đến sự triệt tiêu phụ thuộc liều lượng của mARN HAO1 với liều lượng của 10 mg/kg dẫn đến việc làm câm ED90. Liều lượng ED50 đối với việc làm câm GO1 ở chuột được ước tính là 0,3 mg/kg. Hàm lượng glycolat trong huyết thanh tăng lên trong phương thức đáp ứng liều lượng với mức độ lớn nhất xấp xỉ 4 lần trên hàm lượng đường cơ sở. Kết quả được thể hiện trên Hình 21, chứng tỏ hàm lượng của mARN HAO1 ở gan và glycolat trong huyết thanh 10 ngày sau liều dưới da đơn lẻ của ALN-65585 ở các con chuột C57BL/6. Các thanh thể hiện giá trị trung bình của 3 hoặc 4 con vật và thanh sai số minh họa độ lệch chuẩn.

Khoảng thời gian liều lượng đơn lẻ ở chuột

Việc làm câm GO1 là lâu dài và có thể đảo ngược sau liều lượng SC đơn lẻ (Hình 22). Liều lượng SC đơn lẻ của ALN-GO1 ở chuột ở 3 mg/kg dẫn đến việc làm câm mARN ≥70% trong xấp xỉ 6 tuần, sau đó hàm lượng mARN phục hồi lên hàm lượng đường cơ sở trong 12 tuần sau khi dùng liều lượng. Kết quả được thể hiện trên Hình 22: Hàm lượng của

mARN HAO1 ở gan ở nhiều thời điểm sau khi dùng liều dưới da đơn lẻ của ALN-65585 ở các con chuột C57BL/6. Mỗi điểm dữ liệu thể hiện giá trị trung bình của 3 con vật và thanh sai số minh họa độ lệch chuẩn.

Dược lý liều lượng đơn lẻ ở chuột nhắt

Dược lý ALN-GO1 cũng được đánh giá ở chuột nhắt bằng cách định lượng hàm lượng mARN HAO1 ở gan (Hình 23). Việc dùng SC đơn lẻ của ALN-GO1 cho chuột nhắt đực Sprague Dawley dẫn đến sự triệt tiêu phụ thuộc liều lượng của mARN HAO1 với liều lượng ≥3 mg/kg dẫn đến việc làm câm ED90. Kết quả được thể hiện trên Hình 23: Hàm lượng của mARN HAO1 ở gan 10 ngày sau liều dưới da đơn lẻ của ALN-65585 ở chuột nhắt Sprague Dawley. Các thanh thể hiện giá trị trung bình của 3 con vật và thanh sai số minh họa độ lệch chuẩn. Liều lượng ED50 đối với việc làm câm GO1 trong chuột nhắt được ước tính là 0,3 mg/kg.

Dược lý liều lượng đơn lẻ ở chuột KO AGXT

Sự ảnh hưởng của ALN-GO1 lên hàm lượng oxalat được đánh giá ở mẫu chuột KO AGXT mắc PH1. Kết quả được thể hiện trên Hình 24: Sự bài tiết oxalat (trên) và glycolat (dưới) trong nước tiểu 24 giờ của con chuột KO AGXT sau liều dưới da đơn lẻ của ALN-65585. Các chữ cái khác nhau có nghĩa là sự khác biệt đáng kể giữa 3 nhóm liều lượng ở mỗi tuần cụ thể (n=3 trong mỗi liều lượng). Sự bài tiết nước tiểu theo thời gian không thay đổi đáng kể ở con vật đối chứng PBS (n=1).

Hàm lượng oxalat trong nước tiểu cho thấy sự giảm phụ thuộc liều lượng sau liều lượng đơn lẻ của ALN-GO1 với sự giảm lớn nhất là xấp xỉ 50% oxalat ở liều lượng 3 mg/kg mà kết túc trong ≥3 tuần trước khi phục hồi lên hàm lượng tiền liều lượng. Hàm lượng glycolat trong nước tiểu cho thấy sự tăng phụ thuộc liều lượng sau liều lượng đơn lẻ của ALN-GO1 với sự tăng lớn nhất xấp xỉ 5 lần ở liều lượng 3 mg/kg mà kết thúc trong ≥4 tuần.

Dược lý liều lượng đơn lẻ ở mẫu chuột nhắt được cảm ứng PH1

ALN-GO1 được đánh giá ở mẫu động vật gặm nhấm PH1 thứ hai trong đó AGXT ở gan bị ức chế ở chuột nhắt sử dụng siARN và hàm lượng oxalat được kích thích bằng etylen glycol (Hình 25A và Hình 25B). mARN HAO1 ở gan và oxalat trong nước 24 giờ tiểu được định lượng để xác định mức độ của sự giảm HAO1 cần cho sự giảm oxalat lớn nhất. Kết

quả được thể hiện trên Hình 25A và Hình 25B: Hàm lượng của mARN HAO1 ở gan mẫu chuột nhắt được cảm ứng của PH1 14 ngày sau liều dưới da đơn lẻ của ALN-65585 và liều hàng tuần của siARN AF-011-AGXT (2 liều lượng, bằng 1 mg/kg). Oxalat trong nước tiểu 24 giờ được chuẩn hóa đối với creatinin trong nước tiểu. Các thanh thể hiện giá trị trung bình của 3 con vật và thanh sai số minh họa độ lệch chuẩn. Đồ thị tương quan giảm mARN và oxalat thể hiện các con vật riêng lẻ từ nhiều thí nghiệm.

Liều lượng đơn lẻ của ALN-GO1 trong mẫu này chứng minh sự giảm mARN và oxalat trong nước tiểu đáp ứng liều lượng với sự giảm mARN lớn nhất xấp xỉ 85% và sự giảm oxalat trong nước tiểu lớn nhất xấp xỉ 90% quan sát được ở liều lượng cao nhất của ALN-GO1 (Hình 25A và Hình 25B). Trong mẫu chuột nhắt được cảm ứng này của PH1, sự giảm mARN và oxalat trong nước tiểu dẫn đến sự tương quan 1:1.

Dược lý đa liều lượng ở mẫu chuột nhắt cảm ứng PH1

Hiệu lực của ALN-GO1 được đánh giá trong các nghiên cứu ở các con chuột nhắt bình thường có hoạt tính AGXT bị ức chế và etylen glycol (mẫu cảm ứng PH1) bằng cách định lượng mARN HAO1 ở gan và oxalat trong nước tiểu 24 giờ. Kết quả được thể hiện trên Hình 26: Hàm lượng của mARN HAO1 ở gan mẫu chuột nhắt được cảm ứng PH1 28 ngày sau khi dùng liều dưới da lặp lại cỉa ALN-65585 và dùng liều trong tĩnh mạch lặp lại của siARN AF-011-AGXT (4 liều lượng, bằng 1 mg/kg). Oxalat trong nước tiểu 24 giờ được chuẩn hóa đối với creatinin trong nước tiểu. Các thanh thể hiện giá trị trung bình của 2 hoặc 3 con vật và thanh sai số minh họa độ lệch chuẩn.

Sự điều trị bằng ALN-GO1 dẫn đến sự giảm oxalat trong nước tiểu được duy trì trong tất cả các nhóm điều trị trong thời gian xấp xỉ 3 tuần. Vào ngày 28 sau khi dùng liều lượng lặp lại của ALN-GO1 (và bốn liều lượng của AF-011-AGXT) tất cả các nhóm thể hiện sự giảm mARN >95% sự giảm oxalat trong nước tiểu >85%.

Dược lý đa liều lượng ở NHP

Dược lý ALN-GO1 được đánh giá ở khỉ cynomolgus (động vật linh trưởng không phải là người (NHP)) bằng cách định lượng mARN HAO1 ở mẫu sinh thiết gan, và hàm lượng glycolat trong huyết thanh. Bảng dưới đây thể hiện nghiên cứu dược lý NHP phác họa chi tiết mức độ liều lượng và chế độ liều lượng.

Nhóm #	Vật phẩm Thử nghiệm	Mức độ liều lượng (mg/kg)	Tần suất liều lượng
1	PBS	Na	QM x 6
2	AD-65585	0,25	QM x 8
3	AD-65585	1	QM x 8
4	AD-65585	1	QM x 6
5	AD-65585	2	QM x 6
6	AD-65585	4	QM x 6
7	AD-65585	2 -> 1	QM x 4 -> QM x 5

Kết quả được thể hiện trên hình 27. Hàm lượng glycolat trong huyết thanh NHP đối với tất cả các nhóm ngoài ngày 85, dữ liệu thể hiện giá trị trung bình nhóm của 3 con vật trong mỗi nhóm, các đường thể hiện độ lệch chuẩn. mARN HAO1 mẫu sinh thiết gan vào ngày 29, các đường thể hiện giá trị trung bình nhóm, các ký hiệu thể hiện hàm lượng mARN của con vật đơn lẻ với đối chứng PBS vào ngày 29.

Sau tháng dùng liều lượng đầu tiên (ngày 29), việc làm câm mARN đáp ứng liều lượng được quan sát thấy ở tất cả các nhóm, với lên tới 99% việc làm câm mARN ở các nhóm 6 và 7 được dùng liều lượng 4 mg/kg hàng tháng hoặc 2 mg/kg hàng tuần. Hàm lượng glycolat trong huyết thanh được tăng lên lớn nhất bằng xấp xỉ 70 μM được duy trì trong ít nhất 3 tuần ở nhóm 6 được dùng liều lượng 4 mg/kg hàng tháng. Glycolat trong huyết thanh trung gian

Ví dụ 16: Các trình tự siARN khác.

Thiết kế siARN khác được thực hiện để nhận dạng siARN hướng đích HAO1 NM_017545.2.

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUGUAUGUUACUUCUUAGAGA	794	asusguauGfuUfAfCfuucuuagagaL96	1890	có nghĩa	21
UCUCUAAGAAGUAACAUACAUCC	795	usCfsucuAfaGfAfaguaAfcAfuacauscsc	1891	đối nghĩa	23
UGUAUGUUACUUCUUAGAGAG	796	usgsuaugUfuAfCfUfucuuagagagL96	1892	có nghĩa	21
CUCUCUAAGAAGUAACAUACAUC	797	csUfscucUfaAfGfaaguAfaCfauacasusc	1893	đối nghĩa	23
UAGGAUGUAUGUUACUUCUUA	798	usasggauGfuAfUfGfuuacuucuuaL96	1894	có nghĩa	21
UAAGAAGUAACAUACAUCCUAAA	799	usAfsagaAfgUfAfacauAfcAfuccuasasa	1895	đối nghĩa	23
UUAGGAUGUAUGUUACUUCUU	800	ususaggaUfgUfAfUfguuacuucuuL96	1896	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AAGAAGUAACAUACAUCCUAAAA	801	asAfsgaaGfuAfAfcauaCfaUfccuaasasa	1897	đối nghĩa	23
AGAAAGGUGUUCAAGAUGUCC	802	asgsaaagGfuGfUfUfcaagauguccL96	1898	có nghĩa	21
GGACAUCUUGAACACCUUUCUCC	803	gsGfsacaUfcUfUfgaacAfcCfuuucuscsc	1899	đối nghĩa	23
GAAAGGUGUUCAAGAUGUCCU	804	gsasaaggUfgUfUfCfaagauguccuL96	1900	có nghĩa	21
AGGACAUCUUGAACACCUUUCUC	805	asGfsgacAfuCfUfugaaCfaCfcuuucsusc	1901	đối nghĩa	23
GGGGAGAAAGGUGUUCAAGAU	806	gsgsggagAfaAfGfGfuguucaagauL96	1902	có nghĩa	21
AUCUUGAACACCUUUCUCCCCCU	807	asUfscuuGfaAfCfaccuUfuCfuccccscsu	1903	đối nghĩa	23
GGGGGAGAAAGGUGUUCAAGA	808	gsgsgggaGfaAfAfGfguguucaagaL96	1904	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCUUGAACACCUUUCUCCCCCUG	809	usCfsuugAfaCfAfccuuUfcUfcccccsusg	1905	đối nghĩa	23
AGAAACUUUGGCUGAUAAUAU	810	asgsaaacUfuUfGfGfcugauaauauL96	1906	có nghĩa	21
AUAUUAUCAGCCAAAGUUUCUUC	811	asUfsauuAfuCfAfgccaAfaGfuuucususc	1907	đối nghĩa	23
GAAACUUUGGCUGAUAAUAUU	812	gsasaacuUfuGfGfCfugauaauauuL96	1908	có nghĩa	21
AAUAUUAUCAGCCAAAGUUUCUU	813	asAfsuauUfaUfCfagccAfaAfguuucsusu	1909	đối nghĩa	23
AUGAAGAAACUUUGGCUGAUA	814	asusgaagAfaAfCfUfuuggcugauaL96	1910	có nghĩa	21
UAUCAGCCAAAGUUUCUUCAUCA	815	usAfsucaGfcCfAfaaguUfuCfuucauscsa	1911	đối nghĩa	23
GAUGAAGAAACUUUGGCUGAU	816	gsasugaaGfaAfAfCfuuuggcugauL96	1912	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUCAGCCAAAGUUUCUUCAUCAU	817	asUfscagCfcAfAfaguuUfcUfucaucsasu	1913	đối nghĩa	23
AAGGCACUGAUGUUCUGAAAG	818	asasggcaCfuGfAfUfguucugaaagL96	1914	có nghĩa	21
CUUUCAGAACAUCAGUGCCUUUC	819	csUfsuucAfgAfAfcaucAfgUfgccuususc	1915	đối nghĩa	23
AGGCACUGAUGUUCUGAAAGC	820	asgsgcacUfgAfUfGfuucugaaagcL96	1916	có nghĩa	21
GCUUUCAGAACAUCAGUGCCUUU	821	gsCfsuuuCfaGfAfacauCfaGfugccususu	1917	đối nghĩa	23
CGGAAAGGCACUGAUGUUCUG	822	csgsgaaaGfgCfAfCfugauguucugL96	1918	có nghĩa	21
CAGAACAUCAGUGCCUUUCCGCA	823	csAfsgaaCfaUfCfagugCfcUfuuccgscsa	1919	đối nghĩa	23
GCGGAAAGGCACUGAUGUUCU	824	gscsggaaAfgGfCfAfcugauguucuL96	1920	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AGAACAUCAGUGCCUUUCCGCAC	825	asGfsaacAfuCfAfgugcCfuUfuccgcsasc	1921	đối nghĩa	23
AGAAGACUGACAUCAUUGCCA	826	asgsaagaCfuGfAfCfaucauugccaL96	1922	có nghĩa	21
UGGCAAUGAUGUCAGUCUUCUCA	827	usGfsgcaAfuGfAfugucAfgUfcuucuscsa	1923	đối nghĩa	23
GAAGACUGACAUCAUUGCCAA	828	gsasagacUfgAfCfAfucauugccaaL96	1924	có nghĩa	21
UUGGCAAUGAUGUCAGUCUUCUC	829	usUfsggcAfaUfGfauguCfaGfucuucsusc	1925	đối nghĩa	23
GCUGAGAAGACUGACAUCAUU	830	gscsugagAfaGfAfCfugacaucauuL96	1926	có nghĩa	21
AAUGAUGUCAGUCUUCUCAGCCA	831	asAfsugaUfgUfCfagucUfuCfucagcscsa	1927	đối nghĩa	23
GGCUGAGAAGACUGACAUCAU	832	gsgscugaGfaAfGfAfcugacaucauL96	1928	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUGAUGUCAGUCUUCUCAGCCAU	833	asUfsgauGfuCfAfgucuUfcUfcagccsasu	1929	đối nghĩa	23
UAAUGCCUGAUUCACAACUUU	834	usasaugcCfuGfAfUfucacaacuuuL96	1930	có nghĩa	21
AAAGUUGUGAAUCAGGCAUUACC	835	asAfsaguUfgUfGfaaucAfgGfcauuascsc	1931	đối nghĩa	23
AAUGCCUGAUUCACAACUUUG	836	asasugccUfgAfUfUfcacaacuuugL96	1932	có nghĩa	21
CAAAGUUGUGAAUCAGGCAUUAC	837	csAfsaagUfuGfUfgaauCfaGfgcauusasc	1933	đối nghĩa	23
UUGGUAAUGCCUGAUUCACAA	838	ususgguaAfuGfCfCfugauucacaaL96	1934	có nghĩa	21
UUGUGAAUCAGGCAUUACCAACA	839	usUfsgugAfaUfCfaggcAfuUfaccaascsa	1935	đối nghĩa	23
GUUGGUAAUGCCUGAUUCACA	840	gsusugguAfaUfGfCfcugauucacaL96	1936	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UGUGAAUCAGGCAUUACCAACAC	841	usGfsugaAfuCfAfggcaUfuAfccaacsasc	1937	đối nghĩa	23
UAUCAAAUGGCUGAGAAGACU	842	usasucaaAfuGfGfCfugagaagacuL96	1938	có nghĩa	21
AGUCUUCUCAGCCAUUUGAUAUC	843	asGfsucuUfcUfCfagccAfuUfugauasusc	1939	đối nghĩa	23
AUCAAAUGGCUGAGAAGACUG	844	asuscaaaUfgGfCfUfgagaagacugL96	1940	có nghĩa	21
CAGUCUUCUCAGCCAUUUGAUAU	845	csAfsgucUfuCfUfcagcCfaUfuugausasu	1941	đối nghĩa	23
AAGAUAUCAAAUGGCUGAGAA	846	asasgauaUfcAfAfAfuggcugagaaL96	1942	có nghĩa	21
UUCUCAGCCAUUUGAUAUCUUCC	847	usUfscucAfgCfCfauuuGfaUfaucuuscsc	1943	đối nghĩa	23
GAAGAUAUCAAAUGGCUGAGA	848	gsasagauAfuCfAfAfauggcugagaL96	1944	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCUCAGCCAUUUGAUAUCUUCCC	849	usCfsucaGfcCfAfuuugAfuAfucuucscsc	1945	đối nghĩa	23
UCUGACAGUGCACAAUAUUUU	850	uscsugacAfgUfGfCfacaauauuuuL96	1946	có nghĩa	21
AAAAUAUUGUGCACUGUCAGAUC	851	asAfsaauAfuUfGfugcaCfuGfucagasusc	1947	đối nghĩa	23
CUGACAGUGCACAAUAUUUUC	852	csusgacaGfuGfCfAfcaauauuuucL96	1948	có nghĩa	21
GAAAAUAUUGUGCACUGUCAGAU	853	gsAfsaaaUfaUfUfgugcAfcUfgucagsasu	1949	đối nghĩa	23
AAGAUCUGACAGUGCACAAUA	854	asasgaucUfgAfCfAfgugcacaauaL96	1950	có nghĩa	21
UAUUGUGCACUGUCAGAUCUUGG	855	usAfsuugUfgCfAfcuguCfaGfaucuusgsg	1951	đối nghĩa	23
CAAGAUCUGACAGUGCACAAU	856	csasagauCfuGfAfCfagugcacaauL96	1952	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUUGUGCACUGUCAGAUCUUGGA	857	asUfsuguGfcAfCfugucAfgAfucuugsgsa	1953	đối nghĩa	23
ACUGAUGUUCUGAAAGCUCUG	858	ascsugauGfuUfCfUfgaaagcucugL96	1954	có nghĩa	21
CAGAGCUUUCAGAACAUCAGUGC	859	csAfsgagCfuUfUfcagaAfcAfucagusgsc	1955	đối nghĩa	23
CUGAUGUUCUGAAAGCUCUGG	860	csusgaugUfuCfUfGfaaagcucuggL96	1956	có nghĩa	21
CCAGAGCUUUCAGAACAUCAGUG	861	csCfsagaGfcUfUfucagAfaCfaucagsusg	1957	đối nghĩa	23
AGGCACUGAUGUUCUGAAAGC	862	asgsgcacUfgAfUfGfuucugaaagcL96	1958	có nghĩa	21
GCUUUCAGAACAUCAGUGCCUUU	863	gsCfsuuuCfaGfAfacauCfaGfugccususu	1959	đối nghĩa	23
AAGGCACUGAUGUUCUGAAAG	864	asasggcaCfuGfAfUfguucugaaagL96	1960	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CUUUCAGAACAUCAGUGCCUUUC	865	csUfsuucAfgAfAfcaucAfgUfgccuususc	1961	đối nghĩa	23
AACAACAUGCUAAAUCAGUAC	866	asascaacAfuGfCfUfaaaucaguacL96	1962	có nghĩa	21
GUACUGAUUUAGCAUGUUGUUCA	867	gsUfsacuGfaUfUfuagcAfuGfuuguuscsa	1963	đối nghĩa	23
ACAACAUGCUAAAUCAGUACU	868	ascsaacaUfgCfUfAfaaucaguacuL96	1964	có nghĩa	21
AGUACUGAUUUAGCAUGUUGUUC	869	asGfsuacUfgAfUfuuagCfaUfguugususc	1965	đối nghĩa	23
UAUGAACAACAUGCUAAAUCA	870	usasugaaCfaAfCfAfugcuaaaucaL96	1966	có nghĩa	21
UGAUUUAGCAUGUUGUUCAUAAU	871	usGfsauuUfaGfCfauguUfgUfucauasasu	1967	đối nghĩa	23
UUAUGAACAACAUGCUAAAUC	872	ususaugaAfcAfAfCfaugcuaaaucL96	1968	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
GAUUUAGCAUGUUGUUCAUAAUC	873	gsAfsuuuAfgCfAfuguuGfuUfcauaasusc	1969	đối nghĩa	23
UCUUUAGUGUCUGAAUAUAUC	874	uscsuuuaGfuGfUfCfugaauauaucL96	1970	có nghĩa	21
GAUAUAUUCAGACACUAAAGAUG	875	gsAfsuauAfuUfCfagacAfcUfaaagasusg	1971	đối nghĩa	23
CUUUAGUGUCUGAAUAUAUCC	876	csusuuagUfgUfCfUfgaauauauccL96	1972	có nghĩa	21
GGAUAUAUUCAGACACUAAAGAU	877	gsGfsauaUfaUfUfcagaCfaCfuaaagsasu	1973	đối nghĩa	23
CACAUCUUUAGUGUCUGAAUA	878	csascaucUfuUfAfGfugucugaauaL96	1974	có nghĩa	21
UAUUCAGACACUAAAGAUGUGAU	879	usAfsuucAfgAfCfacuaAfaGfaugugsasu	1975	đối nghĩa	23
UCACAUCUUUAGUGUCUGAAU	880	uscsacauCfuUfUfAfgugucugaauL96	1976	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUUCAGACACUAAAGAUGUGAUU	881	asUfsucaGfaCfAfcuaaAfgAfugugasusu	1977	đối nghĩa	23
UGAUACUUCUUUGAAUGUAGA	882	usgsauacUfuCfUfUfUfugaauguagaL96	1978	có nghĩa	21
UCUACAUUCAAAGAAGUAUCACC	883	usCfsuacAfuUfCfaaagAfaGfuaucascsc	1979	đối nghĩa	23
GAUACUUCUUUGAAUGUAGAU	884	gsasuacuUfcUfUfUfUfgaauguagauL96	1980	có nghĩa	21
AUCUACAUUCAAAGAAGUAUCAC	885	asUfscuaCfaUfUfcaaaGfaAfguaucsasc	1981	đối nghĩa	23
UUGGUGAUACUUCUUUGAAUG	886	ususggugAfuAfCfUfucuuugaaugL96	1982	có nghĩa	21
CAUUCAAAGAAGUAUCACCAAUU	887	csAfsuucAfaAfGfaaguAfuCfaccaasusu	1983	đối nghĩa	23
AUUGGUGAUACUUCUUUGAAU	888	asusugguGfaUfAfCfuucuuugaauL96	1984	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUUCAAAGAAGUAUCACCAAUUA	889	asUfsucaAfaGfAfaguaUfcAfccaaususa	1985	đối nghĩa	23
AAUAACCUGUGAAAAUGCUCC	890	asasuaacCfuGfUfGfaaaaugcuccL96	1986	có nghĩa	21
GGAGCAUUUUCACAGGUUAUUGC	891	gsGfsagcAfuUfUfucacAfgGfuuauusgsc	1987	đối nghĩa	23
AUAACCUGUGAAAAUGCUCCC	892	asusaaccUfgUfGfAfaaaugcucccL96	1988	có nghĩa	21
GGGAGCAUUUUCACAGGUUAUUG	893	gsGfsgagCfaUfUfuucaCfaGfguuaususg	1989	đối nghĩa	23
UAGCAAUAACCUGUGAAAAUG	894	usasgcaaUfaAfCfCfugugaaaaugL96	1990	có nghĩa	21
CAUUUUCACAGGUUAUUGCUAUC	895	csAfsuuuUfcAfCfaggUfaUfugcuasusc	1991	đối nghĩa	23
AUAGCAAUAACCUGUGAAAAU	896	asusagcaAfuAfAfCfcugugaaaauL96	1992	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUUUUCACAGGUUAUUGCUAUCC	897	asUfsuuuCfaCfAfgguuAfuUfgcuauscsc	1993	đối nghĩa	23
AAUCACAUCUUUAGUGUCUGA	898	asasucacAfuCfUfUfuagugucugaL96	1994	có nghĩa	21
UCAGACACUAAAGAUGUGAUUGG	899	usCfsagaCfaCfUfaaagAfuGfugauusgsg	1995	đối nghĩa	23
AUCACAUCUUUAGUGUCUGAA	900	asuscacaUfcUfUfUfagugucugaaL96	1996	có nghĩa	21
UUCAGACACUAAAGAUGUGAUUG	901	usUfscagAfcAfCfuaaaGfaUfugaususg	1997	đối nghĩa	23
UUCCAAUCACAUCUUUAGUGU	902	ususccaaUfcAfCfAfucuuuaguguL96	1998	có nghĩa	21
ACACUAAAGAUGUGAUUGGAAAU	903	asCfsacuAfaAfGfauguGfaUfuggaasasu	1999	đối nghĩa	23
UUUCCAAUCACAUCUUUAGUG	904	ususuccaAfuCfAfCfaucuuuagugL96	2000	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CACUAAAGAUGUGAUUGGAAAUC	905	csAfscuaAfaGfAfugugAfuUfggaaasusc	2001	đối nghĩa	23
ACGGGCAUGAUGUUGAGUUCC	906	ascsgggcAfuGfAfUfguugaguuccL96	2002	có nghĩa	21
GGAACUCAACAUCAUGCCCGUUC	907	gsGfsaacUfcAfAfcaucAfuGfcccgususc	2003	đối nghĩa	23
CGGGCAUGAUGUUGAGUUCCU	908	csgsggcaUfgAfUfGfuugaguuccuL96	2004	có nghĩa	21
AGGAACUCAACAUCAUGCCCGUU	909	asGfsgaaCfuCfAfacauCfaUfgcccgsusu	2005	đối nghĩa	23
GGGAACGGGCAUGAUGUUGAG	910	gsgsgaacGfgGfCfAfugauguugagL96	2006	có nghĩa	21
CUCAACAUCAUGCCCGUUCCCAG	911	csUfscaaCfaUfCfaugcCfcGfuucccsasg	2007	đối nghĩa	23
UGGGAACGGGCAUGAUGUUGA	912	usgsggaaCfgGfGfCfaugauguugaL96	2008	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCAACAUCAUGCCCGUUCCCAGG	913	usCfsaacAfuCfAfugccCfgUfucccasgsg	2009	đối nghĩa	23
ACUAAGGUGAAAAGAUAAUGA	914	ascsuaagGfuGfAfAfaagauaaugaL96	2010	có nghĩa	21
UCAUUAUCUUUUCACCUUAGUGU	915	usCfsauuAfuCfUfuuucAfcCfuuagusgsu	2011	đối nghĩa	23
CUAAGGUGAAAAGAUAAUGAU	916	csusaaggUfgAfAfAfagauaaugauL96	2012	có nghĩa	21
AUCAUUAUCUUUUCACCUUAGUG	917	asUfscauUfaUfCfuuuuCfaCfcuuagsusg	2013	đối nghĩa	23
AAACACUAAGGUGAAAAGAUA	918	asasacacUfaAfGfGfugaaaagauaL96	2014	có nghĩa	21
UAUCUUUUCACCUUAGUGUUUGC	919	usAfsucuUfuUfCfaccuUfaGfuguuusgsc	2015	đối nghĩa	23
CAAACACUAAGGUGAAAAGAU	920	csasaacaCfuAfAfGfgugaaaagauL96	2016	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUCUUUUCACCUUAGUGUUUGCU	921	asUfscuuUfuCfAfccuuAfgUfguuugscsu	2017	đối nghĩa	23
AGGUAGCACUGGAGAGAAUUG	922	asgsguagCfaCfUfGfgagagaauugL96	2018	có nghĩa	21
CAAUUCUCUCCAGUGCUACCUUC	923	csAfsauuCfuCfUfccagUfgCfuaccususc	2019	đối nghĩa	23
GGUAGCACUGGAGAGAAUUGG	924	gsgsuagcAfcUfGfGfagagaauuggL96	2020	có nghĩa	21
CCAAUUCUCUCCAGUGCUACCUU	925	csCfsaauUfcUfCfuccaGfuGfcuaccsusu	2021	đối nghĩa	23
GAGAAGGUAGCACUGGAGAGA	926	gsasgaagGfuAfGfCfacuggagagaL96	2022	có nghĩa	21
UCUCUCCAGUGCUACCUUCUCAA	927	usCfsucuCfcAfGfugcuAfcCfuucucsasa	2023	đối nghĩa	23
UGAGAAGGUAGCACUGGAGAG	928	usgsagaaGfgUfAfGfcacuggagagL96	2024	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CUCUCCAGUGCUACCUUCUCAAA	929	csUfscucCfaGfUfgcuaCfcUfucucasasa	2025	đối nghĩa	23
AGUGGACUUGCUGCAUAUGUG	930	asgsuggaCfuUfGfCfugcauaugugL96	2026	có nghĩa	21
CACAUAUGCAGCAAGUCCACUGU	931	csAfscauAfuGfCfagcaAfgUfccacusgsu	2027	đối nghĩa	23
GUGGACUUGCUGCAUAUGUGG	932	gsusggacUfuGfCfUfgcauauguggL96	2028	có nghĩa	21
CCACAUAUGCAGCAAGUCCACUG	933	csCfsacaUfaUfGfcagcAfaGfuccacsusg	2029	đối nghĩa	23
CGACAGUGGACUUGCUGCAUA	934	csgsacagUfgGfAfCfuugcugcauaL96	2030	có nghĩa	21
UAUGCAGCAAGUCCACUGUCGUC	935	usAfsugcAfgCfAfagucCfaCfugucgsusc	2031	đối nghĩa	23
ACGACAGUGGACUUGCUGCAU	936	ascsgacaGfuGfGfAfcuugcugcauL96	2032	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUGCAGCAAGUCCACUGUCGUCU	937	asUfsgcaGfcAfAfguccAfcUfgucguscsu	2033	đối nghĩa	23
AAGGUGUUCAAGAUGUCCUCG	938	asasggugUfuCfAfAfgauguccucgL96	2034	có nghĩa	21
CGAGGACAUCUUGAACACCUUUC	939	csGfsaggAfcAfUfcuugAfaCfaccuususc	2035	đối nghĩa	23
AGGUGUUCAAGAUGUCCUCGA	940	asgsguguUfcAfAfGfauguccucgaL96	2036	có nghĩa	21
UCGAGGACAUCUUGAACACCUUU	941	usCfsgagGfaCfAfucuuGfaAfcaccususu	2037	đối nghĩa	23
GAGAAAGGUGUUCAAGAUGUC	942	gsasgaaaGfgUfGfUfucaagaugucL96	2038	có nghĩa	21
GACAUCUUGAACACCUUUCUCCC	943	gsAfscauCfuUfGfaacaCfcUfuucucscsc	2039	đối nghĩa	23
GGAGAAAGGUGUUCAAGAUGU	944	gsgsagaaAfgGfUfGfuucaagauguL96	2040	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
ACAUCUUGAACACCUUUCUCCCC	945	asCfsaucUfuGfAfacacCfuUfucuccscsc	2041	đối nghĩa	23
AACCGUCUGGAUGAUGUGCGU	946	asasccguCfuGfGfAfugaugugcguL96	2042	có nghĩa	21
ACGCACAUCAUCCAGACGGUUGC	947	asCfsgcaCfaUfCfauccAfgAfcgguusgsc	2043	đối nghĩa	23
ACCGUCUGGAUGAUGUGCGUA	948	ascscgucUfgGfAfUfgaugugcguaL96	2044	có nghĩa	21
UACGCACAUCAUCCAGACGGUUG	949	usAfscgcAfcAfUfcaucCfaGfacggususg	2045	đối nghĩa	23
GGGCAACCGUCUGGAUGAUGU	950	gsgsgcaaCfcGfUfCfuggaugauguL96	2046	có nghĩa	21
ACAUCAUCCAGACGGUUGCCCAG	951	asCfsaucAfuCfCfagacGfgUfugcccsasg	2047	đối nghĩa	23
UGGGCAACCGUCUGGAUGAUG	952	usgsggcaAfcCfGfUfcuggaugaugL96	2048	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CAUCAUCCAGACGGUUGCCCAGG	953	csAfsucaUfcCfAfgacgGfuUfgcccasgsg	2049	đối nghĩa	23
GAAACUUUGGCUGAUAAUAUU	954	gsasaacuUfuGfGfCfugauaauauuL96	2050	có nghĩa	21
AAUAUUAUCAGCCAAAGUUUCUU	955	asAfsuauUfaUfCfagccAfaAfguuucsusu	2051	đối nghĩa	23
AAACUUUGGCUGAUAAUAUUG	956	asasacuuUfgGfCfUfgauaauauugL96	2052	có nghĩa	21
CAAUAUUAUCAGCCAAAGUUUCU	957	csAfsauaUfuAfUfcagcCfaAfaguuuscsu	2053	đối nghĩa	23
UGAAGAAACUUUGGCUGAUAA	958	usgsaagaAfaCfUfUfuggcugauaaL96	2054	có nghĩa	21
UUAUCAGCCAAAGUUUCUUCAUC	959	usUfsaucAfgCfCfaaagUfuUfcuucasusc	2055	đối nghĩa	23
AUGAAGAAACUUUGGCUGAUA	960	asusgaagAfaAfCfUfuuggcugauaL96	2056	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UAUCAGCCAAAGUUUCUUCAUCA	961	usAfsucaGfcCfAfaaguUfuCfuucauscsa	2057	đối nghĩa	23
AAAGGUGUUCAAGAUGUCCUC	962	asasagguGfuUfCfAfagauguccucL96	2058	có nghĩa	21
GAGGACAUCUUGAACACCUUUCU	963	gsAfsggaCfaUfCfuugaAfcAfccuuuscsu	2059	đối nghĩa	23
AAGGUGUUCAAGAUGUCCUCG	964	asasggugUfuCfAfAfgauguccucgL96	2060	có nghĩa	21
CGAGGACAUCUUGAACACCUUUC	965	csGfsaggAfcAfUfcuugAfaCfaccuususc	2061	đối nghĩa	23
GGAGAAAGGUGUUCAAGAUGU	966	gsgsagaaAfgGfUfGfuucaagauguL96	2062	có nghĩa	21
ACAUCUUGAACACCUUUCUCCCC	967	asCfsaucUfuGfAfacacCfuUfucuccscsc	2063	đối nghĩa	23
GGGAGAAAGGUGUUCAAGAUG	968	gsgsgagaAfaGfGfUfguucaagaugL96	2064	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CAUCUUGAACACCUUUCUCCCCC	969	csAfsucuUfgAfAfcaccUfuUfcucccscsc	2065	đối nghĩa	23
AAAUCAGUACUUCCAAAGUCU	970	asasaucaGfuAfCfUfuccaaagucuL96	2066	có nghĩa	21
AGACUUUGGAAGUACUGAUUUAG	971	asGfsacuUfuGfGfaaguAfcUfgauuusasg	2067	đối nghĩa	23
AAUCAGUACUUCCAAAGUCUA	972	asasucagUfaCfUfUfUfccaaagucuaL96	2068	có nghĩa	21
UAGACUUUGGAAGUACUGAUUUA	973	usAfsgacUfuUfGfgaagUfaCfugauususa	2069	đối nghĩa	23
UGCUAAAUCAGUACUUCCAAA	974	usgscuaaAfuCfAfGfuacuuccaaaL96	2070	có nghĩa	21
UUUGGAAGUACUGAUUUAGCAUG	975	usUfsuggAfaGfUfacugAfuUfuagcasusg	2071	đối nghĩa	23
AUGCUAAAUCAGUACUUCCAA	976	asusgcuaAfaUfCfAfguacuuccaaL96	2072	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UUGGAAGUACUGAUUUAGCAUGU	977	usUfsggaAfgUfAfcugaUfuUfagcausgsu	2073	đối nghĩa	23
ACAUCUUUAGUGUCUGAAUAU	978	ascsaucuUfuAfGfUfgucugaauauL96	2074	có nghĩa	21
AUAUUCAGACACUAAAGAUGUGA	979	asUfsauuCfaGfAfcacuAfaAfgaugusgsa	2075	đối nghĩa	23
CAUCUUUAGUGUCUGAAUAUA	980	csasucuuUfaGfUfGfucugaauauaL96	2076	có nghĩa	21
UAUAUUCAGACACUAAAGAUGUG	981	usAfsuauUfcAfGfacacUfaAfagaugsusg	2077	đối nghĩa	23
AAUCACAUCUUUAGUGUCUGA	982	asasucacAfuCfUfUfuagugucugaL96	2078	có nghĩa	21
UCAGACACUAAAGAUGUGAUUGG	983	usCfsagaCfaCfUfaaagAfuGfugauusgsg	2079	đối nghĩa	23
CAAUCACAUCUUUAGUGUCUG	984	csasaucaCfaUfCfUfuuagugucugL96	2080	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CAGACACUAAAGAUGUGAUUGGA	985	csAfsgacAfcUfAfaagaUfgUfgauugsgsa	2081	đối nghĩa	23
GCAUGUAUUACUUGACAAAGA	986	gscsauguAfuUfAfCfuugacaaagaL96	2082	có nghĩa	21
UCUUUGUCAAGUAAUACAUGCUG	987	usCfsuuuGfuCfAfaguaAfuAfcaugcsusg	2083	đối nghĩa	23
CAUGUAUUACUUGACAAAGAG	988	csasuguaUfuAfCfUfugacaaagagL96	2084	có nghĩa	21
CUCUUUGUCAAGUAAUACAUGCU	989	csUfscuuUfgUfCfaaguAfaUfacaugscsu	2085	đối nghĩa	23
UUCAGCAUGUAUUACUUGACA	990	ususcagcAfuGfUfAfuuacuugacaL96	2086	có nghĩa	21
UGUCAAGUAAUACAUGCUGAAAA	991	usGfsucaAfgUfAfauacAfuGfcugaasasa	2087	đối nghĩa	23
UUUCAGCAUGUAUUACUUGAC	992	ususucagCfaUfGfUfauuacuugacL96	2088	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
GUCAAGUAAUACAUGCUGAAAAA	993	gsUfscaaGfuAfAfuacaUfgCfugaaasasa	2089	đối nghĩa	23
AUGUUACUUCUUAGAGAGAAA	994	asusguuaCfuUfCfUfuagagagaaaL96	2090	có nghĩa	21
UUUCUCUCUAAGAAGUAACAUAC	995	usUfsucuCfuCfUfaagaAfgUfaacausasc	2091	đối nghĩa	23
UGUUACUUCUUAGAGAGAAAU	996	usgsuuacUfuCfUfUfagagagaaauL96	2092	có nghĩa	21
AUUUCUCUCUAAGAAGUAACAUA	997	asUfsuucUfcUfCfuaagAfaGfuaacasusa	2093	đối nghĩa	23
AUGUAUGUUACUUCUUAGAGA	998	asusguauGfuUfAfCfuucuuagagaL96	2094	có nghĩa	21
UCUCUAAGAAGUAACAUACAUCC	999	usCfsucuAfaGfAfaguaAfcAfuacauscsc	2095	đối nghĩa	23
GAUGUAUGUUACUUCUUAGAG	1000	gsasuguaUfgUfUfAfcuucuuagagL96	2096	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CUCUAAGAAGUAACAUACAUCCU	1001	csUfscuaAfgAfAfguaaCfaUfacaucscsu	2097	đối nghĩa	23
ACAACUUUGAGAAGGUAGCAC	1002	ascsaacuUfuGfAfGfaagguagcacL96	2098	có nghĩa	21
GUGCUACCUUCUCAAAGUUGUGA	1003	gsUfsgcuAfcCfUfucucAfaAfguugusgsa	2099	đối nghĩa	23
CAACUUUGAGAAGGUAGCACU	1004	csasacuuUfgAfGfAfagguagcacuL96	2100	có nghĩa	21
AGUGCUACCUUCUCAAAGUUGUG	1005	asGfsugcUfaCfCfuucuCfaAfaguugsusg	2101	đối nghĩa	23
AUUCACAACUUUGAGAAGGUA	1006	asususcacAfaCfUfUfugagaagguaL96	2102	có nghĩa	21
UACCUUCUCAAAGUUGUGAAUCA	1007	usAfsccuUfcUfCfaaagUfuGfugaauscsa	2103	đối nghĩa	23
GAUUCACAACUUUGAGAAGGU	1008	gsasuucaCfaAfCfUfuugagaagguL96	2104	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
ACCUUCUCAAAGUUGUGAAUCAG	1009	asCfscuuCfuCfAfaaguUfgUfgaaucsasg	2105	đối nghĩa	23
AACAUGCUAAAUCAGUACUUC	1010	asascaugCfuAfAfAfucaguacuucL96	2106	có nghĩa	21
GAAGUACUGAUUUAGCAUGUUGU	1011	gsAfsaguAfcUfGfauuuAfgCfauguusgsu	2107	đối nghĩa	23
ACAUGCUAAAUCAGUACUUCC	1012	ascsaugcUfaAfAfUfcaguacuuccL96	2108	có nghĩa	21
GGAAGUACUGAUUUAGCAUGUUG	1013	gsGfsaagUfaCfUfgauuUfaGfcaugususg	2109	đối nghĩa	23
GAACAACAUGCUAAAUCAGUA	1014	gsasacaaCfaUfGfCfuaaaucaguaL96	2110	có nghĩa	21
UACUGAUUUAGCAUGUUGUUCAU	1015	usAfscugAfuUfUfagcaUfgUfuguucsasu	2111	đối nghĩa	23
UGAACAACAUGCUAAAUCAGU	1016	usgsaacaAfcAfUfGfcuaaaucaguL96	2112	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
ACUGAUUUAGCAUGUUGUUCAUA	1017	asCfsugaUfuUfAfgcauGfuUfguucasusa	2113	đối nghĩa	23
AAACCAGUACUUUAUCAUUUU	1018	asasaccaGfuAfCfUfuuaucauuuuL96	2114	có nghĩa	21
AAAAUGAUAAAGUACUGGUUUCA	1019	asAfsaauGfaUfAfaaguAfcUfgguuuscsa	2115	đối nghĩa	23
AACCAGUACUUUAUCAUUUUC	1020	asasccagUfaCfUfUfuaucauuuucL96	2116	có nghĩa	21
GAAAAUGAUAAAGUACUGGUUUC	1021	gsAfsaaaUfgAfUfaaagUfaCfugguususc	2117	đối nghĩa	23
UUUGAAACCAGUACUUUAUCA	1022	ususugaaAfcCfAfGfuacuuuaucaL96	2118	có nghĩa	21
UGAUAAAGUACUGGUUUCAAAAU	1023	usGfsauaAfaGfUfacugGfuUfucaaasasu	2119	đối nghĩa	23
UUUUGAAACCAGUACUUUAUC	1024	ususuugaAfaCfCfAfguacuuuaucL96	2120	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
GAUAAAGUACUGGUUUCAAAAUU	1025	gsAfsuaaAfgUfAfcuggUfuUfcaaaasusu	2121	đối nghĩa	23
GAGAAGAUGGGCUACAAGGCC	1026	gsasgaagAfuGfGfGfcuacaaggccL96	2122	có nghĩa	21
GGCCUUGUAGCCCAUCUUCUCUG	1027	gsGfsccuUfgUfAfgccAfuCfuucucsusg	2123	đối nghĩa	23
AGAAGAUGGGCUACAAGGCCA	1028	asgsaagaUfgGfGfCfuacaaggccaL96	2124	có nghĩa	21
UGGCCUUGUAGCCCAUCUUCUCU	1029	usGfsgccUfuGfUfagccCfaUfcuucuscsu	2125	đối nghĩa	23
GGCAGAGAAGAUGGGCUACAA	1030	gsgscagaGfaAfGfAfugggcuacaaL96	2126	có nghĩa	21
UUGUAGCCCAUCUUCUCUGCCUG	1031	usUfsguaGfcCfCfaucuUfcUfcugccsusg	2127	đối nghĩa	23
AGGCAGAGAAGAUGGGCUACA	1032	asgsgcagAfgAfAfGfaugggcuacaL96	2128	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UGUAGCCCAUCUUCUCUGCCUGC	1033	usGfsuagCfcCfAfucuuCfuCfugccusgsc	2129	đối nghĩa	23
AACGGGCAUGAUGUUGAGUUC	1034	asascgggCfaUfGfAfuguugaguucL96	2130	có nghĩa	21
GAACUCAACAUCAUGCCCGUUCC	1035	gsAfsacuCfaAfCfaucaUfgCfccguuscsc	2131	đối nghĩa	23
ACGGGCAUGAUGUUGAGUUCC	1036	ascsgggcAfuGfAfUfguugaguuccL96	2132	có nghĩa	21
GGAACUCAACAUCAUGCCCGUUC	1037	gsGfsaacUfcAfAfcaucAfuGfcccgususc	2133	đối nghĩa	23
UGGGAACGGGCAUGAUGUUGA	1038	usgsggaaCfgGfGfCfaugauguugaL96	2134	có nghĩa	21
UCAACAUCAUGCCCGUUCCCAGG	1039	usCfsaacAfuCfAfugccCfgUfucccasgsg	2135	đối nghĩa	23
CUGGGAACGGGCAUGAUGUUG	1040	csusgggaAfcGfGfGfcaugauguugL96	2136	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CAACAUCAUGCCCGUUCCCAGGG	1041	csAfsacaUfcAfUfgccGfuUfcccagsgsg	2137	đối nghĩa	23
AUGUGGCUAAAGCAAUAGACC	1042	asusguggCfuAfAfAfAfgcaauagaccL96	2138	có nghĩa	21
GGUCUAUUGCUUUAGCCACAUAU	1043	gsGfsucuAfuUfGfcuuuAfgCfcacausasu	2139	đối nghĩa	23
UGUGGCUAAAGCAAUAGACCC	1044	usgsuggcUfaAfAfAfGfcaauagacccL96	2140	có nghĩa	21
GGGUCUAUUGCUUUAGCCACAUA	1045	gsGfsgucUfaUfUfgcuuUfaGfccacasusa	2141	đối nghĩa	23
GCAUAUGUGGCUAAAGCAAUA	1046	gscsauauGfuGfGfCfuaaagcaauaL96	2142	có nghĩa	21
UAUUGCUUUAGCCACAUAUGCAG	1047	usAfsuugCfuUfUfagccAfcAfuaugcsasg	2143	đối nghĩa	23
UGCAUAUGUGGCUAAAGCAAU	1048	usgscauaUfgUfGfGfcuaaagcaauL96	2144	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUUGCUUUAGCCACAUAUGCAGC	1049	asUfsugcUfuUfAfgccaCfaUfaugcasgsc	2145	đối nghĩa	23
AGGAUGCUCCGGAAUGUUGCU	1050	asgsgaugCfuCfCfGfgaauguugcuL96	2146	có nghĩa	21
AGCAACAUUCCGGAGCAUCCUUG	1051	asGfscaaCfaUfUfccggAfgCfauccususg	2147	đối nghĩa	23
GGAUGCUCCGGAAUGUUGCUG	1052	gsgsaugcUfcCfGfGfaauguugcugL96	2148	có nghĩa	21
CAGCAACAUUCCGGAGCAUCCUU	1053	csAfsgcaAfcAfUfuccgGfaGfcauccsusu	2149	đối nghĩa	23
UCCAAGGAUGCUCCGGAAUGU	1054	uscscaagGfaUfGfCfuccggaauguL96	2150	có nghĩa	21
ACAUUCCGGAGCAUCCUUGGAUA	1055	asCfsauuCfcGfGfagcaUfcCfuuggasusa	2151	đối nghĩa	23
AUCCAAGGAUGCUCCGGAAUG	1056	asusccaaGfgAfUfGfcuccggaaugL96	2152	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CAUUCCGGAGCAUCCUUGGAUAC	1057	csAfsuucCfgGfAfgcauCfcUfuggausasc	2153	đối nghĩa	23
UCACAUCUUUAGUGUCUGAAU	1058	uscsacauCfuUfUfAfgugucugaauL96	2154	có nghĩa	21
AUUCAGACACUAAAGAUGUGAUU	1059	asUfsucaGfaCfAfcuaaAfgAfugugasusu	2155	đối nghĩa	23
CACAUCUUUAGUGUCUGAAUA	1060	csascaucUfuUfAfGfugucugaauaL96	2156	có nghĩa	21
UAUUCAGACACUAAAGAUGUGAU	1061	usAfsuucAfgAfCfacuaAfaGfaugugsasu	2157	đối nghĩa	23
CCAAUCACAUCUUUAGUGUCU	1062	cscsaaucAfcAfUfCfuuuagugucuL96	2158	có nghĩa	21
AGACACUAAAGAUGUGAUUGGAA	1063	asGfsacaCfuAfAfagauGfuGfauuggsasa	2159	đối nghĩa	23
UCCAAUCACAUCUUUAGUGUC	1064	uscscaauCfaCfAfUfcuuuagugucL96	2160	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
GACACUAAAGAUGUGAUUGGAAA	1065	gsAfscacUfaAfAfgaugUfgAfuuggasasa	2161	đối nghĩa	23
AAAUGUGUUUAGACAACGUCA	1066	asasauguGfuUfUfAfgacaacgucaL96	2162	có nghĩa	21
UGACGUUGUCUAAACACAUUUUC	1067	usGfsacgUfuGfUfcuaaAfcAfcauuususc	2163	đối nghĩa	23
AAUGUGUUUAGACAACGUCAU	1068	asasugugUfuUfAfGfacaacgucauL96	2164	có nghĩa	21
AUGACGUUGUCUAAACACAUUUU	1069	asUfsgacGfuUfGfucuaAfaCfacauususu	2165	đối nghĩa	23
UUGAAAAUGUGUUUAGACAAC	1070	ususgaaaAfuGfUfGfuuuagacaacL96	2166	có nghĩa	21
GUUGUCUAAACACAUUUUCAAUG	1071	gsUfsuguCfuAfAfacacAfuUfuucaasusg	2167	đối nghĩa	23
AUUGAAAAUGUGUUUAGACAA	1072	asususgaaAfaUfGfUfguuuagacaaL96	2168	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UUGUCUAAACACAUUUUCAAUGU	1073	usUfsgucUfaAfAfcacaUfuUfucaausgsu	2169	đối nghĩa	23
UACUAAAGGAAGAAUUCCGGU	1074	usascuaaAfgGfAfAfgaauuccgguL96	2170	có nghĩa	21
ACCGGAAUUCUUCCUUUAGUAUC	1075	asCfscggAfaUfUfcuucCfuUfuaguasusc	2171	đối nghĩa	23
ACUAAAGGAAGAAUUCCGGUU	1076	ascsuaaaGfgAfAfGfaauuccgguuL96	2172	có nghĩa	21
AACCGGAAUUCUUCCUUUAGUAU	1077	asAfsccgGfaAfUfucuuCfcUfuuagusasu	2173	đối nghĩa	23
GAGAUACUAAAGGAAGAAUUC	1078	gsasgauaCfuAfAfAfggaagaauucL96	2174	có nghĩa	21
GAAUUCUUCCUUUAGUAUCUCGA	1079	gsAfsauuCfuUfCfcuuuAfgUfaucucsgsa	2175	đối nghĩa	23
CGAGAUACUAAAGGAAGAAUU	1080	csgsagauAfcUfAfAfaggaagaauuL96	2176	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AAUUCUUCCUUUAGUAUCUCGAG	1081	asAfsuucUfuCfCfuuuaGfuAfucucgsasg	2177	đối nghĩa	23
AACUUUGGCUGAUAAUAUUGC	1082	asascuuuGfgCfUfGfauaauauugcL96	2178	có nghĩa	21
GCAAUAUUAUCAGCCAAAGUUUC	1083	gsCfsaauAfuUfAfucagCfcAfaaguususc	2179	đối nghĩa	23
ACUUUGGCUGAUAAUAUUGCA	1084	ascsuuugGfcUfGfAfuaauauugcaL96	2180	có nghĩa	21
UGCAAUAUUAUCAGCCAAAGUUU	1085	usGfscaaUfaUfUfaucaGfcCfaaagususu	2181	đối nghĩa	23
AAGAAACUUUGGCUGAUAAUA	1086	asasgaaaCfuUfUfGfgcugauaauaL96	2182	có nghĩa	21
UAUUAUCAGCCAAAGUUUCUUCA	1087	usAfsuuaUfcAfGfccaaAfgUfuucuuscsa	2183	đối nghĩa	23
GAAGAAACUUUGGCUGAUAAU	1088	gsasagaaAfcUfUfUfggcugauaauL96	2184	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUUAUCAGCCAAAGUUUCUUCAU	1089	asUfsuauCfaGfCfcaaaGfuUfucuucsasu	2185	đối nghĩa	23
AAAUGGCUGAGAAGACUGACA	1090	asasauggCfuGfAfGfaagacugacaL96	2186	có nghĩa	21
UGUCAGUCUUCUCAGCCAUUUGA	1091	usGfsucaGfuCfUfucucAfgCfcauuusgsa	2187	đối nghĩa	23
AAUGGCUGAGAAGACUGACAU	1092	asasuggcUfgAfGfAfagacugacauL96	2188	có nghĩa	21
AUGUCAGUCUUCUCAGCCAUUUG	1093	asUfsgucAfgUfCfuucuCfaGfccauususg	2189	đối nghĩa	23
UAUCAAAUGGCUGAGAAGACU	1094	usasucaaAfuGfGfCfugagaagacuL96	2190	có nghĩa	21
AGUCUUCUCAGCCAUUUGAUAUC	1095	asGfsucuUfcUfCfagccAfuUfugauasusc	2191	đối nghĩa	23
AUAUCAAAUGGCUGAGAAGAC	1096	asusaucaAfaUfGfGfcugagaagacL96	2192	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
GUCUUCUCAGCCAUUUGAUAUCU	1097	gsUfscuuCfuCfAfgccaUfuUfgauauscsu	2193	đối nghĩa	23
GUGGUUCUUAAAUUGUAAGCU	1098	gsusgguuCfuUfAfAfauuguaagcuL96	2194	có nghĩa	21
AGCUUACAAUUUAAGAACCACUG	1099	asGfscuuAfcAfAfuuuaAfgAfaccacsusg	2195	đối nghĩa	23
UGGUUCUUAAAUUGUAAGCUC	1100	usgsguucUfuAfAfAfauuguaagcucL96	2196	có nghĩa	21
GAGCUUACAAUUUAAGAACCACU	1101	gsAfsgcuUfaCfAfauuuAfaGfaaccascsu	2197	đối nghĩa	23
AACAGUGGUUCUUAAAUUGUA	1102	asascaguGfgUfUfCfuuaaauuguaL96	2198	có nghĩa	21
UACAAUUUAAGAACCACUGUUUU	1103	usAfscaaUfuUfAfagaaCfcAfcuguususu	2199	đối nghĩa	23
AAACAGUGGUUCUUAAAUUGU	1104	asasacagUfgGfUfUfcuuaaauuguL96	2200	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
ACAAUUUAAGAACCACUGUUUUA	1105	asCfsaauUfuAfAfgaacCfaCfuguuususa	2201	đối nghĩa	23
AAGUCAUCGACAAGACAUUGG	1106	asasgucaUfcGfAfCfaagacauuggL96	2202	có nghĩa	21
CCAAUGUCUUGUCGAUGACUUUC	1107	csCfsaauGfuCfUfugucGfaUfgacuususc	2203	đối nghĩa	23
AGUCAUCGACAAGACAUUGGU	1108	asgsucauCfgAfCfAfagacauugguL96	2204	có nghĩa	21
ACCAAUGUCUUGUCGAUGACUUU	1109	asCfscaaUfgUfCfuuguCfgAfugacususu	2205	đối nghĩa	23
GUGAAAGUCAUCGACAAGACA	1110	gsusgaaaGfuCfAfUfcgacaagacaL96	2206	có nghĩa	21
UGUCUUGUCGAUGACUUUCACAU	1111	usGfsucuUfgUfCfgaugAfcUfuucacsasu	2207	đối nghĩa	23
UGUGAAAGUCAUCGACAAGAC	1112	usgsugaaAfgUfCfAfucgacaagacL96	2208	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
GUCUUGUCGAUGACUUUCACAUU	1113	gsUfscuuGfuCfGfaugaCfuUfucacasusu	2209	đối nghĩa	23
GAUAAUAUUGCAGCAUUUUCC	1114	gsasuaauAfuUfGfCfagcauuuuccL96	2210	có nghĩa	21
GGAAAAUGCUGCAAUAUUAUCAG	1115	gsGfsaaaAfuGfCfugcaAfuAfuuaucsasg	2211	đối nghĩa	23
AUAAUAUUGCAGCAUUUUCCA	1116	asusaauaUfuGfCfAfgcauuuuccaL96	2212	có nghĩa	21
UGGAAAAUGCUGCAAUAUUAUCA	1117	usGfsgaaAfaUfGfcugcAfaUfauuauscsa	2213	đối nghĩa	23
GGCUGAUAAUAUUGCAGCAUU	1118	gsgscugaUfaAfUfAfuugcagcauuL96	2214	có nghĩa	21
AAUGCUGCAAUAUUAUCAGCCAA	1119	asAfsugcUfgCfAfauauUfaUfcagccsasa	2215	đối nghĩa	23
UGGCUGAUAAUAUUGCAGCAU	1120	usgsgcugAfuAfAfUfauugcagcauL96	2216	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUGCUGCAAUAUUAUCAGCCAAA	1121	asUfsgcuGfcAfAfuauuAfuCfagccasasa	2217	đối nghĩa	23
GCUAAUUUGUAUCAAUGAUUA	1122	gscsuaauUfuGfUfAfucaaugauuaL96	2218	có nghĩa	21
UAAUCAUUGAUACAAAUUAGCCG	1123	usAfsaucAfuUfGfauacAfaAfuuagcscsg	2219	đối nghĩa	23
CUAAUUUGUAUCAAUGAUUAU	1124	csusaauuUfgUfAfUfcaaugauuauL96	2220	có nghĩa	21
AUAAUCAUUGAUACAAAUUAGCC	1125	asUfsaauCfaUfUfgauaCfaAfauuagscsc	2221	đối nghĩa	23
CCCGGCUAAUUUGUAUCAAUG	1126	cscscggcUfaAfUfUfuguaucaaugL96	2222	có nghĩa	21
CAUUGAUACAAAUUAGCCGGGGG	1127	csAfsuugAfuAfCfaauUfaGfccgggsgsg	2223	đối nghĩa	23
CCCCGGCUAAUUUGUAUCAAU	1128	cscsccggCfuAfAfUfuuguaucaauL96	2224	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUUGAUACAAAUUAGCCGGGGGA	1129	asUfsugaUfaCfAfaauuAfgCfcggggsgsa	2225	đối nghĩa	23
UAAUUGGUGAUACUUCUUUGA	1130	usasauugGfuGfAfUfacuucuuugaL96	2226	có nghĩa	21
UCAAAGAAGUAUCACCAAUUACC	1131	usCfsaaaGfaAfGfuaucAfcCfaauuascsc	2227	đối nghĩa	23
AAUUGGUGAUACUUCUUUGAA	1132	asasuuggUfgAfUfAfcuucuuugaaL96	2228	có nghĩa	21
UUCAAAGAAGUAUCACCAAUUAC	1133	usUfscaaAfgAfAfguauCfaCfcaauusasc	2229	đối nghĩa	23
GCGGUAAUUGGUGAUACUUCU	1134	gscsgguaAfuUfGfGfugauacuucuL96	2230	có nghĩa	21
AGAAGUAUCACCAAUUACCGCCA	1135	asGfsaagUfaUfCfaccaAfuUfaccgcscsa	2231	đối nghĩa	23
GGCGGUAAUUGGUGAUACUUC	1136	gsgscgguAfaUfUfGfgugauacuucL96	2232	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
GAAGUAUCACCAAUUACCGCCAC	1137	gsAfsaguAfuCfAfccaaUfuAfccgccsasc	2233	đối nghĩa	23
CAGUGGUUCUUAAAUUGUAAG	1138	csasguggUfuCfUfUfUfaaauuguaagL96	2234	có nghĩa	21
CUUACAAUUUAAGAACCACUGUU	1139	csUfsuacAfaUfUfuaagAfaCfcacugsusu	2235	đối nghĩa	23
AGUGGUUCUUAAAUUGUAAGC	1140	asgsugguUfcUfUfAfaauuguaagcL96	2236	có nghĩa	21
GCUUACAAUUUAAGAACCACUGU	1141	gsCfsuuaCfaAfUfuuaaGfaAfccacusgsu	2237	đối nghĩa	23
AAAACAGUGGUCUUAAAUUG	1142	asasaacaGfuGfGfUfucuuaaauugL96	2238	có nghĩa	21
CAAUUUAAGAACCACUGUUUUAA	1143	csAfsauuUfaAfGfaaccAfcUfguuuusasa	2239	đối nghĩa	23
UAAAACAGUGGUUCUUAAAUU	1144	usasaaacAfgUfGfGfuucuuaaauuL96	2240	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AAUUUAAGAACCACUGUUUUAAA	1145	asAfsuuuAfaGfAfaccaCfuGfuuuuasasa	2241	đối nghĩa	23
ACCUGUAUUCUGUUUACAUGU	1146	ascscuguAfuUfCfUfguuuacauguL96	2242	có nghĩa	21
ACAUGUAAACAGAAUACAGGUUA	1147	asCfsaugUfaAfAfcagaAfuAfcaggususa	2243	đối nghĩa	23
CCUGUAUUCUGUUUACAUGUC	1148	cscsuguaUfuCfUfGfuuuacauguc L96	2244	có nghĩa	21
GACAUGUAAACAGAAUACAGGUU	1149	gsAfscauGfuAfAfacagAfaUfacaggsusu	2245	đối nghĩa	23
AUUAACCUGUAUUCUGUUUAC	1150	asusuaacCfuGfUfAfuucuguuuacL96	2246	có nghĩa	21
GUAAACAGAAUACAGGUUAAUAA	1151	gsUfsaaaCfaGfAfauacAfgGfuuaausasa	2247	đối nghĩa	23
UAUUAACCUGUAUUCUGUUUA	1152	usasuuaaCfcUfGfUfauucuguuuaL96	2248	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UAAACAGAAUACAGGUUAAUAAA	1153	usAfsaacAfgAfAfuacaGfgUfuaauasasa	2249	đối nghĩa	23
AAGAAACUUUGGCUGAUAAUA	1154	asasgaaaCfuUfUfGfgcugauaauaL96	2250	có nghĩa	21
UAUUAUCAGCCAAAGUUUCUUCA	1155	usAfsuuaUfcAfGfccaaAfgUfuucuuscsa	2251	đối nghĩa	23
AGAAACUUUGGCUGAUAAUAU	1156	asgsaaacUfuUfGfGfcugauaauauL96	2252	có nghĩa	21
AUAUUAUCAGCCAAAGUUUCUUC	1157	asUfsauuAfuCfAfgccaAfaGfuuucususc	2253	đối nghĩa	23
GAUGAAGAAACUUUGGCUGAU	1158	gsasugaaGfaAfAfCfuuuggcugauL96	2254	có nghĩa	21
AUCAGCCAAAGUUUCUUCAUCAU	1159	asUfscagCfcAfAfaguuUfcUfucaucsasu	2255	đối nghĩa	23
UGAUGAAGAAACUUUGGCUGA	1160	usgsaugaAfgAfAfAfcuuuggcugaL96	2256	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCAGCCAAAGUUUCUUCAUCAUU	1161	usCfsagcCfaAfAfguuuCfuUfcaucasusu	2257	đối nghĩa	23
GAAAGGUGUUCAAGAUGUCCU	1162	gsasaaggUfgUfUfCfaagauguccuL96	2258	có nghĩa	21
AGGACAUCUUGAACACCUUUCUC	1163	asGfsgacAfuCfUfugaaCfaCfcuuucsusc	2259	đối nghĩa	23
AAAGGUGUUCAAGAUGUCCUC	1164	asasagguGfuUfCfAfagauguccucL96	2260	có nghĩa	21
GAGGACAUCUUGAACACCUUUCU	1165	gsAfsggaCfaUfCfuugaAfcAfccuuuscsu	2261	đối nghĩa	23
GGGAGAAAGGUGUUCAAGAUG	1166	gsgsgagaAfaGfGfUfguucaagaugL96	2262	có nghĩa	21
CAUCUUGAACACCUUUCUCCCCC	1167	csAfsucuUfgAfAfcaccUfuUfcucccscsc	2263	đối nghĩa	23
GGGGAGAAAGGUGUUCAAGAU	1168	gsgsggagAfaAfGfGfuguucaagauL96	2264	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUCUUGAACACCUUUCUCCCCCU	1169	asUfscuuGfaAfCfaccuUfuCfuccccscsu	2265	đối nghĩa	23
AUCUUGGUGUCGAAUCAUGGG	1170	asuscuugGfuGfUfCfgaaucaugggL96	2266	có nghĩa	21
CCCAUGAUUCGACACCAAGAUCC	1171	csCfscauGfaUfUfcgacAfcCfaagauscsc	2267	đối nghĩa	23
UCUUGGUGUCGAAUCAUGGGG	1172	uscsuuggUfgUfCfGfaaucaugggL96	2268	có nghĩa	21
CCCCAUGAUUCGACACCAAGAUC	1173	csCfsccaUfgAfUfucgaCfaCfcaagasusc	2269	đối nghĩa	23
UGGGAUCUUGGUGUCGAAUCA	1174	usgsggauCfuUfGfGfugucgaaucaL96	2270	có nghĩa	21
UGAUUCGACACCAAGAUCCCAUU	1175	usGfsauuCfgAfCfaccaAfgAfucccasusu	2271	đối nghĩa	23
AUGGGAUCUUGGUGUCGAAUC	1176	asusgggaUfcUfUfGfgugucgaaucL96	2272	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
GAUUCGACACCAAGAUCCCAUUC	1177	gsAfsuucGfaCfAfccaaGfaUfcccaususc	2273	đối nghĩa	23
GCUACAAGGCCAUAUUUGUGA	1178	gscsuacaAfgGfCfCfauauuugugaL96	2274	có nghĩa	21
UCACAAAUAUGGCCUUGUAGCCC	1179	usCfsacaAfaUfAfuggcCfuUfguagcscsc	2275	đối nghĩa	23
CUACAAGGCCAUAUUUGUGAC	1180	csusacaaGfgCfCfAfuauuugugacL96	2276	có nghĩa	21
GUCACAAAUAUGGCCUUGUAGCC	1181	gsUfscacAfaAfUfauggCfcUfuguagscsc	2277	đối nghĩa	23
AUGGGCUACAAGGCCAUAUUU	1182	asusgggcUfaCfAfAfggccauauuuL96	2278	có nghĩa	21
AAAUAUGGCCUUGUAGCCCAUCU	1183	asAfsauaUfgGfCfcuugUfaGfcccauscsu	2279	đối nghĩa	23
GAUGGGCUACAAGGCCAUAUU	1184	gsasugggCfuAfCfAfaggccauauuL96	2280	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AAUAUGGCCUUGUAGCCCAUCUU	1185	asAfsuauGfgCfCfuuguAfgCfccaucsusu	2281	đối nghĩa	23
ACUGGAGAGAAUUGGAAUGGG	1186	ascsuggaGfaGfAfAfuuggaaugggL96	2282	có nghĩa	21
CCCAUUCCAAUUCUCUCCAGUGC	1187	csCfscauUfcCfAfaucUfcUfccagusgsc	2283	đối nghĩa	23
CUGGAGAGAAUUGGAAUGGGU	1188	csusggagAfgAfAfUfuggaauggguL96	2284	có nghĩa	21
ACCCAUUCCAAUUCUCUCCAGUG	1189	asCfsccaUfuCfCfaauuCfuCfuccagsusg	2285	đối nghĩa	23
UAGCACUGGAGAGAAUUGGAA	1190	usasgcacUfgGfAfGfagaauuggaaL96	2286	có nghĩa	21
UUCCAAUUCUCUCCAGUGCUACC	1191	usUfsccaAfuUfCfucucCfaGfugcuascsc	2287	đối nghĩa	23
GUAGCACUGGAGAGAAUUGGA	1192	gsusagcaCfuGfGfAfgagaauuggaL96	2288	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCCAAUUCUCUCCAGUGCUACCU	1193	usCfscaaUfuCfUfcuccAfgUfgcuacscsu	2289	đối nghĩa	23
ACAGUGGACACACCUUACCUG	1194	ascsagugGfaCfAfCfaccuuaccugL96	2290	có nghĩa	21
CAGGUAAGGUGUGUCCACUGUCA	1195	csAfsgguAfaGfGfugugUfcCfacuguscsa	2291	đối nghĩa	23
CAGUGGACACACCUUACCUGG	1196	csasguggAfcAfCfAfccuuaccuggL96	2292	có nghĩa	21
CCAGGUAAGGUGUGUCCACUGUC	1197	csCfsaggUfaAfGfguguGfuCfcacugsusc	2293	đối nghĩa	23
UGUGACAGUGGACACACCUUA	1198	usgsugacAfgUfGfGfacacaccuuaL96	2294	có nghĩa	21
UAAGGUGUGUCCACUGUCACAAA	1199	usAfsaggUfgUfGfuccaCfuGfucacasasa	2295	đối nghĩa	23
UUGUGACAGUGGACACACCUU	1200	ususgugaCfaGfUfGfgacacaccuuL96	2296	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AAGGUGUGUCCACUGUCACAAAU	1201	asAfsgguGfuGfUfccacUfgUfcacaasasu	2297	đối nghĩa	23
GAAGACUGACAUCAUUGCCAA	1202	gsasagacUfgAfCfAfucauugccaaL96	2298	có nghĩa	21
UUGGCAAUGAUGUCAGUCUUCUC	1203	usUfsggcAfaUfGfauguCfaGfucuucsusc	2299	đối nghĩa	23
AAGACUGACAUCAUUGCCAAU	1204	asasgacuGfaCfAfUfcauugccaauL96	2300	có nghĩa	21
AUUGGCAAUGAUGUCAGUCUUCU	1205	asUfsuggCfaAfUfgaugUfcAfgucuuscsu	2301	đối nghĩa	23
CUGAGAAGACUGACAUCAUUG	1206	csusgagaAfgAfCfUfgacaucauugL96	2302	có nghĩa	21
CAAUGAUGUCAGUCUUCUCAGCC	1207	csAfsaugAfuGfUfcaguCfuUfcucagscsc	2303	đối nghĩa	23
GCUGAGAAGACUGACAUCAUU	1208	gscsugagAfaGfAfCfugacaucauuL96	2304	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AAUGAUGUCAGUCUUCUCAGCCA	1209	asAfsugaUfgUfCfagucUfuCfucagcscsa	2305	đối nghĩa	23
GCUCAGGUUCAAAGUGUUGGU	1210	gscsucagGfuUfCfAfaaguguugguL96	2306	có nghĩa	21
ACCAACACUUUGAACCUGAGCUU	1211	asCfscaaCfaCfUfuugaAfcCfugagcsusu	2307	đối nghĩa	23
CUCAGGUUCAAAGUGUUGGUA	1212	csuscaggUfuCfAfAfaguguugguaL96	2308	có nghĩa	21
UACCAACACUUUGAACCUGAGCU	1213	usAfsccaAfcAfCfuugAfaCfcugagscsu	2309	đối nghĩa	23
GUAAGCUCAGGUUCAAAGUGU	1214	gsusaagcUfcAfGfGfuucaaaguguL96	2310	có nghĩa	21
ACACUUUGAACCUGAGCUUACAA	1215	asCfsacuUfuGfAfaccuGfaGfcuuacsasa	2311	đối nghĩa	23
UGUAAGCUCAGGUUCAAAGUG	1216	usgsuaagCfuCfAfGfguucaaagugL96	2312	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CACUUUGAACCUGAGCUUACAAU	1217	csAfscuuUfgAfAfccugAfgCfuuacasasu	2313	đối nghĩa	23
AUGUAUUACUUGACAAAGAGA	1218	asusguauUfaCfUfUfUfgacaaagagaL96	2314	có nghĩa	21
UCUCUUUGUCAAGUAAUACAUGC	1219	usCfsucuUfuGfUfcaagUfaAfuacausgsc	2315	đối nghĩa	23
UGUAUUACUUGACAAAGAGAC	1220	usgsuauuAfcUfUfGfacaaagagacL96	2316	có nghĩa	21
GUCUCUUUGUCAAGUAAUACAUG	1221	gsUfscucUfuUfGfucaaGfuAfauacasusg	2317	đối nghĩa	23
CAGCAUGUAUUACUUGACAAA	1222	csasgcauGfuAfUfUfUfacuugacaaaL96	2318	có nghĩa	21
UUUGUCAAGUAAUACAUGCUGAA	1223	usUfsuguCfaAfGfuaauAfcAfugcugsasa	2319	đối nghĩa	23
UCAGCAUGUAUUACUUGACAA	1224	uscsagcaUfgUfAfUfUfuacuugacaaL96	2320	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UUGUCAAGUAAUACAUGCUGAAA	1225	usUfsgucAfaGfUfaauaCfaUfgcugasasa	2321	đối nghĩa	23
CUGCAACUGUAUAUCUACAAG	1226	csusgcaaCfuGfUfAfuaucuacaagL96	2322	có nghĩa	21
CUUGUAGAUAUACAGUUGCAGCC	1227	csUfsuguAfgAfUfauacAfgUfugcagscsc	2323	đối nghĩa	23
UGCAACUGUAUAUCUACAAGG	1228	usgscaacUfgUfAfUfaucuacaaggL96	2324	có nghĩa	21
CCUUGUAGAUAUACAGUUGCAGC	1229	csCfsuugUfaGfAfauauaCfaGfuugcasgsc	2325	đối nghĩa	23
UUGGCUGCAACUGUAUAUCUA	1230	ususggcuGfcAfAfCfuguauaucuaL96	2326	có nghĩa	21
UAGAUAUACAGUUGCAGCCAACG	1231	usAfsgauAfuAfCfaguuGfcAfgccaascsg	2327	đối nghĩa	23
GUUGGCUGCAACUGUAUAUCU	1232	gsusuggcUfgCfAfAfcuguauaucuL96	2328	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AGAUAUACAGUUGCAGCCAACGA	1233	asGfsauaUfaCfAfgugCfaGfccaacsgsa	2329	đối nghĩa	23
CAAAUGAUGAAGAAACUUUGG	1234	csasaaugAfuGfAfAfgaaacuuuggL96	2330	có nghĩa	21
CCAAAGUUUCUUCAUCAUUUGCC	1235	csCfsaaaGfuUfUfcuucAfuCfauuugscsc	2331	đối nghĩa	23
AAAUGAUGAAGAAACUUUGGC	1236	asasaugaUfgAfAfGfaaacuuuggcL96	2332	có nghĩa	21
GCCAAAGUUUCUUCAUCAUUUGC	1237	gsCfscaaAfgUfUfucuuCfaUfcauuusgsc	2333	đối nghĩa	23
GGGGCAAAUGAUGAAGAAACU	1238	gsgsggcaAfaUfGfAfugaagaaacuL96	2334	có nghĩa	21
AGUUUCUUCAUCAUUUGCCCCAG	1239	asGfsuuuCfuUfCfaucaUfuUfgccccsasg	2335	đối nghĩa	23
UGGGGCAAAUGAUGAAGAAAC	1240	usgsgggcAfaAfUfGfaugaagaaacL96	2336	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
GUUUCUUCAUCAUUUGCCCCAGA	1241	gsUfsuucUfuCfAfucauUfuGfccccasgsa	2337	đối nghĩa	23
CAAAGGGUGUCGUUCUUUUCC	1242	csasaaggGfuGfUfCfguucuuuuccL96	2338	có nghĩa	21
GGAAAAGAACGACACCCUUUGUA	1243	gsGfsaaaAfgAfAfcgacAfcCfcuuugsusa	2339	đối nghĩa	23
AAAGGGUGUCGUUCUUUUCCA	1244	asasagggUfgUfCfGfuucuuuuccaL96	2340	có nghĩa	21
UGGAAAAGAACGACACCCUUUGU	1245	usGfsgaaAfaGfAfacgaCfaCfccuuusgsu	2341	đối nghĩa	23
AAUACAAAGGGUGUCGUUCUU	1246	asasuacaAfaGfGfGfugucguucuuL96	2342	có nghĩa	21
AAGAACGACACCCUUUGUAUUGA	1247	asAfsgaaCfgAfCfaccUfuUfguauusgsa	2343	đối nghĩa	23
CAAUACAAAGGGUGUCGUUCU	1248	csasauacAfaAfGfGfgugucguucuL96	2344	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AGAACGACACCCUUUGUAUUGAA	1249	asGfsaacGfaCfAfcccuUfuGfuauugsasa	2345	đối nghĩa	23
AAAGGCACUGAUGUUCUGAAA	1250	asasaggcAfcUfGfAfuguucugaaaL96	2346	có nghĩa	21
UUUCAGAACAUCAGUGCCUUUCC	1251	usUfsucaGfaAfCfaucaGfuGfccuuuscsc	2347	đối nghĩa	23
AAGGCACUGAUGUUCUGAAAG	1252	asasggcaCfuGfAfUfguucugaaagL96	2348	có nghĩa	21
CUUUCAGAACAUCAGUGCCUUUC	1253	csUfsuucAfgAfAfcaucAfgUfgccuususc	2349	đối nghĩa	23
GCGGAAAGGCACUGAUGUUCU	1254	gscsggaaAfgGfCfAfcugauguucuL96	2350	có nghĩa	21
AGAACAUCAGUGCCUUUCCGCAC	1255	asGfsaacAfuCfAfgugcCfuUfuccgcsasc	2351	đối nghĩa	23
UGCGGAAAGGCACUGAUGUUC	1256	usgscggaAfaGfGfCfacugauguucL96	2352	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
GAACAUCAGUGCCUUUCCGCACA	1257	gsAfsacaUfcAfGfugccUfuUfccgcascsa	2353	đối nghĩa	23
AAGGAUGCUCCGGAAUGUUGC	1258	asasggauGfcUfCfCfggaauguugcL96	2354	có nghĩa	21
GCAACAUUCCGGAGCAUCCUUGG	1259	gsCfsaacAfuUfCfcggaGfcAfuccuusgsg	2355	đối nghĩa	23
AGGAUGCUCCGGAAUGUUGCU	1260	asgsgaugCfuCfCfGfgaauguugcuL96	2356	có nghĩa	21
AGCAACAUUCCGGAGCAUCCUUG	1261	asGfscaaCfaUfUfccggAfgCfauccususg	2357	đối nghĩa	23
AUCCAAGGAUGCUCCGGAAUG	1262	asusccaaGfgAfUfGfcuccggaaugL96	2358	có nghĩa	21
CAUUCCGGAGCAUCCUUGGAUAC	1263	csAfsuucCfgGfAfgcauCfcUfuggausasc	2359	đối nghĩa	23
UAUCCAAGGAUGCUCCGGAAU	1264	usasuccaAfgGfAfUfgcuccggaauL96	2360	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUUCCGGAGCAUCCUUGGAUACA	1265	asUfsuccGfgAfGfcaucCfuUfggauascsa	2361	đối nghĩa	23
AAUGGGUGGCGGUAAUUGGUG	1266	asasugggUfgGfCfGfguaauuggugL96	2362	có nghĩa	21
CACCAAUUACCGCCACCCAUUCC	1267	csAfsccaAfuUfAfccgcCfaCfccauuscsc	2363	đối nghĩa	23
AUGGGUGGCGGUAAUUGGUGA	1268	asusggguGfgCfGfGfuaauuggugaL96	2364	có nghĩa	21
UCACCAAUUACCGCCACCCAUUC	1269	usCfsaccAfaUfUfaccgCfcAfcccaususc	2365	đối nghĩa	23
UUGGAAUGGGUGGCGGUAAUU	1270	ususggaaUfgGfGfUfggcgguaauuL96	2366	có nghĩa	21
AAUUACCGCCACCCAUUCCAAUU	1271	asAfsuuaCfcGfCfcaccCfaUfuccaasusu	2367	đối nghĩa	23
AUUGGAAUGGGUGGCGGUAAU	1272	asususggaAfuGfGfGfuggcgguaauL96	2368	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUUACCGCCACCCAUUCCAAUUC	1273	asUfsuacCfgCfCfaccAfuUfccaaususc	2369	đối nghĩa	23
GGAAAGGCACUGAUGUUCUGA	1274	gsgsaaagGfcAfCfUfgauguucugaL96	2370	có nghĩa	21
UCAGAACAUCAGUGCCUUUCCGC	1275	usCfsagaAfcAfUfcaguGfcCfuuuccsgsc	2371	đối nghĩa	23
GAAAGGCACUGAUGUUCUGAA	1276	gsasaaggCfaCfUfGfauguucugaaL96	2372	có nghĩa	21
UUCAGAACAUCAGUGCCUUUCCG	1277	usUfscagAfaCfAfucagUfgCfcuuucscsg	2373	đối nghĩa	23
GUGCGGAAAGGCACUGAUGUU	1278	gsusgcggAfaAfGfGfcacugauguuL96	2374	có nghĩa	21
AACAUCAGUGCCUUUCCGCACAC	1279	asAfscauCfaGfUfgccuUfuCfcgcacsasc	2375	đối nghĩa	23
UGUGCGGAAAGGCACUGAUGU	1280	usgsugcgGfaAfAfGfgcacugauguL96	2376	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
ACAUCAGUGCCUUUCCGCACACC	1281	asCfsaucAfgUfGfccuuUfcCfgcacascsc	2377	đối nghĩa	23
AAUUGUAAGCUCAGGUUCAAA	1282	asasuuguAfaGfCfUfcagguucaaaL96	2378	có nghĩa	21
UUUGAACCUGAGCUUACAAUUUA	1283	usUfsugaAfcCfUfgagcUfuAfcaauususa	2379	đối nghĩa	23
AUUGUAAGCUCAGGUUCAAAG	1284	asusuguaAfgCfUfCfagguucaaagL96	2380	có nghĩa	21
CUUUGAACCUGAGCUUACAAUUU	1285	csUfsuugAfaCfCfugagCfuUfacaaususu	2381	đối nghĩa	23
CUUAAAUUGUAAGCUCAGGUU	1286	csusuaaaUfuGfUfAfagcucagguuL96	2382	có nghĩa	21
AACCUGAGCUUACAAUUUAAGAA	1287	asAfsccuGfaGfCfuuacAfaUfuuaagsasa	2383	đối nghĩa	23
UCUUAAAUUGUAAGCUCAGGU	1288	uscsuuaaAfuUfGfUfaagcucagguL96	2384	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
ACCUGAGCUUACAAUUUAAGAAC	1289	asCfscugAfgCfUfuacaAfuUfuaagasasc	2385	đối nghĩa	23
GCAAACACUAAGGUGAAAAGA	1290	gscsaaacAfcUfAfAfggugaaaagaL96	2386	có nghĩa	21
UCUUUUCACCUUAGUGUUUGCUA	1291	usCfsuuuUfcAfCfcuuaGfuGfuuugcsusa	2387	đối nghĩa	23
CAAACACUAAGGUGAAAAGAU	1292	csasaacaCfuAfAfGfgugaaaagauL96	2388	có nghĩa	21
AUCUUUUCACCUUAGUGUUUGCU	1293	asUfscuuUfuCfAfccuuAfgUfguuugscsu	2389	đối nghĩa	23
GGUAGCAAACACUAAGGUGAA	1294	gsgsuagcAfaAfCfAfcuaaggugaaL96	2390	có nghĩa	21
UUCACCUUAGUGUUUGCUACCUC	1295	usUfscacCfuUfAfguguUfuGfcuaccsusc	2391	đối nghĩa	23
AGGUAGCAAACACUAAGGUGA	1296	asgsguagCfaAfAfCfacuaaggugaL96	2392	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCACCUUAGUGUUUGCUACCUCC	1297	usCfsaccUfuAfGfuguuUfgCfuaccuscsc	2393	đối nghĩa	23
AGGUAGCAAACACUAAGGUGA	1298	asgsguagCfaAfAfCfacuaaggugaL96	2394	có nghĩa	21
UCACCUUAGUGUUUGCUACCUCC	1299	usCfsaccUfuAfGfuguuUfgCfuaccuscsc	2395	đối nghĩa	23
GGUAGCAAACACUAAGGUGAA	1300	gsgsuagcAfaAfCfAfcuaaggugaaL96	2396	có nghĩa	21
UUCACCUUAGUGUUUGCUACCUC	1301	usUfscacCfuUfAfguguUfuGfcuaccsusc	2397	đối nghĩa	23
UUGGAGGUAGCAAACACUAAG	1302	ususggagGfuAfGfCfaaacacuaagL96	2398	có nghĩa	21
CUUAGUGUUUGCUACCUCCAAUU	1303	csUfsuagUfgUfUfugcuAfcCfuccaasusu	2399	đối nghĩa	23
AUUGGAGGUAGCAAACACUAA	1304	asususggaGfgUfAfGfcaaacacuaaL96	2400	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UUAGUGUUUGCUACCUCCAAUUU	1305	usUfsaguGfuUfUfgcuaCfcUfccaaususu	2401	đối nghĩa	23
UAAAGUGCUGUAUCCUUUAGU	1306	usasaaguGfcUfGfUfauccuuuaguL96	2402	có nghĩa	21
ACUAAAGGAUACAGCACUUUAGC	1307	asCfsuaaAfgGfAfuacaGfcAfcuuuasgsc	2403	đối nghĩa	23
AAAGUGCUGUAUCCUUUAGUA	1308	asasagugCfuGfUfAfuccuuuaguaL96	2404	có nghĩa	21
UACUAAAGGAUACAGCACUUUAG	1309	usAfscuaAfaGfGfauacAfgCfacuuusasg	2405	đối nghĩa	23
AGGCUAAAGUGCUGUAUCCUU	1310	asgsgcuaAfaGfUfGfcuguauccuuL96	2406	có nghĩa	21
AAGGAUACAGCACUUUAGCCUGC	1311	asAfsggaUfaCfAfgcacUfuUfagccusgsc	2407	đối nghĩa	23
CAGGCUAAAGUGCUGUAUCCU	1312	csasggcuAfaAfGfUfgcuguauccuL96	2408	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AGGAUACAGCACUUUAGCCUGCC	1313	asGfsgauAfcAfGfcacuUfuAfgccugscsc	2409	đối nghĩa	23
AAGACAUUGGUGAGGAAAAAU	1314	asasgacaUfuGfGfUfgaggaaaaauL96	2410	có nghĩa	21
AUUUUUCCUCACCAAUGUCUUGU	1315	asUfsuuuUfcCfUfcaccAfaUfgucuusgsu	2411	đối nghĩa	23
AGACAUUGGUGAGGAAAAAUC	1316	asgsacauUfgGfUfGfaggaaaaaucL96	2412	có nghĩa	21
GAUUUUUCCUCACCAAUGUCUUG	1317	gsAfsuuuUfuCfCfucacCfaAfugucususg	2413	đối nghĩa	23
CGACAAGACAUUGGUGAGGAA	1318	csgsacaaGfaCfAfUfuggugaggaaL96	2414	có nghĩa	21
UUCCUCACCAAUGUCUUGUCGAU	1319	usUfsccuCfaCfCfaaugUfcUfugucgsasu	2415	đối nghĩa	23
UCGACAAGACAUUGGUGAGGA	1320	uscsgacaAfgAfCfAfuuggugaggaL96	2416	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCCUCACCAAUGUCUUGUCGAUG	1321	usCfscucAfcCfAfauguCfuUfgucgasusg	2417	đối nghĩa	23
AAGAUGUCCUCGAGAUACUAA	1322	asasgaugUfcCfUfCfgagauacuaaL96	2418	có nghĩa	21
UUAGUAUCUCGAGGACAUCUUGA	1323	usUfsaguAfuCfUfcgagGfaCfaucuusgsa	2419	đối nghĩa	23
AGAUGUCCUCGAGAUACUAAA	1324	asgsauguCfcUfCfGfagauacuaaaL96	2420	có nghĩa	21
UUUAGUAUCUCGAGGACAUCUUG	1325	usUfsuagUfaUfCfucgaGfgAfcaucususg	2421	đối nghĩa	23
GUUCAAGAUGUCCUCGAGAUA	1326	gsusucaaGfaUfGfUfccucgagauaL96	2422	có nghĩa	21
UAUCUCGAGGACAUCUUGAACAC	1327	usAfsucuCfgAfGfgacaUfcUfugaacsasc	2423	đối nghĩa	23
UGUUCAAGAUGUCCUCGAGAU	1328	usgsuucaAfgAfUfGfuccucgagauL96	2424	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUCUCGAGGACAUCUUGAACACC	1329	asUfscucGfaGfGfacauCfuUfgaacascsc	2425	đối nghĩa	23
GAGAAAGGUGUUCAAGAUGUC	1330	gsasgaaaGfgUfGfUfucaagaugucL96	2426	có nghĩa	21
GACAUCUUGAACACCUUUCUCCC	1331	gsAfscauCfuUfGfaacaCfcUfuucucscsc	2427	đối nghĩa	23
AGAAAGGUGUUCAAGAUGUCC	1332	asgsaaagGfuGfUfUfcaagauguccL96	2428	có nghĩa	21
GGACAUCUUGAACACCUUUCUCC	1333	gsGfsacaUfcUfUfgaacAfcCfuuucuscsc	2429	đối nghĩa	23
GGGGGAGAAAGGUGUUCAAGA	1334	gsgsgggaGfaAfAfGfguguucaagaL96	2430	có nghĩa	21
UCUUGAACACCUUUCUCCCCCUG	1335	usCfsuugAfaCfAfccuuUfcUfcccccsusg	2431	đối nghĩa	23
AGGGGGAGAAAGGUGUUCAAG	1336	asgsggggAfgAfAfAfgguguucaagL96	2432	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CUUGAACACCUUUCUCCCCCUGG	1337	csUfsugaAfcAfCfcuuuCfuCfccccusgsg	2433	đối nghĩa	23
GCUGGGAAGAUAUCAAAUGGC	1338	gscsugggAfaGfAfUfaucaaauggcL96	2434	có nghĩa	21
GCCAUUUGAUAUCUUCCCAGCUG	1339	gsCfscauUfuGfAfuaucUfuCfccagcsusg	2435	đối nghĩa	23
CUGGGAAGAUAUCAAAUGGCU	1340	csusgggaAfgAfUfAfucaaauggcuL96	2436	có nghĩa	21
AGCCAUUUGAUAUCUUCCCAGCU	1341	asGfsccaUfuUfGfauauCfuUfcccagscsu	2437	đối nghĩa	23
AUCAGCUGGGAAGAUAUCAAA	1342	asuscagcUfgGfGfAfagauaucaaaL96	2438	có nghĩa	21
UUUGAUAUCUUCCCAGCUGAUAG	1343	usUfsugaUfaUfCfuuccCfaGfcugausasg	2439	đối nghĩa	23
UAUCAGCUGGGAAGAUAUCAA	1344	usasucagCfuGfGfGfaagauaucaaL96	2440	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UUGAUAUCUUCCCAGCUGAUAGA	1345	usUfsgauAfuCfUfuccAfgCfugauasgsa	2441	đối nghĩa	23
UCUGUCGACUUCUGUUUUAGG	1346	uscsugucGfaCfUfUfcuguuuuaggL96	2442	có nghĩa	21
CCUAAAACAGAAGUCGACAGAUC	1347	csCfsuaaAfaCfAfgaagUfcGfacagasusc	2443	đối nghĩa	23
CUGUCGACUUCUGUUUUAGGA	1348	csusgucgAfcUfUfCfuguuuuaggaL96	2444	có nghĩa	21
UCCUAAAACAGAAGUCGACAGAU	1349	usCfscuaAfaAfCfagaaGfuCfgacagsasu	2445	đối nghĩa	23
CAGAUCUGUCGACUUCUGUUU	1350	csasgaucUfgUfCfGfacuucuguuuL96	2446	có nghĩa	21
AAACAGAAGUCGACAGAUCUGUU	1351	asAfsacaGfaAfGfucgaCfaGfaucugsusu	2447	đối nghĩa	23
ACAGAUCUGUCGACUUCUGUU	1352	ascsagauCfuGfUfCfgacuucuguuL96	2448	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AACAGAAGUCGACAGAUCUGUUU	1353	asAfscagAfaGfUfcgacAfgAfucugususu	2449	đối nghĩa	23
UACUUCUUUGAAUGUAGAUUU	1354	usascuucUfuUfGfAfauguagauuuL96	2450	có nghĩa	21
AAAUCUACAUUCAAAGAAGUAUC	1355	asAfsaucUfaCfAfuucaAfaGfaaguasusc	2451	đối nghĩa	23
ACUUCUUUGAAUGUAGAUUUC	1356	ascsuucuUfuGfAfAfuguagauuucL96	2452	có nghĩa	21
GAAAUCUACAUUCAAAGAAGUAU	1357	gsAfsaauCfuAfCfaucAfaAfgaagusasu	2453	đối nghĩa	23
GUGAUACUUCUUUGAAUGUAG	1358	gsusgauaCfuUfCfUfuugaauguagL96	2454	có nghĩa	21
CUACAUUCAAAGAAGUAUCACCA	1359	csUfsacaUfuCfAfaagaAfgUfaucacscsa	2455	đối nghĩa	23
GGUGAUACUUCUUUGAAUGUA	1360	gsgsugauAfcUfUfCfuuugaauguaL96	2456	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UACAUUCAAAGAAGUAUCACCAA	1361	usAfscauUfcAfAfagaaGfuAfucaccsasa	2457	đối nghĩa	23
UGGGAAGAUAUCAAAUGGCUG	1362	usgsggaaGfaUfAfUfcaaauggcugL96	2458	có nghĩa	21
CAGCCAUUUGAUAUCUUCCCAGC	1363	csAfsgccAfuUfUfgauaUfcUfucccasgsc	2459	đối nghĩa	23
GGGAAGAUAUCAAAUGGCUGA	1364	gsgsgaagAfuAfUfCfaaauggcugaL96	2460	có nghĩa	21
UCAGCCAUUUGAUAUCUUCCCAG	1365	usCfsagcCfaUfUfugauAfuCfuucccsasg	2461	đối nghĩa	23
CAGCUGGGAAGAUAUCAAAUG	1366	csasgcugGfgAfAfGfauaucaaaugL96	2462	có nghĩa	21
CAUUUGAUAUCUUCCCAGCUGAU	1367	csAfsuuuGfaUfAfucuuCfcCfagcugsasu	2463	đối nghĩa	23
UCAGCUGGGAAGAUAUCAAAU	1368	uscsagcuGfgGfAfAfgauaucaaauL96	2464	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUUUGAUAUCUUCCCAGCUGAUA	1369	asUfsuugAfuAfUfcuucCfcAfgcugasusa	2465	đối nghĩa	23
UCCAAAGUCUAUAUAUGACUA	1370	uscscaaaGfuCfUfAfuauaugacuaL96	2466	có nghĩa	21
UAGUCAUAUAUAGACUUUGGAAG	1371	usAfsgucAfuAfUfauagAfcUfuuggasasg	2467	đối nghĩa	23
CCAAAGUCUAUAUAUGACUAU	1372	cscsaaagUfcUfAfUfauaugacuauL96	2468	có nghĩa	21
AUAGUCAUAUAUAGACUUUGGAA	1373	asUfsaguCfaUfAfuauaGfaCfuuuggsasa	2469	đối nghĩa	23
UACUUCCAAAGUCUAUAUAUG	1374	usascuucCfaAfAfGfucuauauaugL96	2470	có nghĩa	21
CAUAUAUAGACUUUGGAAGUACU	1375	csAfsuauAfuAfGfacuuUfgGfaaguascsu	2471	đối nghĩa	23
GUACUUCCAAAGUCUAUAUAU	1376	gsusacuuCfcAfAfAfgucuauauauL96	2472	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUAUAUAGACUUUGGAAGUACUG	1377	asUfsauaUfaGfAfcuuuGfgAfaguacsusg	2473	đối nghĩa	23
UUAUGAACAACAUGCUAAAUC	1378	ususaugaAfcAfAfCfaugcuaaaucL96	2474	có nghĩa	21
GAUUUAGCAUGUUGUUCAUAAUC	1379	gsAfsuuuAfgCfAfuguuGfuUfcauaasusc	2475	đối nghĩa	23
UAUGAACAACAUGCUAAAUCA	1380	usasugaaCfaAfCfAfugcuaaaucaL96	2476	có nghĩa	21
UGAUUUAGCAUGUUGUUCAUAAU	1381	usGfsauuUfaGfCfauguUfgUfucauasasu	2477	đối nghĩa	23
AUGAUUAUGAACAACAUGCUA	1382	asusgauuAfuGfAfAfcaacaugcuaL96	2478	có nghĩa	21
UAGCAUGUUGUUCAUAAUCAUUG	1383	usAfsgcaUfgUfUfgucAfuAfaucaususg	2479	đối nghĩa	23
AAUGAUUAUGAACAACAUGCU	1384	asasugauUfaUfGfAfacaacaugcuL96	2480	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AGCAUGUUGUUCAUAAUCAUUGA	1385	asGfscauGfuUfGfuucaUfaAfucauusgsa	2481	đối nghĩa	23
AAUUCCCCACUUCAAUACAAA	1386	asasuuccCfcAfCfUfucaauacaaaL96	2482	có nghĩa	21
UUUGUAUUGAAGUGGGGAAUUAC	1387	usUfsuguAfuUfGfaaguGfgGfgaauusasc	2483	đối nghĩa	23
AUUCCCCACUUCAAUACAAAG	1388	asususcccCfaCfUfUfcaauacaaagL96	2484	có nghĩa	21
CUUUGUAUUGAAGUGGGGAAUUA	1389	csUfsuugUfaUfUfgaagUfgGfggaaususa	2485	đối nghĩa	23
CUGUAAUUCCCCACUUCAAUA	1390	csusguaaUfuCfCfCfcacuucaauaL96	2486	có nghĩa	21
UAUUGAAGUGGGGAAUUACAGAC	1391	usAfsuugAfaGfUfgggggAfaUfuacagsasc	2487	đối nghĩa	23
UCUGUAAUUCCCCACUUCAAU	1392	uscsuguaAfuUfCfCfccacuucaauL96	2488	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUUGAAGUGGGGAAUUACAGACU	1393	asUfsugaAfgUfGfgggaAfuUfacagascsu	2489	đối nghĩa	23
UGAUGUGCGUAACAGAUUCAA	1394	usgsauguGfcGfUfAfacagauucaaL96	2490	có nghĩa	21
UUGAAUCUGUUACGCACAUCAUC	1395	usUfsgaaUfcUfGfuuacGfcAfcaucasusc	2491	đối nghĩa	23
GAUGUGCGUAACAGAUUCAAA	1396	gsasugugCfgUfAfAfcagauucaaaL96	2492	có nghĩa	21
UUUGAAUCUGUUACGCACAUCAU	1397	usUfsugaAfuCfUfguuaCfgCfacaucsasu	2493	đối nghĩa	23
UGGAUGAUGUGCGUAACAGAU	1398	usgsgaugAfuGfUfGfcguaacagauL96	2494	có nghĩa	21
AUCUGUUACGCACAUCAUCCAGA	1399	asUfscugUfuAfCfgcacAfuCfauccasgsa	2495	đối nghĩa	23
CUGGAUGAUGUGCGUAACAGA	1400	csusggauGfaUfGfUfgcguaacagaL96	2496	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCUGUUACGCACAUCAUCCAGAC	1401	usCfsuguUfaCfGfcacaUfcAfuccagsasc	2497	đối nghĩa	23
GAAUGGGUGGCGGUAAUUGGU	1402	gsasauggGfuGfGfCfgguaauugguL96	2498	có nghĩa	21
ACCAAUUACCGCCACCCAUUCCA	1403	asCfscaaUfuAfCfcgccAfcCfcauucscsa	2499	đối nghĩa	23
AAUGGGUGGCGGUAAUUGGUG	1404	asasugggUfgGfCfGfguaauuggugL96	2500	có nghĩa	21
CACCAAUUACCGCCACCCAUUCC	1405	csAfsccaAfuUfAfccgcCfaCfccauuscsc	2501	đối nghĩa	23
AUUGGAAUGGGUGGCGGUAAU	1406	asususggaAfuGfGfGfuggcgguaauL96	2502	có nghĩa	21
AUUACCGCCACCCAUUCCAAUUC	1407	asUfsuacCfgCfCfaccAfuUfccaaususc	2503	đối nghĩa	23
AAUUGGAAUGGGUGGCGGUAA	1408	asasuuggAfaUfGfGfguggcgguaaL96	2504	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UUACCGCCACCCAUUCCAAUUCU	1409	usUfsaccGfcCfAfcccaUfuCfcaauuscsu	2505	đối nghĩa	23
UCCGGAAUGUUGCUGAAACAG	1410	uscscggaAfuGfUfUfUfgcugaaacagL96	2506	có nghĩa	21
CUGUUUCAGCAACAUUCCGGAGC	1411	csUfsguuUfcAfGfcaacAfuUfccggasgsc	2507	đối nghĩa	23
CCGGAAUGUUGCUGAAACAGA	1412	cscsggaaUfgUfUfGfcugaaacagaL96	2508	có nghĩa	21
UCUGUUUCAGCAACAUUCCGGAG	1413	usCfsuguUfuCfAfgcaaCfaUfuccggsasg	2509	đối nghĩa	23
AUGCUCCGGAAUGUUGCUGAA	1414	asusgcucCfgGfAfAfuguugcugaaL96	2510	có nghĩa	21
UUCAGCAACAUUCCGGAGCAUCC	1415	usUfscagCfaAfCfaauucCfgGfagcauscsc	2511	đối nghĩa	23
GAUGCUCCGGAAUGUUGCUGA	1416	gsasugcuCfcGfGfAfauguugcugaL96	2512	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCAGCAACAUUCCGGAGCAUCCU	1417	usCfsagcAfaCfAfuuccGfgAfgcaucscsu	2513	đối nghĩa	23
UGUCCUCGAGAUACUAAAGGA	1418	usgsuccuCfgAfGfAfuacuaaaggaL96	2514	có nghĩa	21
UCCUUUAGUAUCUCGAGGACAUC	1419	usCfscuuUfaGfUfaucuCfgAfggacasusc	2515	đối nghĩa	23
GUCCUCGAGAUACUAAAGGAA	1420	gsusccucGfaGfAfUfacuaaaggaaL96	2516	có nghĩa	21
UUCCUUUAGUAUCUCGAGGACAU	1421	usUfsccuUfuAfGfuaucUfcGfaggacsasu	2517	đối nghĩa	23
AAGAUGUCCUCGAGAUACUAA	1422	asasgaugUfcCfUfCfgagauacuaaL96	2518	có nghĩa	21
UUAGUAUCUCGAGGACAUCUUGA	1423	usUfsaguAfuCfUfcgagGfaCfaucuusgsa	2519	đối nghĩa	23
CAAGAUGUCCUCGAGAUACUA	1424	csasagauGfuCfCfUfcgagauacuaL96	2520	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UAGUAUCUCGAGGACAUCUUGAA	1425	usAfsguaUfcUfCfgaggAfcAfucuugsasa	2521	đối nghĩa	23
ACAACAUGCUAAAUCAGUACU	1426	ascsaacaUfgCfUfAfaaucaguacuL96	2522	có nghĩa	21
AGUACUGAUUUAGCAUGUUGUUC	1427	asGfsuacUfgAfUfuuagCfaUfguugususc	2523	đối nghĩa	23
CAACAUGCUAAAUCAGUACUU	1428	csasacauGfcUfAfAfaucaguacuuL96	2524	có nghĩa	21
AAGUACUGAUUUAGCAUGUUGUU	1429	asAfsguaCfuGfAfuuuaGfcAfuguugsusu	2525	đối nghĩa	23
AUGAACAACAUGCUAAAUCAG	1430	asusgaacAfaCfAfUfgcuaaaucagL96	2526	có nghĩa	21
CUGAUUUAGCAUGUUGUUCAUAA	1431	csUfsgauUfuAfGfcaugUfuGfuucausasa	2527	đối nghĩa	23
UAUGAACAACAUGCUAAAUCA	1432	usasugaaCfaAfCfAfugcuaaaucaL96	2528	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UGAUUUAGCAUGUUGUUCAUAAU	1433	usGfsauuUfaGfCfauguUfgUfucauasasu	2529	đối nghĩa	23
GCCAAGGCUGUGUUUGUGGGG	1434	gscscaagGfcUfGfUfguuugugggL96	2530	có nghĩa	21
CCCCACAAACACAGCCUUGGCGC	1435	csCfsccaCfaAfAfcacaGfcCfuuggcsgsc	2531	đối nghĩa	23
CCAAGGCUGUGUUUGUGGGGA	1436	cscsaaggCfuGfUfGfuuugugggaL96	2532	có nghĩa	21
UCCCCACAAACACAGCCUUGGCG	1437	usCfscccAfcAfAfacacAfgCfcuuggscsg	2533	đối nghĩa	23
UGGCGCCAAGGCUGUGUUUGU	1438	usgsgcgcCfaAfGfGfcuguguuuguL96	2534	có nghĩa	21
ACAAACACAGCCUUGGCGCCAAG	1439	asCfsaaaCfaCfAfgccuUfgGfcgccasasg	2535	đối nghĩa	23
UUGGCGCCAAGGCUGUGUUUG	1440	ususggcgCfcAfAfGfgcuguguuugL96	2536	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CAAACACAGCCUUGGCGCCAAGA	1441	csAfsaacAfcAfGfccuuGfgCfgccaasgsa	2537	đối nghĩa	23
UGAAAGCUCUGGCUCUUGGCG	1442	usgsaaagCfuCfUfGfgcucuuggcgL96	2538	có nghĩa	21
CGCCAAGAGCCAGAGCUUUCAGA	1443	csGfsccaAfgAfGfccagAfgCfuuucasgsa	2539	đối nghĩa	23
GAAAGCUCUGGCUCUUGGCGC	1444	gsasaagcUfcUfGfGfcucuuggcgcL96	2540	có nghĩa	21
GCGCCAAGAGCCAGAGCUUUCAG	1445	gsCfsgccAfaGfAfgccaGfaGfcuuucsasg	2541	đối nghĩa	23
GUUCUGAAAGCUCUGGCUCUU	1446	gsusucugAfaAfGfCfucuggcucuuL96	2542	có nghĩa	21
AAGAGCCAGAGCUUUCAGAACAU	1447	asAfsgagCfcAfGfagcuUfuCfagaacsasu	2543	đối nghĩa	23
UGUUCUGAAAGCUCUGGCUCU	1448	usgsuucuGfaAfAfGfcucuggcucuL96	2544	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AGAGCCAGAGCUUUCAGAACAUC	1449	asGfsagcCfaGfAfgcuuUfcAfgaacasusc	2545	đối nghĩa	23
CAGCCACUAUUGAUGUUCUGC	1450	csasgccaCfuAfUfUfGfgauguucugcL96	2546	có nghĩa	21
GCAGAACAUCAAUAGUGGCUGGC	1451	gsCfsagaAfcAfUfcaauAfgUfggcugsgsc	2547	đối nghĩa	23
AGCCACUAUUGAUGUUCUGCC	1452	asgsccacUfaUfUfGfauguucugccL96	2548	có nghĩa	21
GGCAGAACAUCAAUAGUGGCUGG	1453	gsGfscagAfaCfAfucaaUfaGfuggcusgsg	2549	đối nghĩa	23
GUGCCAGCCACUAUUGAUGUU	1454	gsusgccaGfcCfAfCfuauugauguuL96	2550	có nghĩa	21
AACAUCAAUAGUGGCUGGCACCC	1455	asAfscauCfaAfUfagugGfcUfggcacscsc	2551	đối nghĩa	23
GGUGCCAGCCACUAUUGAUGU	1456	gsgsugccAfgCfCfAfcuauugauguL96	2552	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
ACAUCAAUAGUGGCUGGCACCCC	1457	asCfsaucAfaUfAfguggCfuGfgcaccscsc	2553	đối nghĩa	23
ACAAGGACCGAGAAGUCACCA	1458	ascsaaggAfcCfGfAfgaagucaccaL96	2554	có nghĩa	21
UGGUGACUUCUCGGUCCUUGUAG	1459	usGfsgugAfcUfUfcucgGfuCfcuugusasg	2555	đối nghĩa	23
CAAGGACCGAGAAGUCACCAA	1460	csasaggaCfcGfAfGfaagucaccaaL96	2556	có nghĩa	21
UUGGUGACUUCUCGGUCCUUGUA	1461	usUfsgguGfaCfUfucucGfgUfccuugsusa	2557	đối nghĩa	23
AUCUACAAGGACCGAGAAGUC	1462	asuscuacAfaGfGfAfccgagaagucL96	2558	có nghĩa	21
GACUUCUCGGUCCUUGUAGAUAU	1463	gsAfscuuCfuCfGfguccUfuGfuagausasu	2559	đối nghĩa	23
UAUCUACAAGGACCGAGAAGU	1464	usasucuaCfaAfGfGfaccgagaaguL96	2560	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
ACUUCUCGGUCCUUGUAGAUAUA	1465	asCfsuucUfcGfGfuccuUfgUfagauasusa	2561	đối nghĩa	23
CAGAAUGUGAAAGUCAUCGAC	1466	csasgaauGfuGfAfAfagucaucgacL96	2562	có nghĩa	21
GUCGAUGACUUUCACAUUCUGGC	1467	gsUfscgaUfgAfCfuuucAfcAfuucugsgsc	2563	đối nghĩa	23
AGAAUGUGAAAGUCAUCGACA	1468	asgsaaugUfgAfAfAfgucaucgacaL96	2564	có nghĩa	21
UGUCGAUGACUUUCACAUUCUGG	1469	usGfsucgAfuGfAfcuuuCfaCfauucusgsg	2565	đối nghĩa	23
GUGCCAGAAUGUGAAAGUCAU	1470	gsusgccaGfaAfUfGfugaaagucauL96	2566	có nghĩa	21
AUGACUUUCACAUUCUGGCACCC	1471	asUfsgacUfuUfCfacauUfcUfggcacscsc	2567	đối nghĩa	23
GGUGCCAGAAUGUGAAAGUCA	1472	gsgsugccAfgAfAfUfugaaagucaL96	2568	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UGACUUUCACAUUCUGGCACCCA	1473	usGfsacuUfuCfAfcauuCfuGfgcaccscsa	2569	đối nghĩa	23
AGAUGUCCUCGAGAUACUAAA	1474	asgsauguCfcUfCfGfagauacuaaaL96	2570	có nghĩa	21
UUUAGUAUCUCGAGGACAUCUUG	1475	usUfsuagUfaUfCfucgaGfgAfcaucususg	2571	đối nghĩa	23
GAUGUCCUCGAGAUACUAAAG	1476	gsasugucCfuCfGfAfgauacuaaagL96	2572	có nghĩa	21
CUUUAGUAUCUCGAGGACAUCUU	1477	csUfsuuaGfuAfUfcucgAfgGfacaucsusu	2573	đối nghĩa	23
UUCAAGAUGUCCUCGAGAUAC	1478	ususcaagAfuGfUfCfcucgagauacL96	2574	có nghĩa	21
GUAUCUCGAGGACAUCUUGAACA	1479	gsUfsaucUfcGfAfggacAfuCfuugaascsa	2575	đối nghĩa	23
GUUCAAGAUGUCCUCGAGAUA	1480	gsusucaaGfaUfGfUfccucgagauaL96	2576	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UAUCUCGAGGACAUCUUGAACAC	1481	usAfsucuCfgAfGfgacaUfcUfugaacsasc	2577	đối nghĩa	23
GUGGACUUGCUGCAUAUGUGG	1482	gsusggacUfuGfCfUfgcauauguggL96	2578	có nghĩa	21
CCACAUAUGCAGCAAGUCCACUG	1483	csCfsacaUfaUfGfcagcAfaGfuccacsusg	2579	đối nghĩa	23
UGGACUUGCUGCAUAUGUGGC	1484	usgsgacuUfgCfUfGfcauauguggcL96	2580	có nghĩa	21
GCCACAUAUGCAGCAAGUCCACU	1485	gsCfscacAfuAfUfgcagCfaAfguccascsu	2581	đối nghĩa	23
GACAGUGGACUUGCUGCAUAU	1486	gsascaguGfgAfCfUfugcugcauauL96	2582	có nghĩa	21
AUAUGCAGCAAGUCCACUGUCGU	1487	asUfsaugCfaGfCfaaguCfcAfcugucsgsu	2583	đối nghĩa	23
CGACAGUGGACUUGCUGCAUA	1488	csgsacagUfgGfAfCfuugcugcauaL96	2584	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UAUGCAGCAAGUCCACUGUCGUC	1489	usAfsugcAfgCfAfagucCfaCfugucgsusc	2585	đối nghĩa	23
AACCAGUACUUUAUCAUUUUC	1490	asasccagUfaCfUfUfuaucauuuucL96	2586	có nghĩa	21
GAAAAUGAUAAAGUACUGGUUUC	1491	gsAfsaaaUfgAfUfaaagUfaCfugguususc	2587	đối nghĩa	23
ACCAGUACUUUAUCAUUUUCU	1492	ascscaguAfcUfUfUfaucauuuucuL96	2588	có nghĩa	21
AGAAAAUGAUAAAGUACUGGUUU	1493	asGfsaaaAfuGfAfuaaaGfuAfcuggususu	2589	đối nghĩa	23
UUGAAACCAGUACUUUAUCAU	1494	ususgaaaCfcAfGfUfacuuuaucauL96	2590	có nghĩa	21
AUGAUAAAGUACUGGUUUCAAAA	1495	asUfsgauAfaAfGfuacuGfgUfuucaasasa	2591	đối nghĩa	23
UUUGAAACCAGUACUUUAUCA	1496	ususugaaAfcCfAfGfuacuuuaucaL96	2592	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UGAUAAAGUACUGGUUUCAAAAU	1497	usGfsauaAfaGfUfacugGfuUfucaaasasu	2593	đối nghĩa	23
CGAGAAGUCACCAAGAAGCUA	1498	csgsagaaGfuCfAfCfcaagaagcuaL96	2594	có nghĩa	21
UAGCUUCUUGGUGACUUCUCGGU	1499	usAfsgcuUfcUfUfggugAfcUfucucgsgsu	2595	đối nghĩa	23
GAGAAGUCACCAAGAAGCUAG	1500	gsasgaagUfcAfCfCfaagaagcuagL96	2596	có nghĩa	21
CUAGCUUCUUGGUGACUUCUCGG	1501	csUfsagcUfuCfUfugguGfaCfuucucsgsg	2597	đối nghĩa	23
GGACCGAGAAGUCACCAAGAA	1502	gsgsaccgAfgAfAfGfucaccaagaaL96	2598	có nghĩa	21
UUCUUGGUGACUUCUCGGUCCUU	1503	usUfscuuGfgUfGfacuuCfuCfgguccsusu	2599	đối nghĩa	23
AGGACCGAGAAGUCACCAAGA	1504	asgsgaccGfaGfAfAfgucaccaagaL96	2600	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCUUGGUGACUUCUCGGUCCUUG	1505	usCfsuugGfuGfAfcuucUfcGfguccususg	2601	đối nghĩa	23
UCAAAGUGUUGGUAAUGCCUG	1506	uscsaaagUfgUfUfGfguaaugccugL96	2602	có nghĩa	21
CAGGCAUUACCAACACUUUGAAC	1507	csAfsggcAfuUfAfccaaCfaCfuuugasasc	2603	đối nghĩa	23
CAAAGUGUUGGUAAUGCCUGA	1508	csasaaguGfuUfGfGfuaaugccugaL96	2604	có nghĩa	21
UCAGGCAUUACCAACACUUUGAA	1509	usCfsaggCfaUfUfaccaAfcAfcuuugsasa	2605	đối nghĩa	23
AGGUUCAAAGUGUUGGUAAUG	1510	asgsguucAfaAfGfUfguugguaaugL96	2606	có nghĩa	21
CAUUACCAACACUUUGAACCUGA	1511	csAfsuuaCfcAfAfcacuUfuGfaaccusgsa	2607	đối nghĩa	23
CAGGUUCAAAGUGUUGGUAAU	1512	csasgguuCfaAfAfGfuguugguaauL96	2608	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUUACCAACACUUUGAACCUGAG	1513	asUfsuacCfaAfCfacuuUfgAfaccugsasg	2609	đối nghĩa	23
UAUUACUUGACAAAGAGACAC	1514	usasuuacUfuGfAfCfaaagagacacL96	2610	có nghĩa	21
GUGUCUCUUUGUCAAGUAAUACA	1515	gsUfsgucUfcUfUfugucAfaGfuaauascsa	2611	đối nghĩa	23
AUUACUUGACAAAGAGACACU	1516	asusuacuUfgAfCfAfaagagacacuL96	2612	có nghĩa	21
AGUGUCUCUUUGUCAAGUAAUAC	1517	asGfsuguCfuCfUfuuguCfaAfguaausasc	2613	đối nghĩa	23
CAUGUAUUACUUGACAAAGAG	1518	csasuguaUfuAfCfUfugacaaagagL96	2614	có nghĩa	21
CUCUUUGUCAAGUAAUACAUGCU	1519	csUfscuuUfgUfCfaaguAfaUfacaugscsu	2615	đối nghĩa	23
GCAUGUAUUACUUGACAAAGA	1520	gscsauguAfuUfAfCfuugacaaagaL96	2616	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCUUUGUCAAGUAAUACAUGCUG	1521	usCfsuuuGfuCfAfaguaAfuAfcaugcsusg	2617	đối nghĩa	23
AAAGUCAUCGACAAGACAUUG	1522	asasagucAfuCfGfAfcaagacauugL96	2618	có nghĩa	21
CAAUGUCUUGUCGAUGACUUUCA	1523	csAfsaugUfcUfUfgucgAfuGfacuuuscsa	2619	đối nghĩa	23
AAGUCAUCGACAAGACAUUGG	1524	asasgucaUfcGfAfCfaagacauuggL96	2620	có nghĩa	21
CCAAUGUCUUGUCGAUGACUUUC	1525	csCfsaauGfuCfUfugucGfaUfgacuususc	2621	đối nghĩa	23
UGUGAAAGUCAUCGACAAGAC	1526	usgsugaaAfgUfCfAfucgacaagacL96	2622	có nghĩa	21
GUCUUGUCGAUGACUUUCACAUU	1527	gsUfscuuGfuCfGfaugaCfuUfucacasusu	2623	đối nghĩa	23
AUGUGAAAGUCAUCGACAAGA	1528	asusgugaAfaGfUfCfaucgacaagaL96	2624	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCUUGUCGAUGACUUUCACAUUC	1529	usCfsuugUfcGfAfugacUfuUfcacaususc	2625	đối nghĩa	23
AUAUGUGGCUAAAGCAAUAGA	1530	asusauguGfgCfUfAfaagcaauagaL96	2626	có nghĩa	21
UCUAUUGCUUUAGCCACAUAUGC	1531	usCfsuauUfgCfUfuuagCfcAfcauausgsc	2627	đối nghĩa	23
UAUGUGGCUAAAGCAAUAGAC	1532	usasugugGfcUfAfAfagcaauagacL96	2628	có nghĩa	21
GUCUAUUGCUUUAGCCACAUAUG	1533	gsUfscuaUfuGfCfuuuaGfcCfacauasusg	2629	đối nghĩa	23
CUGCAUAUGUGGCUAAAGCAA	1534	csusgcauAfuGfUfGfgcuaaagcaaL96	2630	có nghĩa	21
UUGCUUUAGCCACAUAUGCAGCA	1535	usUfsgcuUfuAfGfccacAfuAfugcagscsa	2631	đối nghĩa	23
GCUGCAUAUGUGGCUAAAGCA	1536	gscsugcaUfaUfGfUfggcuaaagcaL96	2632	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UGCUUUAGCCACAUAUGCAGCAA	1537	usGfscuuUfaGfCfcacaUfaUfgcagcsasa	2633	đối nghĩa	23
AGACGACAGUGGACUUGCUGC	1538	asgsacgaCfaGfUfGfgacuugcugcL96	2634	có nghĩa	21
GCAGCAAGUCCACUGUCGUCUCC	1539	gsCfsagcAfaGfUfccacUfgUfcgucuscsc	2635	đối nghĩa	23
GACGACAGUGGACUUGCUGCA	1540	gsascgacAfgUfGfGfacuugcugcaL96	2636	có nghĩa	21
UGCAGCAAGUCCACUGUCGUCUC	1541	usGfscagCfaAfGfuccaCfuGfucgucsusc	2637	đối nghĩa	23
UUGGAGACGACAGUGGACUUG	1542	ususggagAfcGfAfCfaguggacuugL96	2638	có nghĩa	21
CAAGUCCACUGUCGUCUCCAAAA	1543	csAfsaguCfcAfCfugucGfuCfuccaasasa	2639	đối nghĩa	23
UUUGGAGACGACAGUGGACUU	1544	ususuggaGfaCfGfAfcaguggacuuL96	2640	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AAGUCCACUGUCGUCUCCAAAAU	1545	asAfsgucCfaCfUfgucgUfcUfccaaasasu	2641	đối nghĩa	23
GGCCACCUCCUCAAUUGAAGA	1546	gsgsccacCfuCfCfUfcaauugaagaL96	2642	có nghĩa	21
UCUUCAAUUGAGGAGGUGGCCCA	1547	usCfsuucAfaUfUfgaggAfgGfuggccscsa	2643	đối nghĩa	23
GCCACCUCCUCAAUUGAAGAA	1548	gscscaccUfcCfUfCfaauugaagaaL96	2644	có nghĩa	21
UUCUUCAAUUGAGGAGGUGGCCC	1549	usUfscuuCfaAfUfugagGfaGfguggcscsc	2645	đối nghĩa	23
CCUGGGCCACCUCCUCAAUUG	1550	cscsugggCfcAfCfCfuccucaauugL96	2646	có nghĩa	21
CAAUUGAGGAGGUGGCCCAGGAA	1551	csAfsauuGfaGfGfagguGfgCfccaggsasa	2647	đối nghĩa	23
UCCUGGGCCACCUCCUCAAUU	1552	uscscuggGfcCfAfCfcuccucaauuL96	2648	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AAUUGAGGAGGUGGCCCAGGAAC	1553	asAfsuugAfgGfAfggugGfcCfcaggasasc	2649	đối nghĩa	23
UGUAUGUUACUUCUUAGAGAG	1554	usgsuaugUfuAfCfUfucuuagagágL96	2650	có nghĩa	21
CUCUCUAAGAAGUAACAUACAUC	1555	csUfscucUfaAfGfaaguAfaCfauacasusc	2651	đối nghĩa	23
GUAUGUUACUUCUUAGAGAGA	1556	gsusauguUfaCfUfUfUfcuuagagagaL96	2652	có nghĩa	21
UCUCUCUAAGAAGUAACAUACAU	1557	usCfsucuCfuAfAfgaagUfaAfcauacsasu	2653	đối nghĩa	23
AGGAUGUAUGUUACUUCUUAG	1558	asgsgaugUfaUfGfUfuacuucuuagL96	2654	có nghĩa	21
CUAAGAAGUAACAUACAUCCUAA	1559	csUfsaagAfaGfUfaacaUfaCfauccusasa	2655	đối nghĩa	23
UAGGAUGUAUGUUACUUCUUA	1560	usasggauGfuAfUfGfuuacuucuuaL96	2656	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UAAGAAGUAACAUACAUCCUAAA	1561	usAfsagaAfgUfAfacauAfcAfuccuasasa	2657	đối nghĩa	23
AAAUGUUUUAGGAUGUAUGUU	1562	asasauguUfuUfAfGfgauguauguuL96	2658	có nghĩa	21
AACAUACAUCCUAAAACAUUUGG	1563	asAfscauAfcAfUfccuaAfaAfcauuusgsg	2659	đối nghĩa	23
AAUGUUUUAGGAUGUAUGUUA	1564	asasuguuUfuAfGfGfauguauguuaL96	2660	có nghĩa	21
UAACAUACAUCCUAAAACAUUUG	1565	usAfsacaUfaCfAfuccuAfaAfacauususg	2661	đối nghĩa	23
AUCCAAAUGUUUUAGGAUGUA	1566	asusccaaAfuGfUfUfuuaggauguaL96	2662	có nghĩa	21
UACAUCCUAAAACAUUUGGAUAU	1567	usAfscauCfcUfAfaaacAfuUfuggausasu	2663	đối nghĩa	23
UAUCCAAAUGUUUUAGGAUGU	1568	usasuccaAfaUfGfUfuuuaggauguL96	2664	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
ACAUCCUAAAACAUUUGGAUAUA	1569	asCfsaucCfuAfAfaacaUfuUfggauasusa	2665	đối nghĩa	23
AUGGGUGGCGGUAAUUGGUGA	1570	asusggguGfgCfGfGfuaauuggugaL96	2666	có nghĩa	21
UCACCAAUUACCGCCACCCAUUC	1571	usCfsaccAfaUfUfaccgCfcAfcccaususc	2667	đối nghĩa	23
UGGGUGGCGGUAAUUGGUGAU	1572	usgsggugGfcGfGfUfaauuggugauL96	2668	có nghĩa	21
AUCACCAAUUACCGCCACCCAUU	1573	asUfscacCfaAfUfuaccGfcCfacccasusu	2669	đối nghĩa	23
UGGAAUGGGUGGCGGUAAUUG	1574	usgsgaauGfgGfUfGfgcgguaauugL96	2670	có nghĩa	21
CAAUUACCGCCACCCAUUCCAAU	1575	csAfsauuAfcCfGfccacCfcAfuuccasasu	2671	đối nghĩa	23
UUGGAAUGGGUGGCGGUAAUU	1576	ususggaaUfgGfGfUfggcgguaauuL96	2672	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AAUUACCGCCACCCAUUCCAAUU	1577	asAfsuuaCfcGfCfcaccCfaUfuccaasusu	2673	đối nghĩa	23
UUCAAAGUGUUGGUAAUGCCU	1578	ususcaaaGfuGfUfUfgguaaugccuL96	2674	có nghĩa	21
AGGCAUUACCAACACUUUGAACC	1579	asGfsgcaUfuAfCfcaacAfcUfuugaascsc	2675	đối nghĩa	23
UCAAAGUGUUGGUAAUGCCUG	1580	uscsaaagUfgUfUfGfguaaugccugL96	2676	có nghĩa	21
CAGGCAUUACCAACACUUUGAAC	1581	csAfsggcAfuUfAfccaaCfaCfuuugasasc	2677	đối nghĩa	23
CAGGUUCAAAGUGUUGGUAAU	1582	csasgguuCfaAfAfGfuguugguaauL96	2678	có nghĩa	21
AUUACCAACACUUUGAACCUGAG	1583	asUfsuacCfaAfCfacuuUfgAfaccugsasg	2679	đối nghĩa	23
UCAGGUUCAAAGUGUUGGUAA	1584	uscsagguUfcAfAfAfguguugguaaL96	2680	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UUACCAACACUUUGAACCUGAGC	1585	usUfsaccAfaCfAfcuuuGfaAfccugasgsc	2681	đối nghĩa	23
CCACCUCCUCAAUUGAAGAAG	1586	cscsaccuCfcUfCfAfauugaagaagL96	2682	có nghĩa	21
CUUCUUCAAUUGAGGAGGUGGCC	1587	csUfsucuUfcAfAfuugaGfgAfgguggscsc	2683	đối nghĩa	23
CACCUCCUCAAUUGAAGAAGU	1588	csasccucCfuCfAfAfuugaagaaguL96	2684	có nghĩa	21
ACUUCUUCAAUUGAGGAGGUGGC	1589	asCfsuucUfuCfAfaugAfgGfaggugsgsc	2685	đối nghĩa	23
UGGGCCACCUCCUCAAUUGAA	1590	usgsggccAfcCfUfCfcucaauugaaL96	2686	có nghĩa	21
UUCAAUUGAGGAGGUGGCCCAGG	1591	usUfscaaUfuGfAfggagGfuGfgcccasgsg	2687	đối nghĩa	23
CUGGGCCACCUCCUCAAUUGA	1592	csusgggcCfaCfCfUfccucaauugaL96	2688	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCAAUUGAGGAGGUGGCCCAGGA	1593	usCfsaauUfgAfGfgaggUfgGfcccagsgsa	2689	đối nghĩa	23
GAGUGGGUGCCAGAAUGUGAA	1594	gsasguggGfuGfCfCfagaaugugaaL96	2690	có nghĩa	21
UUCACAUUCUGGCACCCACUCAG	1595	usUfscacAfuUfCfuggcAfcCfcacucsasg	2691	đối nghĩa	23
AGUGGGUGCCAGAAUGUGAAA	1596	asgsugggUfgCfCfAfgaaugugaaaL96	2692	có nghĩa	21
UUUCACAUUCUGGCACCCACUCA	1597	usUfsucaCfaUfUfcuggCfaCfccacuscsa	2693	đối nghĩa	23
CUCUGAGUGGGUGCCAGAAUG	1598	csuscugaGfuGfGfGfugccagaaugL96	2694	có nghĩa	21
CAUUCUGGCACCCACUCAGAGCC	1599	csAfsuucUfgGfCfaccAfcUfcagagscsc	2695	đối nghĩa	23
GCUCUGAGUGGGUGCCAGAAU	1600	gscsucugAfgUfGfGfgugccagaauL96	2696	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUUCUGGCACCCACUCAGAGCCA	1601	asUfsucuGfgCfAfcccaCfuCfagagcscsa	2697	đối nghĩa	23
GCACUGAUGUUCUGAAAGCUC	1602	gscsacugAfuGfUfUfUfcugaaagcucL96	2698	có nghĩa	21
GAGCUUUCAGAACAUCAGUGCCU	1603	gsAfsgcuUfuCfAfgaacAfuCfagugcscsu	2699	đối nghĩa	23
CACUGAUGUUCUGAAAGCUCU	1604	csascugaUfgUfUfCfugaaagcucuL96	2700	có nghĩa	21
AGAGCUUUCAGAACAUCAGUGCC	1605	asGfsagcUfuUfCfagaaCfaUfcagugscsc	2701	đối nghĩa	23
AAAGGCACUGAUGUUCUGAAA	1606	asasaggcAfcUfGfAfuguucugaaaL96	2702	có nghĩa	21
UUUCAGAACAUCAGUGCCUUUCC	1607	usUfsucaGfaAfCfaucaGfuGfccuuuscsc	2703	đối nghĩa	23
GAAAGGCACUGAUGUUCUGAA	1608	gsasaaggCfaCfUfGfauguucugaaL96	2704	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UUCAGAACAUCAGUGCCUUUCCG	1609	usUfscagAfaCfAfucagUfgCfcuuucscsg	2705	đối nghĩa	23
GGGAAGGUGGAAGUCUUCCUG	1610	gsgsgaagGfuGfGfAfagucuuccugL96	2706	có nghĩa	21
CAGGAAGACUUCCACCUUCCCUU	1611	csAfsggaAfgAfCfuuccAfcCfuucccsusu	2707	đối nghĩa	23
GGAAGGUGGAAGUCUUCCUGG	1612	gsgsaaggUfgGfAfAfgucuuccuggL96	2708	có nghĩa	21
CCAGGAAGACUUCCACCUUCCCU	1613	csCfsaggAfaGfAfcuucCfaCfcuuccscsu	2709	đối nghĩa	23
GGAAGGGAAGGUGGAAGUCUU	1614	gsgsaaggGfaAfGfGfuggaagucuuL96	2710	có nghĩa	21
AAGACUUCCACCUUCCCUUCCAC	1615	asAfsgacUfuCfCfaccuUfcCfcuuccsasc	2711	đối nghĩa	23
UGGAAGGGAAGGUGGAAGUCU	1616	usgsgaagGfgAfAfGfguggaagucuL96	2712	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AGACUUCCACCUUCCCUUCCACA	1617	asGfsacuUfcCfAfccuuCfcCfuuccascsa	2713	đối nghĩa	23
UGCUAAAUCAGUACUUCCAAA	1618	usgscuaaAfuCfAfGfuacuuccaaaL96	2714	có nghĩa	21
UUUGGAAGUACUGAUUUAGCAUG	1619	usUfsuggAfaGfUfacugAfuUfuagcasusg	2715	đối nghĩa	23
GCUAAAUCAGUACUUCCAAAG	1620	gscsuaaaUfcAfGfUfacuuccaaagL96	2716	có nghĩa	21
CUUUGGAAGUACUGAUUUAGCAU	1621	csUfsuugGfaAfGfuacuGfaUfuuagcsasu	2717	đối nghĩa	23
AACAUGCUAAAUCAGUACUUC	1622	asascaugCfuAfAfAfucaguacuucL96	2718	có nghĩa	21
GAAGUACUGAUUUAGCAUGUUGU	1623	gsAfsaguAfcUfGfauuuAfgCfauguusgsu	2719	đối nghĩa	23
CAACAUGCUAAAUCAGUACUU	1624	csasacauGfcUfAfAfaucaguacuuL96	2720	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCAUCCUGAGUUGUGGCGGCAGU	1633	usCfsaucCfuGfAfguugUfgGfcggcasgsu	2729	đối nghĩa	23
GCAACCGUCUGGAUGAUGUGC	1634	gscsaaccGfuCfUfGfgaugaugugcL96	2730	có nghĩa	21
GCACAUCAUCCAGACGGUUGCCC	1635	gsCfsacaUfcAfUfccagAfcGfguugcscsc	2731	đối nghĩa	23
CAACCGUCUGGAUGAUGUGCG	1636	csasaccgUfcUfGfGfaugaugugcgL96	2732	có nghĩa	21
CGCACAUCAUCCAGACGGUUGCC	1637	csGfscacAfuCfAfuccaGfaCfgguugscsc	2733	đối nghĩa	23
CUGGGCAACCGUCUGGAUGAU	1638	csusgggcAfaCfCfGfucuggaugauL96	2734	có nghĩa	21
AUCAUCCAGACGGUUGCCCAGGU	1639	asUfscauCfcAfGfaccggUfuGfcccagsgsu	2735	đối nghĩa	23
CCUGGGCAACCGUCUGGAUGA	1640	cscsugggCfaAfCfCfgucuggaugaL96	2736	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AAGUACUGAUUUAGCAUGUUGUU	1625	asAfsguaCfuGfAfuuuaGfcAfuguugsusu	2721	đối nghĩa	23
CCACAACUCAGGAUGAAAAAU	1626	cscsacaaCfuCfAfGfgaugaaaaauL96	2722	có nghĩa	21
AUUUUUCAUCCUGAGUUGUGGCG	1627	asUfsuuuUfcAfUfccugAfgUfuguggscsg	2723	đối nghĩa	23
CACAACUCAGGAUGAAAAAUU	1628	csascaacUfcAfGfGfaugaaaaauuL96	2724	có nghĩa	21
AAUUUUUCAUCCUGAGUUGUGGC	1629	asAfsuuuUfuCfAfuccuGfaGfuugugsgsc	2725	đối nghĩa	23
GCCGCCACAACUCAGGAUGAA	1630	gscscgccAfcAfAfCfucaggaugaaL96	2726	có nghĩa	21
UUCAUCCUGAGUUGUGGCGGCAG	1631	usUfscauCfcUfGfaguuGfuGfgcggcsasg	2727	đối nghĩa	23
UGCCGCCACAACUCAGGAUGA	1632	usgsccgcCfaCfAfAfcucaggaugaL96	2728	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCAUCCAGACGGUUGCCCAGGUA	1641	usCfsaucCfaGfAfcgguUfgCfccaggsusa	2737	đối nghĩa	23
GCAAAUGAUGAAGAAACUUUG	1642	gscsaaauGfaUfGfAfagaaacuuugL96	2738	có nghĩa	21
CAAAGUUUCUUCAUCAUUUGCCC	1643	csAfsaagUfuUfCfuucaUfcAfuuugcscsc	2739	đối nghĩa	23
CAAAUGAUGAAGAAACUUUGG	1644	csasaaugAfuGfAfAfgaaacuuuggL96	2740	có nghĩa	21
CCAAAGUUUCUUCAUCAUUUGCC	1645	csCfsaaaGfuUfUfcuucAfuCfauuugscsc	2741	đối nghĩa	23
UGGGGCAAAUGAUGAAGAAAC	1646	usgsgggcAfaAfUfGfaugaagaaacL96	2742	có nghĩa	21
GUUUCUUCAUCAUUUGCCCCAGA	1647	gsUfsuucUfuCfAfucauUfuGfccccasgsa	2743	đối nghĩa	23
CUGGGGCAAAUGAUGAAGAAA	1648	csusggggCfaAfAfUfgaugaagaaaL96	2744	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UUUCUUCAUCAUUUGCCCCAGAC	1649	usUfsucuUfcAfUfcauuUfgCfcccagsasc	2745	đối nghĩa	23
CCAAGGCUGUGUUUGUGGGGA	1650	cscsaaggCfuGfUfGfuuugugggaL96	2746	có nghĩa	21
UCCCCACAAACACAGCCUUGGCG	1651	usCfscccAfcAfAfacacAfgCfcuuggscsg	2747	đối nghĩa	23
CAAGGCUGUGUUUGUGGGGAG	1652	csasaggcUfgUfGfUfuugugggagL96	2748	có nghĩa	21
CUCCCCACAAACACAGCCUUGGC	1653	csUfscccCfaCfAfaacaCfaGfccuugsgsc	2749	đối nghĩa	23
GGCGCCAAGGCUGUGUUUGUG	1654	gsgscgccAfaGfGfCfuguguuugugL96	2750	có nghĩa	21
CACAAACACAGCCUUGGCGCCAA	1655	csAfscaaAfcAfCfagccUfuGfgcgccsasa	2751	đối nghĩa	23
UGGCGCCAAGGCUGUGUUUGU	1656	usgsgcgcCfaAfGfGfcuguguuuguL96	2752	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
ACAAACACAGCCUUGGCGCCAAG	1657	asCfsaaaCfaCfAfgccuUfgGfcgccasasg	2753	đối nghĩa	23
ACUGCCGCCACAACUCAGGAU	1658	ascsugccGfcCfAfCfaacucaggauL96	2754	có nghĩa	21
AUCCUGAGUUGUGGCGGCAGUUU	1659	asUfsccuGfaGfUfugugGfcGfgcagususu	2755	đối nghĩa	23
CUGCCGCCACAACUCAGGAUG	1660	csusgccgCfcAfCfAfacucaggaugL96	2756	có nghĩa	21
CAUCCUGAGUUGUGGCGGCAGUU	1661	csAfsuccUfgAfGfuuguGfgCfggcagsusu	2757	đối nghĩa	23
UCAAACUGCCGCCACAACUCA	1662	uscsaaacUfgCfCfGfccacaacucaL96	2758	có nghĩa	21
UGAGUUGUGGCGGCAGUUUGAAU	1663	usGfsaguUfgUfGfgcggCfaGfuuugasasu	2759	đối nghĩa	23
UUCAAACUGCCGCCACAACUC	1664	ususcaaaCfuGfCfCfgccacaacucL96	2760	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
GAGUUGUGGCGGCAGUUUGAAUC	1665	gsAfsguuGfuGfGfcggcAfgUfuugaasusc	2761	đối nghĩa	23
GGGAAGAUAUCAAAUGGCUGA	1666	gsgsgaagAfuAfUfCfaaauggcugaL96	2762	có nghĩa	21
UCAGCCAUUUGAUAUCUUCCCAG	1667	usCfsagcCfaUfUfugauAfuCfuucccsasg	2763	đối nghĩa	23
GGAAGAUAUCAAAUGGCUGAG	1668	gsgsaagaUfaUfCfAfaauggcugagL96	2764	có nghĩa	21
CUCAGCCAUUUGAUAUCUUCCCA	1669	csUfscagCfcAfUfuugaUfaUfcuuccscsa	2765	đối nghĩa	23
AGCUGGGAAGAUAUCAAAUGG	1670	asgscuggGfaAfGfAfuaucaaauggL96	2766	có nghĩa	21
CCAUUUGAUAUCUUCCCAGCUGA	1671	csCfsauuUfgAfUfaucuUfcCfcagcusgsa	2767	đối nghĩa	23
CAGCUGGGAAGAUAUCAAAUG	1672	csasgcugGfgAfAfGfauaucaaaugL96	2768	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CAUUUGAUAUCUUCCCAGCUGAU	1673	csAfsuuuGfaUfAfucuuCfcCfagcugsasu	2769	đối nghĩa	23
AAUCAGUACUUCCAAAGUCUA	1674	asasucagUfaCfUfUfccaaagucuaL96	2770	có nghĩa	21
UAGACUUUGGAAGUACUGAUUUA	1675	usAfsgacUfuUfGfgaagUfaCfugauususa	2771	đối nghĩa	23
AUCAGUACUUCCAAAGUCUAU	1676	asuscaguAfcUfUfCfcaaagucuauL96	2772	có nghĩa	21
AUAGACUUUGGAAGUACUGAUUU	1677	asUfsagaCfuUfUfggaaGfuAfcugausususu	2773	đối nghĩa	23
GCUAAAUCAGUACUUCCAAAG	1678	gscsuaaaUfcAfGfUfacuuccaaagL96	2774	có nghĩa	21
CUUUGGAAGUACUGAUUUAGCAU	1679	csUfsuugGfaAfGfuacuGfaUfuuagcsasu	2775	đối nghĩa	23
UGCUAAAUCAGUACUUCCAAA	1680	usgscuaaAfuCfAfGfuacuuccaaaL96	2776	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UUUGGAAGUACUGAUUUAGCAUG	1681	usUfsuggAfaGfUfacugAfuUfuagcasusg	2777	đối nghĩa	23
UCAGCAUGCCAAUAUGUGUGG	1682	uscsagcaUfgCfCfAfauauguguggL96	2778	có nghĩa	21
CCACACAUAUUGGCAUGCUGACC	1683	csCfsacaCfaUfAfuuggCfaUfgcugascsc	2779	đối nghĩa	23
CAGCAUGCCAAUAUGUGUGGG	1684	csasgcauGfcCfAfAfauaugugugggL96	2780	có nghĩa	21
CCCACACAUAUUGGCAUGCUGAC	1685	csCfscacAfcAfUfauugGfcAfugcugsasc	2781	đối nghĩa	23
AGGGUCAGCAUGCCAAUAUGU	1686	asgsggucAfgCfAfUfgccaauauguL96	2782	có nghĩa	21
ACAUAUUGGCAUGCUGACCCUCU	1687	asCfsauaUfuGfGfcaugCfuGfacccuscsu	2783	đối nghĩa	23
GAGGGUCAGCAUGCCAAUAUG	1688	gsasggguCfaGfCfAfugccaauaugL96	2784	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CAUAUUGGCAUGCUGACCCUCUG	1689	csAfsuauUfgGfCfaugcUfgAfcccucsusg	2785	đối nghĩa	23
GCAUAUGUGGCUAAAGCAAUA	1690	gscsauauGfuGfGfCfuaaagcaauaL96	2786	có nghĩa	21
UAUUGCUUUAGCCACAUAUGCAG	1691	usAfsuugCfuUfUfagccAfcAfuaugcsasg	2787	đối nghĩa	23
CAUAUGUGGCUAAAGCAAUAG	1692	csasuaugUfgGfCfUfaaagcaauagL96	2788	có nghĩa	21
CUAUUGCUUUAGCCACAUAUGCA	1693	csUfsauuGfcUfUfuagcCfaCfauaugscsa	2789	đối nghĩa	23
UGCUGCAUAUGUGGCUAAAGC	1694	usgscugcAfuAfUfGfuggcuaaagcL96	2790	có nghĩa	21
GCUUUAGCCACAUAUGCAGCAAG	1695	gsCfsuuuAfgCfCfacauAfuGfcagcasasg	2791	đối nghĩa	23
UUGCUGCAUAUGUGGCUAAAG	1696	ususgcugCfaUfAfUfguggcuaaagL96	2792	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CUUUAGCCACAUAUGCAGCAAGU	1697	csUfsuuaGfcCfAfcauaUfgCfagcaasgsu	2793	đối nghĩa	23
AAAUGAUGAAGAAACUUUGGC	1698	asasaugaUfgAfAfGfaaacuuuggcL96	2794	có nghĩa	21
GCCAAAGUUUCUUCAUCAUUUGC	1699	gsCfscaaAfgUfUfucuuCfaUfcauuusgsc	2795	đối nghĩa	23
AAUGAUGAAGAAACUUUGGCU	1700	asasugauGfaAfGfAfaacuuuggcuL96	2796	có nghĩa	21
AGCCAAAGUUUCUUCAUCAUUUG	1701	asGfsccaAfaGfUfuucuUfcAfucauususg	2797	đối nghĩa	23
GGGCAAAUGAUGAAGAAACUU	1702	gsgsgcaaAfuGfAfUfgaagaaacuuL96	2798	có nghĩa	21
AAGUUUCUUCAUCAUUUGCCCCA	1703	asAfsguuUfcUfUfcaucAfuUfugcccscsa	2799	đối nghĩa	23
GGGGCAAAUGAUGAAGAAACU	1704	gsgsggcaAfaUfGfAfugaagaaacuL96	2800	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AGUUUCUUCAUCAUUUGCCCCAG	1705	asGfsuuuCfuUfCfaucaUfuUfgccccsasg	2801	đối nghĩa	23
GAGAUACUAAAGGAAGAAUUC	1706	gsasgauaCfuAfAfAfggaagaauucL96	2802	có nghĩa	21
GAAUUCUUCCUUUAGUAUCUCGA	1707	gsAfsauuCfuUfCfcuuuAfgUfaucucsgsa	2803	đối nghĩa	23
AGAUACUAAAGGAAGAAUUCC	1708	asgsauacUfaAfAfGfgaagaauuccL96	2804	có nghĩa	21
GGAAUUCUUCCUUUAGUAUCUCG	1709	gsGfsaauUfcUfUfccuuUfaGfuaucuscsg	2805	đối nghĩa	23
CCUCGAGAUACUAAAGGAAGA	1710	cscsucgaGfaUfAfCfuaaaggaagaL96	2806	có nghĩa	21
UCUUCCUUUAGUAUCUCGAGGAC	1711	usCfsuucCfuUfUfaguaUfcUfcgaggsasc	2807	đối nghĩa	23
UCCUCGAGAUACUAAAGGAAG	1712	uscscucgAfgAfUfAfcuaaaggaagL96	2808	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CUUCCUUUAGUAUCUCGAGGACA	1713	csUfsuccUfuUfAfguauCfuCfgaggascsa	2809	đối nghĩa	23
ACAACUCAGGAUGAAAAAUUU	1714	ascsaacuCfaGfGfAfugaaaaauuuL96	2810	có nghĩa	21
AAAUUUUUCAUCCUGAGUUGUGG	1715	asAfsauuUfuUfCfauccUfgAfguugusgsg	2811	đối nghĩa	23
CAACUCAGGAUGAAAAAUUUU	1716	csasacucAfgGfAfUfgaaaaauuuuL96	2812	có nghĩa	21
AAAAUUUUUCAUCCUGAGUUGUG	1717	asAfsaauUfuUfUfcaucCfuGfaguugsusg	2813	đối nghĩa	23
CGCCACAACUCAGGAUGAAAA	1718	csgsccacAfaCfUfCfaggaugaaaaL96	2814	có nghĩa	21
UUUUCAUCCUGAGUUGUGGCGGC	1719	usUfsuucAfuCfCfugagUfuGfuggcgsgsc	2815	đối nghĩa	23
CCGCCACAACUCAGGAUGAAA	1720	cscsgccaCfaAfCfUfcaggaugaaaL96	2816	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UUUCAUCCUGAGUUGUGGCGGCA	1721	usUfsucaUfcCfUfgaguUfgUfggcggscsa	2817	đối nghĩa	23
AGGGAAGGUGGAAGUCUUCCU	1722	asgsggaaGfgUfGfGfaagucuuccuL96	2818	có nghĩa	21
AGGAAGACUUCCACCUUCCCUUC	1723	asGfsgaaGfaCfUfuccaCfcUfucccususc	2819	đối nghĩa	23
GGGAAGGUGGAAGUCUUCCUG	1724	gsgsgaagGfuGfGfAfagucuuccugL96	2820	có nghĩa	21
CAGGAAGACUUCCACCUUCCCUU	1725	csAfsggaAfgAfCfuuccAfcCfuucccsusu	2821	đối nghĩa	23
UGGAAGGGAAGGUGGAAGUCU	1726	usgsgaagGfgAfAfGfguggaagucuL96	2822	có nghĩa	21
AGACUUCCACCUUCCCUUCCACA	1727	asGfsacuUfcCfAfccuuCfcCfuuccascsa	2823	đối nghĩa	23
GUGGAAGGGAAGGUGGAAGUC	1728	gsusggaaGfgGfAfAfgguggaagucL96	2824	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
GACUUCCACCUUCCCUUCCACAG	1729	gsAfscuuCfcAfCfcuucCfcUfuccacsasg	2825	đối nghĩa	23
GGCGAGCUUGCCACUGUGAGA	1730	gsgscgagCfuUfGfCfcacugugagaL96	2826	có nghĩa	21
UCUCACAGUGGCAAGCUCGCCGU	1731	usCfsucaCfaGfUfggcaAfgCfucgccsgsu	2827	đối nghĩa	23
GCGAGCUUGCCACUGUGAGAG	1732	gscsgagcUfuGfCfCfacugugagagL96	2828	có nghĩa	21
CUCUCACAGUGGCAAGCUCGCCG	1733	csUfscucAfcAfGfuggcAfaGfcucgcscsg	2829	đối nghĩa	23
GGACGGCGAGCUUGCCACUGU	1734	gsgsacggCfgAfGfCfuugccacuguL96	2830	có nghĩa	21
ACAGUGGCAAGCUCGCCGUCCAC	1735	asCfsaguGfgCfAfagcuCfgCfcguccsasc	2831	đối nghĩa	23
UGGACGGCGAGCUUGCCACUG	1736	usgsgacgGfcGfAfGfcuugccacugL96	2832	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CAGUGGCAAGCUCGCCGUCCACA	1737	csAfsgugGfcAfAfgcucGfcCfguccascsa	2833	đối nghĩa	23
AUGUGCGUAACAGAUUCAAAC	1738	asusgugcGfuAfAfCfagauucaaacL96	2834	có nghĩa	21
GUUUGAAUCUGUUACGCACAUCA	1739	gsUfsuugAfaUfCfuguuAfcGfcacauscsa	2835	đối nghĩa	23
UGUGCGUAACAGAUUCAAACU	1740	usgsugcgUfaAfCfAfgauucaaacuL96	2836	có nghĩa	21
AGUUUGAAUCUGUUACGCACAUC	1741	asGfsuuuGfaAfUfcuguUfaCfgcacasusc	2837	đối nghĩa	23
GAUGAUGUGCGUAACAGAUUC	1742	gsasugauGfuGfCfGfuaacagauucL96	2838	có nghĩa	21
GAAUCUGUUACGCACAUCAUCCA	1743	gsAfsaucUfgUfUfacgcAfcAfucaucscsa	2839	đối nghĩa	23
GGAUGAUGUGCGUAACAGAUU	1744	gsgsaugaUfgUfGfCfguaacagauuL96	2840	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AAUCUGUUACGCACAUCAUCCAG	1745	asAfsucuGfuUfAfcgcaCfaUfcauccsasg	2841	đối nghĩa	23
GGGUCAGCAUGCCAAUAUGUG	1746	gsgsgucaGfcAfUfGfccaauaugugL96	2842	có nghĩa	21
CACAUAUUGGCAUGCUGACCCUC	1747	csAfscauAfuUfGfgcauGfcUfgacccsusc	2843	đối nghĩa	23
GGUCAGCAUGCCAAUAUGUGU	1748	gsgsucagCfaUfGfCfcaauaugugL96	2844	có nghĩa	21
ACACAUAUUGGCAUGCUGACCCU	1749	asCfsacaUfaUfUfggcaUfgCfugaccscsu	2845	đối nghĩa	23
CAGAGGGUCAGCAUGCCAAUA	1750	csasgaggGfuCfAfGfcaugccaauaL96	2846	có nghĩa	21
UAUUGGCAUGCUGACCCUCUGUC	1751	usAfsuugGfcAfUfgcugAfcCfcucugsusc	2847	đối nghĩa	23
ACAGAGGGUCAGCAUGCCAAU	1752	ascsagagGfgUfCfAfgcaugccaauL96	2848	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUUGGCAUGCUGACCCUCUGUCC	1753	asUfsuggCfaUfGfcugaCfcCfucuguscsc	2849	đối nghĩa	23
GCUUGAAUGGGAUCUUGGUGU	1754	gscsuugaAfuGfGfGfaucuuggugu L96	2850	có nghĩa	21
ACACCAAGAUCCCAUUCAAGCCA	1755	asCfsaccAfaGfAfuccAfuUfcaagcscsa	2851	đối nghĩa	23
CUUGAAUGGGAUCUUGGUGUC	1756	csusugaaUfgGfGfAfucuuggugucL96	2852	có nghĩa	21
GACACCAAGAUCCCAUUCAAGCC	1757	gsAfscacCfaAfGfauccCfaUfucaagscsc	2853	đối nghĩa	23
CAUGGCUUGAAUGGGAUCUUG	1758	csasuggcUfuGfAfAfugggaucuugL96	2854	có nghĩa	21
CAAGAUCCCAUUCAAGCCAUGUU	1759	csAfsagaUfcCfCfaucAfaGfccaugsusu	2855	đối nghĩa	23
ACAUGGCUUGAAUGGGAUCUU	1760	ascsauggCfuUfGfAfaugggaucuuL96	2856	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AAGAUCCCAUUCAAGCCAUGUUU	1761	asAfsgauCfcCfAfuucaAfgCfcaugususu	2857	đối nghĩa	23
UCAAAUGGCUGAGAAGACUGA	1762	uscsaaauGfgCfUfGfagaagacugaL96	2858	có nghĩa	21
UCAGUCUUCUCAGCCAUUUGAUA	1763	usCfsaguCfuUfCfucagCfcAfuuugasusa	2859	đối nghĩa	23
CAAAUGGCUGAGAAGACUGAC	1764	csasaaugGfcUfGfAfgaagacugacL96	2860	có nghĩa	21
GUCAGUCUUCUCAGCCAUUUGAU	1765	gsUfscagUfcUfUfcucaGfcCfauuugsasu	2861	đối nghĩa	23
GAUAUCAAAUGGCUGAGAAGA	1766	gsasuaucAfaAfUfGfgcugagaagaL96	2862	có nghĩa	21
UCUUCUCAGCCAUUUGAUAUCUU	1767	usCfsuucUfcAfGfccauUfuGfauaucsusu	2863	đối nghĩa	23
AGAUAUCAAAUGGCUGAGAAG	1768	asgsauauCfaAfAfUfggcugagaagL96	2864	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CUUCUCAGCCAUUUGAUAUCUUC	1769	csUfsucuCfaGfCfcauuUfgAfuaucususc	2865	đối nghĩa	23
GAAAGUCAUCGACAAGACAUU	1770	gsasaaguCfaUfCfGfacaagacauuL96	2866	có nghĩa	21
AAUGUCUUGUCGAUGACUUUCAC	1771	asAfsuguCfuUfGfucgaUfgAfcuuucsasc	2867	đối nghĩa	23
AAAGUCAUCGACAAGACAUUG	1772	asasagucAfuCfGfAfcaagacauugL96	2868	có nghĩa	21
CAAUGUCUUGUCGAUGACUUUCA	1773	csAfsaugUfcUfUfgucgAfuGfacuuuscsa	2869	đối nghĩa	23
AUGUGAAAGUCAUCGACAAGA	1774	asusgugaAfaGfUfCfaucgacaagaL96	2870	có nghĩa	21
UCUUGUCGAUGACUUUCACAUUC	1775	usCfsuugUfcGfAfugacUfuUfcacaususc	2871	đối nghĩa	23
AAUGUGAAAGUCAUCGACAAG	1776	asasugugAfaAfGfUfcaucgacaagL96	2872	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CUUGUCGAUGACUUUCACAUUCU	1777	csUfsuguCfgAfUfgacuUfuCfacauuscsu	2873	đối nghĩa	23
GGCUAAUUUGUAUCAAUGAUU	1778	gsgscuaaUfuUfGfUfaucaaugauuL96	2874	có nghĩa	21
AAUCAUUGAUACAAAUUAGCCGG	1779	asAfsucaUfuGfAfuacaAfaUfuagccsgsg	2875	đối nghĩa	23
GCUAAUUUGUAUCAAUGAUUA	1780	gscsuaauUfuGfUfAfucaaugauuaL96	2876	có nghĩa	21
UAAUCAUUGAUACAAAUUAGCCG	1781	usAfsaucAfuUfGfauacAfaAfuuagcscsg	2877	đối nghĩa	23
CCCCGGCUAAUUUGUAUCAAU	1782	cscsccggCfuAfAfUfuuguaucaauL96	2878	có nghĩa	21
AUUGAUACAAAUUAGCCGGGGGA	1783	asUfsugaUfaCfAfaauuAfgCfcggggsgsa	2879	đối nghĩa	23
CCCCCGGCUAAUUUGUAUCAA	1784	cscscccgGfcUfAfAfuuuguaucaaL96	2880	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UUGAUACAAAUUAGCCGGGGGAG	1785	usUfsgauAfcAfAfauuaGfcCfgggggsasg	2881	đối nghĩa	23
UGUCGACUUCUGUUUUAGGAC	1786	usgsucgaCfuUfCfUfguuuuaggacL96	2882	có nghĩa	21
GUCCUAAAACAGAAGUCGACAGA	1787	gsUfsccuAfaAfAfcagaAfgUfcgacasgsa	2883	đối nghĩa	23
GUCGACUUCUGUUUUAGGACA	1788	gsuscgacUfuCfUfGfuuuuaggacaL96	2884	có nghĩa	21
UGUCCUAAAACAGAAGUCGACAG	1789	usGfsuccUfaAfAfacagAfaGfucgacsasg	2885	đối nghĩa	23
GAUCUGUCGACUUCUGUUUUA	1790	gsasucugUfcGfAfCfuucuguuuuaL96	2886	có nghĩa	21
UAAAACAGAAGUCGACAGAUCUG	1791	usAfsaaaCfaGfAfagucGfaCfagaucsusg	2887	đối nghĩa	23
AGAUCUGUCGACUUCUGUUUU	1792	asgsaucuGfuCfGfAfcuucuguuuuL96	2888	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AAAACAGAAGUCGACAGAUCUGU	1793	asAfsaacAfgAfAfgucgAfcAfgaucusgsu	2889	đối nghĩa	23
CCGAGAAGUCACCAAGAAGCU	1794	cscsgagaAfgUfCfAfccaagaagcuL96	2890	có nghĩa	21
AGCUUCUUGGUGACUUCUCGGUC	1795	asGfscuuCfuUfGfgugaCfuUfcucggsusc	2891	đối nghĩa	23
CGAGAAGUCACCAAGAAGCUA	1796	csgsagaaGfuCfAfCfcaagaagcuaL96	2892	có nghĩa	21
UAGCUUCUUGGUGACUUCUCGGU	1797	usAfsgcuUfcUfUfggugAfcUfucucgsgsu	2893	đối nghĩa	23
AGGACCGAGAAGUCACCAAGA	1798	asgsgaccGfaGfAfAfgucaccaagaL96	2894	có nghĩa	21
UCUUGGUGACUUCUCGGUCCUUG	1799	usCfsuugGfuGfAfcuucUfcGfguccususg	2895	đối nghĩa	23
AAGGACCGAGAAGUCACCAAG	1800	asasggacCfgAfGfAfagucaccaagL96	2896	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CUUGGUGACUUCUCGGUCCUUGU	1801	csUfsuggUfgAfCfuucuCfgGfuccuusgsu	2897	đối nghĩa	23
AAACAUGGCUUGAAUGGGAUC	1802	asasacauGfgCfUfUfgaaugggaucL96	2898	có nghĩa	21
GAUCCCAUUCAAGCCAUGUUUAA	1803	gsAfsuccCfaUfUfcaagCfcAfuguuusasa	2899	đối nghĩa	23
AACAUGGCUUGAAUGGGAUCU	1804	asascaugGfcUfUfGfaaugggaucuL96	2900	có nghĩa	21
AGAUCCCAUUCAAGCCAUGUUUA	1805	asGfsaucCfcAfUfucaaGfcCfauguususa	2901	đối nghĩa	23
UGUUAAACAUGGCUUGAAUGG	1806	usgsuuaaAfcAfUfGfgcuugaauggL96	2902	có nghĩa	21
CCAUUCAAGCCAUGUUUAACAGC	1807	csCfsauuCfaAfGfccauGfuUfuaacasgsc	2903	đối nghĩa	23
CUGUUAAACAUGGCUUGAAUG	1808	csusguuaAfaCfAfUfggcuugaaugL96	2904	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CAUUCAAGCCAUGUUUAACAGCC	1809	csAfsuucAfaGfCfcaugUfuUfaacagscsc	2905	đối nghĩa	23
GACUUGCUGCAUAUGUGGCUA	1810	gsascuugCfuGfCfAfuauguggcuaL96	2906	có nghĩa	21
UAGCCACAUAUGCAGCAAGUCCA	1811	usAfsgccAfcAfUfaugcAfgCfaagucscsa	2907	đối nghĩa	23
ACUUGCUGCAUAUGUGGCUAA	1812	ascsuugcUfgCfAfUfauguggcuaaL96	2908	có nghĩa	21
UUAGCCACAUAUGCAGCAAGUCC	1813	usUfsagcCfaCfAfuaugCfaGfcaaguscsc	2909	đối nghĩa	23
AGUGGACUUGCUGCAUAUGUG	1814	asgsuggaCfuUfGfCfugcauaugugL96	2910	có nghĩa	21
CACAUAUGCAGCAAGUCCACUGU	1815	csAfscauAfuGfCfagcaAfgUfccacusgsu	2911	đối nghĩa	23
CAGUGGACUUGCUGCAUAUGU	1816	csasguggAfcUfUfGfcugcauauguL96	2912	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
ACAUAUGCAGCAAGUCCACUGUC	1817	asCfsauaUfgCfAfgcaaGfuCfcacugsusc	2913	đối nghĩa	23
UAAAUCAGUACUUCCAAAGUC	1818	usasaaucAfgUfAfCfuuccaaagucL96	2914	có nghĩa	21
GACUUUGGAAGUACUGAUUUAGC	1819	gsAfscuuUfgGfAfaguaCfuGfauuuasgsc	2915	đối nghĩa	23
AAAUCAGUACUUCCAAAGUCU	1820	asasaucaGfuAfCfUfuccaaagucuL96	2916	có nghĩa	21
AGACUUUGGAAGUACUGAUUUAG	1821	asGfsacuUfuGfGfaaguAfcUfgauuusasg	2917	đối nghĩa	23
AUGCUAAAUCAGUACUUCCAA	1822	asusgcuaAfaUfCfAfguacuuccaaL96	2918	có nghĩa	21
UUGGAAGUACUGAUUUAGCAUGU	1823	usUfsggaAfgUfAfcugaUfuUfagcausgsu	2919	đối nghĩa	23
CAUGCUAAAUCAGUACUUCCA	1824	csasugcuAfaAfUfCfaguacuuccaL96	2920	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UGGAAGUACUGAUUUAGCAUGUU	1825	usGfsgaaGfuAfCfugauUfuAfgcaugsusu	2921	đối nghĩa	23
UCCUCAAUUGAAGAAGUGGCG	1826	uscscucaAfuUfGfAfagaaguggcgL96	2922	có nghĩa	21
CGCCACUUCUUCAAUUGAGGAGG	1827	csGfsccaCfuUfCfuucaAfuUfgaggasgsg	2923	đối nghĩa	23
CCUCAAUUGAAGAAGUGGCGG	1828	cscsucaaUfuGfAfAfgaaguggcggL96	2924	có nghĩa	21
CCGCCACUUCUUCAAUUGAGGAG	1829	csCfsgccAfcUfUfcuucAfaUfugaggsasg	2925	đối nghĩa	23
CACCUCCUCAAUUGAAGAAGU	1830	csasccucCfuCfAfAfuugaagaaguL96	2926	có nghĩa	21
ACUUCUUCAAUUGAGGAGGUGGC	1831	asCfsuucUfuCfAfaugAfgGfaggugsgsc	2927	đối nghĩa	23
CCACCUCCUCAAUUGAAGAAG	1832	cscsaccuCfcUfCfAfauugaagaagL96	2928	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
CUUCUUCAAUUGAGGAGGUGGCC	1833	csUfsucuUfcAfAfuugaGfgAfgguggscsc	2929	đối nghĩa	23
CAAGAUGUCCUCGAGAUACUA	1834	csasagauGfuCfCfUfcgagauacuaL96	2930	có nghĩa	21
UAGUAUCUCGAGGACAUCUUGAA	1835	usAfsguaUfcUfCfgaggAfcAfucuugsasa	2931	đối nghĩa	23
AAGAUGUCCUCGAGAUACUAA	1836	asasgaugUfcCfUfCfgagauacuaaL96	2932	có nghĩa	21
UUAGUAUCUCGAGGACAUCUUGA	1837	usUfsaguAfuCfUfcgagGfaCfaucuusgsa	2933	đối nghĩa	23
UGUUCAAGAUGUCCUCGAGAU	1838	usgsuucaAfgAfUfGfuccucgagauL96	2934	có nghĩa	21
AUCUCGAGGACAUCUUGAACACC	1839	asUfscucGfaGfGfacauCfuUfgaacascsc	2935	đối nghĩa	23
GUGUUCAAGAUGUCCUCGAGA	1840	gsusguucAfaGfAfUfguccucgagaL96	2936	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UCUCGAGGACAUCUUGAACACCU	1841	usCfsucgAfgGfAfcaucUfuGfaacacscsu	2937	đối nghĩa	23
ACAUGCUAAAUCAGUACUUCC	1842	ascsaugcUfaAfAfUfcaguacuuccL96	2938	có nghĩa	21
GGAAGUACUGAUUUAGCAUGUUG	1843	gsGfsaagUfaCfUfgauuUfaGfcaugususg	2939	đối nghĩa	23
CAUGCUAAAUCAGUACUUCCA	1844	csasugcuAfaAfUfCfaguacuuccaL96	2940	có nghĩa	21
UGGAAGUACUGAUUUAGCAUGUU	1845	usGfsgaaGfuAfCfugauUfuAfgcaugsusu	2941	đối nghĩa	23
AACAACAUGCUAAAUCAGUAC	1846	asascaacAfuGfCfUfaaaucaguacL96	2942	có nghĩa	21
GUACUGAUUUAGCAUGUUGUUCA	1847	gsUfsacuGfaUfUfuagcAfuGfuuguuscsa	2943	đối nghĩa	23
GAACAACAUGCUAAAUCAGUA	1848	gsasacaaCfaUfGfCfuaaaucaguaL96	2944	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UACUGAUUUAGCAUGUUGUUCAU	1849	usAfscugAfuUfUfagcaUfgUfuguucsasu	2945	đối nghĩa	23
GAAAGGCACUGAUGUUCUGAA	1850	gsasaaggCfaCfUfGfauguucugaaL96	2946	có nghĩa	21
UUCAGAACAUCAGUGCCUUUCCG	1851	usUfscagAfaCfAfucagUfgCfcuuucscsg	2947	đối nghĩa	23
AAAGGCACUGAUGUUCUGAAA	1852	asasaggcAfcUfGfAfuguucugaaaL96	2948	có nghĩa	21
UUUCAGAACAUCAGUGCCUUUCC	1853	usUfsucaGfaAfCfaucaGfuGfccuuuscsc	2949	đối nghĩa	23
UGCGGAAAGGCACUGAUGUUC	1854	usgscggaAfaGfGfCfacugauguucL96	2950	có nghĩa	21
GAACAUCAGUGCCUUUCCGCACA	1855	gsAfsacaUfcAfGfugccUfuUfccgcascsa	2951	đối nghĩa	23
GUGCGGAAAGGCACUGAUGUU	1856	gsusgcggAfaAfGfGfcacugauguuL96	2952	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AACAUCAGUGCCUUUCCGCACAC	1857	asAfscauCfaGfUfgccuUfuCfcgcacsasc	2953	đối nghĩa	23
GUCAGCAUGCCAAUAUGUGUG	1858	gsuscagcAfuGfCfCfaauaugugugL96	2954	có nghĩa	21
CACACAUAUUGGCAUGCUGACCC	1859	csAfscacAfuAfUfuggcAfuGfcugacscsc	2955	đối nghĩa	23
UCAGCAUGCCAAUAUGUGUGG	1860	uscsagcaUfgCfCfAfauaugugugguggL96	2956	có nghĩa	21
CCACACAUAUUGGCAUGCUGACC	1861	csCfsacaCfaUfAfuuggCfaUfgcugascsc	2957	đối nghĩa	23
GAGGGUCAGCAUGCCAAUAUG	1862	gsasggguCfaGfCfAfugccaauaugL96	2958	có nghĩa	21
CAUAUUGGCAUGCUGACCCUCUG	1863	csAfsuauUfgGfCfaugcUfgAfcccucsusg	2959	đối nghĩa	23
AGAGGGUCAGCAUGCCAAUAU	1864	asgsagggUfcAfGfCfaugccaauauL96	2960	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AUAUUGGCAUGCUGACCCUCUGU	1865	asUfsauuGfgCfAfugcuGfaCfccucusgsu	2961	đối nghĩa	23
GAUGCUCCGGAAUGUUGCUGA	1866	gsasugcuCfcGfGfAfauguugcugaL96	2962	có nghĩa	21
UCAGCAACAUUCCGGAGCAUCCU	1867	usCfsagcAfaCfAfuuccGfgAfgcaucscsu	2963	đối nghĩa	23
AUGCUCCGGAAUGUUGCUGAA	1868	asusgcucCfgGfAfAfuguugcugaaL96	2964	có nghĩa	21
UUCAGCAACAUUCCGGAGCAUCC	1869	usUfscagCfaAfCfauucCfgGfagcauscsc	2965	đối nghĩa	23
CAAGGAUGCUCCGGAAUGUUG	1870	csasaggaUfgCfUfCfcggaauguugL96	2966	có nghĩa	21
CAACAUUCCGGAGCAUCCUUGGA	1871	csAfsacaUfuCfCfggagCfaUfccuugsgsa	2967	đối nghĩa	23
CCAAGGAUGCUCCGGAAUGUU	1872	cscsaaggAfuGfCfUfccggaauguuL96	2968	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
AACAUUCCGGAGCAUCCUUGGAU	1873	asAfscauUfcCfGfgagcAfuCfcuuggsasu	2969	đối nghĩa	23
GCGUAACAGAUUCAAACUGCC	1874	gscsguaaCfaGfAfUfucaaacugccL96	2970	có nghĩa	21
GGCAGUUUGAAUCUGUUACGCAC	1875	gsGfscagUfuUfGfaaucUfgUfuacgcsasc	2971	đối nghĩa	23
CGUAACAGAUUCAAACUGCCG	1876	csgsuaacAfgAfUfUfcaaacugccgL96	2972	có nghĩa	21
CGGCAGUUUGAAUCUGUUACGCA	1877	csGfsgcaGfuUfUfgaauCfuGfuuacgscsa	2973	đối nghĩa	23
AUGUGCGUAACAGAUUCAAAC	1878	asusgugcGfuAfAfCfagauucaaacL96	2974	có nghĩa	21
GUUUGAAUCUGUUACGCACAUCA	1879	gsUfsuugAfaUfCfuguuAfcGfcacauscsa	2975	đối nghĩa	23
GAUGUGCGUAACAGAUUCAAA	1880	gsasugugCfgUfAfAfcagauucaaaL96	2976	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
UUUGAAUCUGUUACGCACAUCAU	1881	usUfsugaAfuCfUfguuaCfgCfacaucsasu	2977	đối nghĩa	23
AGAGAAGAUGGGCUACAAGGC	1882	asgsagaaGfaUfGfGfgcuacaaggcL96	2978	có nghĩa	21
GCCUUGUAGCCCAUCUUCUCUGC	1883	gsCfscuuGfuAfGfccaUfcUfucucusgsc	2979	đối nghĩa	23
GAGAAGAUGGGCUACAAGGCC	1884	gsasgaagAfuGfGfGfcuacaaggccL96	2980	có nghĩa	21
GGCCUUGUAGCCCAUCUUCUCUG	1885	gsGfsccuUfgUfAfgccAfuCfuucucsusg	2981	đối nghĩa	23
AGGCAGAGAAGAUGGGCUACA	1886	asgsgcagAfgAfAfGfaugggcuacaL96	2982	có nghĩa	21
UGUAGCCCAUCUUCUCUGCCUGC	1887	usGfsuagCfcCfAfucuuCfuCfugccusgsc	2983	đối nghĩa	23
CAGGCAGAGAAGAUGGGCUAC	1888	csasggcaGfaGfAfAfgaugggcuacL96	2984	có nghĩa	21

Trình tự không được cải biến	SEQ ID NO:	Trình tự được cải biến	SEQ ID NO:	sợi	Chiều dài
GUAGCCCAUCUUCUCUGCCUGCC	1889	gsUfsagcCfcAfUfcuucUfcUfgccugscsc	2985	đối nghĩa	23

Yêu cầu bảo hộ

1. Tác nhân ARNi sợi kép ức chế sự biểu hiện của hydroxyaxit oxidaza (HAO1) trong tế bào,

trong đó tác nhân ARNi sợi kép có chứa sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa tạo thành vùng mạch kép,

trong đó sợi đối nghĩa có chứa ít nhất 15 nucleotit liên tiếp khác biệt ở không nhiều hơn 3 nucleotit so với trình tự nucleotit 5'-UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA-3' (SEQ ID NO: 706);

trong đó tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa và tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa chứa cải biến nucleotit, và

trong đó ít nhất một sợi liên hợp với phối tử.

2. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong các cải biến nucleotit được chọn từ nhóm gồm có cải biến nucleotit đeoxy-tymin (dT) có đầu tận cùng 3', cải biến nucleotit 2'-O-metyl, cải biến nucleotit 2'-flo, cải biến nucleotit 2'-đeoxy, cải biến nucleotit bị khóa, cải biến nucleotit mất bazơ, cải biến nucleotit 2'-amino, cải biến nucleotit 2'-alkyl, cải biến nucleotit morpholino, cải biến phosphoramiđat, cải biến nucleotit chứa bazơ không tự nhiên, nucleotit chứa cải biến nhóm 5'-phosphorothioat, nucleotit chứa cải biến 5' phosphat hoặc chất bắt chước 5' phosphat, và nucleotit tận cùng liên kết với cải biến dẫn xuất cholesteryl hoặc nhóm bisđexylamit của axit đođecanoic.

3. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 1 hoặc 2, trong đó tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa và tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa độc lập chứa cải biến nucleotit 2'-O-metyl hoặc cải biến nucleotit 2'-flo.

4. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó ít nhất một sợi bao gồm phần nhô 3' có ít nhất 1 nucleotit.

5. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó ít nhất một sợi bao gồm phần nhô ở đầu 3' có ít nhất 2 nucleotit.

6. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó tác nhân này còn bao gồm ít nhất một kết nối phosphorothioat hoặc metylphosphonat liên nucleotit.

7. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 6, trong đó kết nối phosphorothioat hoặc metylphosphonat liên nucleotit là ở đầu 3' của một sợi.

8. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 7, trong đó sợi là sợi đối nghĩa.

9. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 7, trong đó sợi là sợi có nghĩa.

10. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 6, trong đó kết nối phosphorothioat hoặc metylphosphonat liên nucleotit là ở đầu 5' của một sợi.

11. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 10, trong đó sợi là sợi đối nghĩa.

12. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 10, trong đó sợi là sợi có nghĩa.

13. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 6, trong đó kết nối phosphorothioat hoặc metylphosphonat liên nucleotit là ở cả đầu 5' và 3' của một sợi.

14. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 13, trong đó sợi là sợi đối nghĩa.

15. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 6, trong đó tác nhân ARNi này chứa 6-8 liên kết phosphothioat giữa các nucleotit.

16. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 15, trong đó sợi đối nghĩa bao gồm hai cầu nối phosphorothioat liên nucleotit ở đầu tận cùng 5' và hai cầu nối phosphorothioat liên nucleotit ở đầu tận cùng 3', và sợi có nghĩa bao gồm ít nhất hai cầu nối phosphorothioat liên nucleotit ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3'.

17. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó cặp bazơ ở vị trí 1 của đầu 5′ của sợi đối nghĩa của sợi kép là cặp bazơ AU.

18. Tác nhân ARNi sợi kép ức chế sự biểu hiện của hydroxyaxit oxidaza (HAO1) trong tế bào,

trong đó tác nhân ARNi sợi kép bao gồm sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa tạo ra vùng sợi kép,

trong đó sợi có nghĩa có chứa ít nhất 15 nucleotit liên tiếp khác biệt ở không nhiều hơn 3 nucleotit so với trình tự nucleotit GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA (SEQ ID NO: 589) và sợi đối nghĩa có chứa ít nhất 15 nucleotit liên tiếp khác biệt ở không nhiều hơn 3 nucleotit so với trình tự nucleotit UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA (SEQ ID NO: 706),

trong đó tất cả các nucleotit của sợi có nghĩa độc lập bao gồm cải biến được chọn từ nhóm gồm có cải biến 2'-O-metyl và cải biến 2'-floro,

trong đó sợi có nghĩa bao gồm hai kết nối phosphorothioat liên nucleotit ở đầu 5',

trong đó tất cả các nucleotit của sợi đối nghĩa bao gồm cải biến được chọn từ nhóm gồm có cải biến ở 2'-O-metyl và cải biến ở 2'-flo,

trong đó sợi đối nghĩa bao gồm hai kết nối phosphorothioat liên nucleotit ở đầu 5' và hai kết nối phosphorothioat liên nucleotit ở đầu 3', và

trong đó sợi có nghĩa liên hợp với phối tử là một hoặc nhiều dẫn xuất GalNAc.

19. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó vùng sợi kép có chiều dài 15-30 cặp nucleotit.

20. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19, trong đó mỗi sợi có chiều dài 15-30 nucleotit.

21. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 20, trong đó mỗi sợi độc lập có chiều dài 19-30 nucleotit.

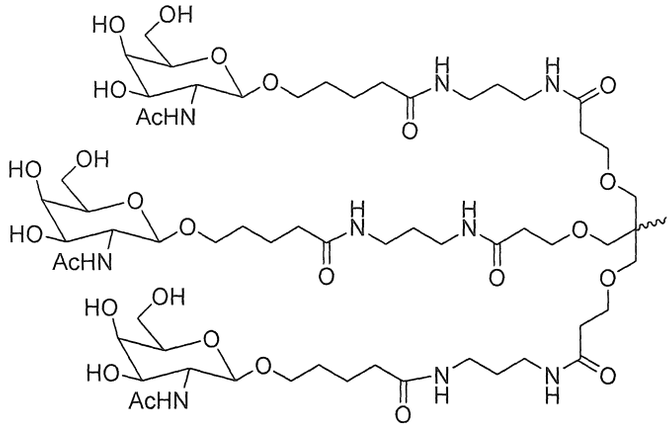
22. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 20, trong đó mỗi sợi độc lập có chiều dài 19-25 nucleotit.

23. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 20, trong đó mỗi sợi độc lập có chiều dài 19-23 nucleotit.

24. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó phối tử là một hoặc nhiều dẫn xuất GalNAc.

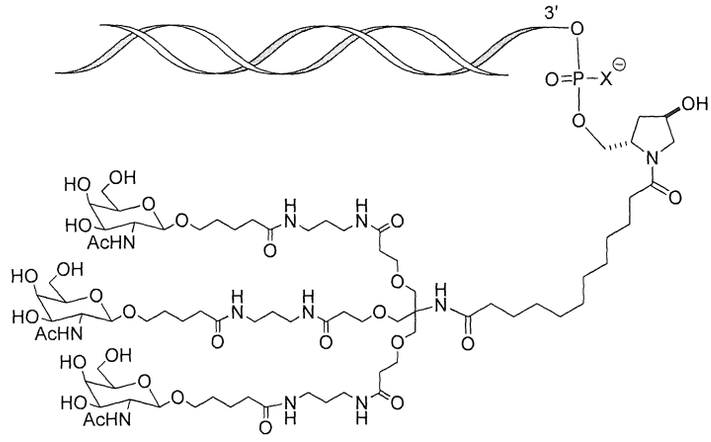
25. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24, trong đó phối tử là một hoặc nhiều dẫn xuất GalNAc được gắn qua liên kết nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba.

26. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 25, trong đó phối tử là



27. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 26, trong đó phối tử được gắn vào đầu 3′ của sợi có nghĩa.

28. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 27, trong đó tác nhân ARNi sợi kép liên hợp với phối tử như được thể hiện trong sơ đồ sau đây



trong đó X là O hoặc S.

29. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 28, trong đó sợi có nghĩa có chứa ít nhất 17 nucleotit liên tiếp khác biệt ở không nhiều hơn 3 nucleotit so với trình tự nucleotit UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA (SEQ ID NO: 706).

30. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 29, trong đó sợi có nghĩa có chứa ít nhất 17 nucleotit liên tiếp khác biệt ở không nhiều hơn 3 nucleotit so với trình tự nucleotit GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA (SEQ ID NO: 589) và sợi đối nghĩa có chứa ít nhất 17 nucleotit liên tiếp khác biệt ở không nhiều hơn 3 nucleotit so với trình tự nucleotit UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA (SEQ ID NO: 706).

31. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 30, trong đó sợi có nghĩa có chứa ít nhất 19 nucleotit liên tiếp khác biệt ở không nhiều hơn 3 nucleotit so với trình tự nucleotit UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA (SEQ ID NO: 706).

32. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 31, trong đó sợi có nghĩa có chứa ít nhất 19 nucleotit liên tiếp khác biệt ở không nhiều hơn 3 nucleotit so với trình tự nucleotit GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA (SEQ ID NO: 589) và sợi đối nghĩa có chứa ít nhất 17 nucleotit liên tiếp khác biệt ở không nhiều hơn 3 nucleotit so với trình tự nucleotit UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA (SEQ ID NO: 706).

33. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 32, trong đó sợi có nghĩa có chứa trình tự nucleotit UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA (SEQ ID NO: 706).

34. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 33, trong đó sợi có nghĩa có chứa trình tự nucleotit GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA (SEQ ID NO: 589) và sợi đối nghĩa có chứa trình tự nucleotit UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA (SEQ ID NO: 706).

35. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 34, trong đó sợi có nghĩa gồm trình tự nucleotit UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA (SEQ ID NO: 706).

36. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 35, trong đó sợi có nghĩa gồm trình tự nucleotit GACUUUCAUCCUGGAAAUAUA (SEQ ID NO: 589) và sợi đối nghĩa gồm trình tự nucleotit UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA (SEQ ID NO: 706).

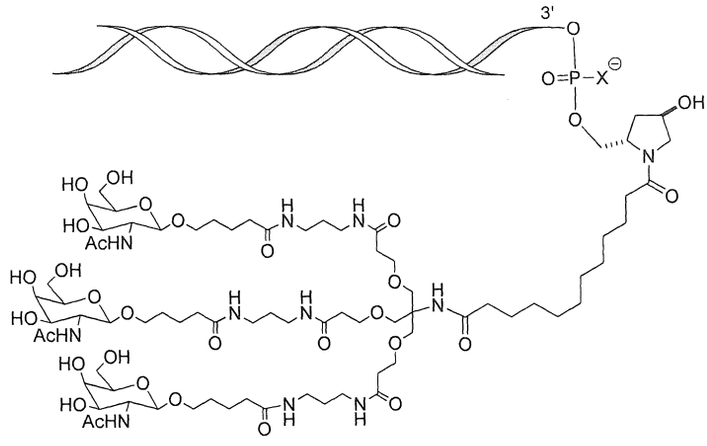
37. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 36, trong đó sợi có nghĩa chứa trình tự nucleotit 5'- gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauaua-3' (SEQ ID NO:213) và sợi đối nghĩa chứa trình tự nucleotit 5'-usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa-3' (SEQ ID NO:330),

trong đó a, g, c, và u lần lượt là nucleotit A, G, C, và U được cải biến 2'-O-metyl (2'-OMe); Af, Gf, Cf, và Uf lần lượt là nucleotit A, G, C, và U được cải biến 2'-flo; và s là kết nối phosphorothioat.

38. Tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 37, trong đó sợi có nghĩa chứa trình tự nucleotit 5'- gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauaua-3' (SEQ ID NO:213) và sợi đối nghĩa chứa trình tự nucleotit 5'-usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa-3' (SEQ ID NO:330),

trong đó a, g, c, và u lần lượt là nucleotit A, G, C, và U được cải biến 2'-O-metyl (2'-OMe); Af, Gf, Cf, và Uf lần lượt là nucleotit A, G, C, và U được cải biến 2'-flo; và s là kết nối phosphorothioat,

trong đó phối tử liên hợp với đầu 3' của sợi có nghĩa như được thể hiện trong sơ đồ sau đây



, trong đó X là O.

39. Tế bào phân lập chứa tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 38.

40. Dược phẩm chứa tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 38.

41. Dược phẩm theo điểm 40, trong đó tác nhân ARNi sợi kép có mặt trong dung dịch không đệm.

42. Dược phẩm theo điểm 41, trong đó dung dịch không đệm là nước.

43. Dược phẩm theo điểm 41, trong đó dung dịch không đệm là nước muối.

44. Dược phẩm theo điểm 40, trong đó tác nhân ARNi sợi kép có mặt trong dung dịch đệm.

45. Dược phẩm theo điểm 44, trong đó dung dịch đệm chứa axetat, xitrat, prolamin, cacbonat, hoặc phosphat hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng.

46. Dược phẩm theo điểm 44, trong đó dung dịch đệm này là nước muối đệm phosphat (PBS).

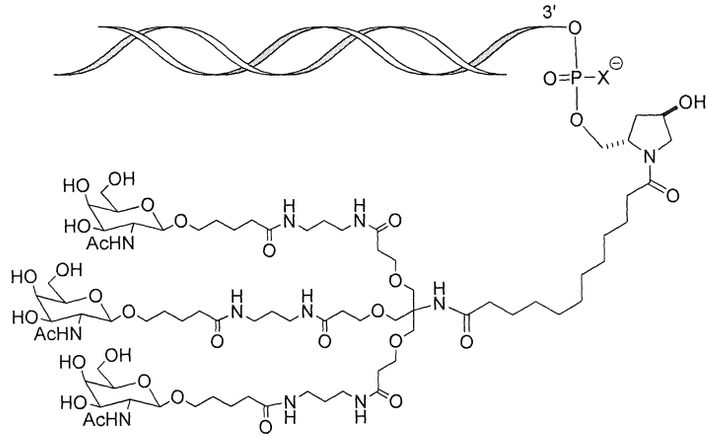
47. Tác nhân ARNi sợi kép ức chế sự biểu hiện của hydroxyaxit oxidaza (HAO1) trong tế bào,

trong đó tác nhân ARNi sợi kép bao gồm sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa tạo ra vùng sợi kép,

trong đó sợi có nghĩa có chứa trình tự nucleotit 5'- gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauaua-3' (SEQ ID NO:213) và sợi đối nghĩa chứa trình tự nucleotit 5'-usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa-3' (SEQ ID NO:330),

trong đó a, g, c, và u lần lượt là nucleotit A, G, C, và U được cải biến 2'-O-metyl (2'-OMe); Af, Gf, Cf, và Uf lần lượt là nucleotit A, G, C, và U được cải biến 2'-flo; và s là kết nối phosphorothioat,

trong đó phối tử liên hợp với đầu 3' của sợi có nghĩa như được thể hiện trong sơ đồ sau đây



, trong đó X là O.

48. Tế bào phân lập chứa tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 47.

49. Dược phẩm chứa tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 47.

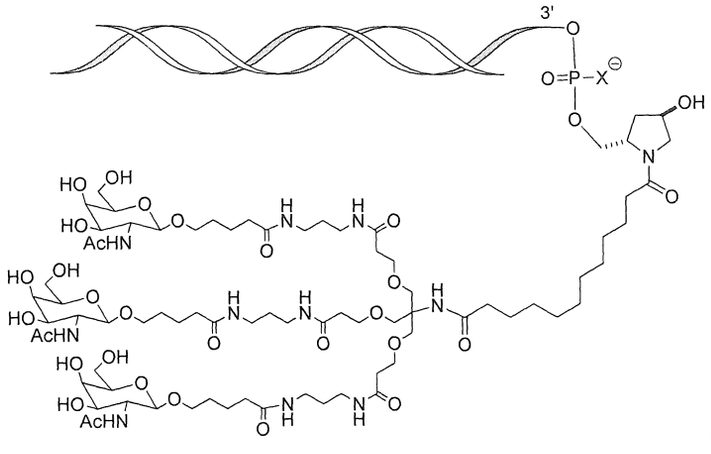
50. Tác nhân ARNi sợi kép ức chế sự biểu hiện của hydroxyaxit oxidaza (HAO1) trong tế bào,

trong đó tác nhân ARNi sợi kép bao gồm sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa tạo ra vùng sợi kép,

trong đó sợi có nghĩa gồm trình tự nucleotit 5'- gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauaua-3' (SEQ ID NO:213) và sợi đối nghĩa gồm trình tự nucleotit 5'- usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa-3' (SEQ ID NO:330),

trong đó a, g, c, và u lần lượt là nucleotit A, G, C, và U được cải biến 2'-O-metyl (2'-OMe); Af, Gf, Cf, và Uf lần lượt là nucleotit A, G, C, và U được cải biến 2'-flo; và s là kết nối phosphorothioat,

trong đó phối tử liên hợp với đầu 3' của sợi có nghĩa như được thể hiện trong sơ đồ sau đây



, trong đó X là O.

51. Tế bào phân lập chứa tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 50.

52. Dược phẩm chứa tác nhân ARNi sợi kép theo điểm 50.

53. Phương pháp ức chế *in vitro* sự biểu hiện HAO1 trong tế bào, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) cho tế bào tiếp xúc với tác nhân ARNi sợi kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 38, 47, và 50, hoặc dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 40 đến 46, 49, và 52; và

(b) duy trì tế bào sản xuất được trong bước (a) trong thời gian đủ để đạt được sự thoái hóa của bản phiên mã mARN của gen HAO1, bằng cách đó ức chế sự biểu hiện của gen HAO1 trong tế bào.

(SEQ ID NO:1).
>gi|11184232|ref|NM_017545.2| Hyđroxyaxit oxiđaza (glycolat oxiđaza) 1 (HAO1)Homo sapiens, mARN

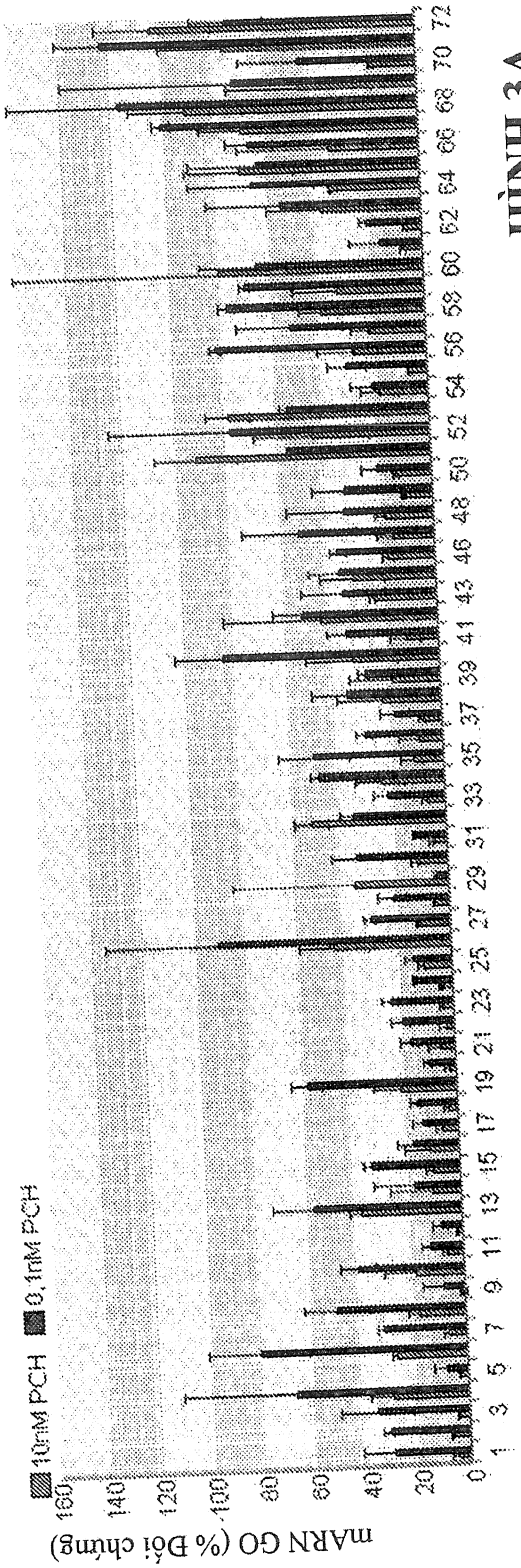
CTGGGATAGCAATAACCTGTGAAAATGCTCCCCCGGCTAATTTGTATCAATGATTATGAACAACATGCTA
AATCAGTACTTCCAAAGTCTATATATGACTATTACAGGTCTGGGGCAAATGATGAAGAAACTTTGGCTGA
TAATATTGCAGCATTTTCCAGATGGAAGCTGTATCCAAGGATGCTCCGGAATGTTGCTGAAACAGATCTG
TCGACTTCTGTTTTAGGACAGAGGGTCAGCATGCCAATATGTGTGGGGGCTACGGCCATGCAGCGCATGG
CTCATGTGGACGGCGAGCTTGCCACTGTGAGAGCCTGTCAGTCCCTGGGAACGGGCATGATGTTGAGTTC
CTGGGCCACCTCCTCAATTGAAGAAGTGGCGGAAGCTGGTCCTGAGGCACTTCGTTGGCTGCAACTGTAT
ATCTACAAGGACCGAGAAGTCACCAAGAAGCTAGTGCGGCAGGCAGAGAAGATGGGCTACAAGGCCATAT
TTGTGACAGTGGACACACCTTACCTGGGCAACCGTCTGGATGATGTGCGTAACAGATTCAAACTGCCGCC
ACAACTCAGGATGAAAAATTTTGAAACCAGTACTTTATCATTTTCTCCTGAGGAAAATTTTGGAGACGAC
AGTGGACTTGCTGCATATGTGGCTAAAGCAATAGACCCATCTATCAGCTGGGAAGATATCAAATGGCTGA
GAAGACTGACATCATTGCCAATTGTTGCAAAGGGCATTTTGAGAGGTGATGATGCCAGGGAGGCTGTTAA
ACATGGCTTGAATGGGATCTTGGTGTCGAATCATGGGGCTCGACAACTCGATGGGGTGCCAGCCACTATT
GATGTTCTGCCAGAAATTGTGGAGGCTGTGGAAGGGAAGGTGGAAGTCTTCCTGGACGGGGGTGTGCGGA
AAGGCACTGATGTTCTGAAAGCTCTGGCTCTTGGCGCCAAGGCTGTGTTTGTGGGGAGACCAATCGTTTG
GGGCTTAGCTTTCCAGGGGGAGAAAGGTGTTCAAGATGTCCTCGAGATACTAAAGGAAGAATTCCGGTTG
GCCATGGCTCTGAGTGGGTGCCAGAATGTGAAAGTCATCGACAAGACATTGGTGAGGAAAAATCCTTTGG
CCGTTTCCAAGATCTGACAGTGCACAATATTTTCCCATCTGTATTATTTTTTTTCAGCATGTATTACTTG
ACAAAGAGACACTGTGCAGAGGGTGACCACAGTCTGTAATTCCCCACTTCAATACAAAGGGTGTCGTTCT
TTTCCAACAAAATAGCAATCCCTTTTATTTCATTGCTTTTGACTTTTCAATGGGTGTCCTAGGAACCTTT
TAGAAAGAAATGGACTTTCATCCTGGAAATATATTAACTGTTAAAAAGAAAACATTGAAAATGTGTTTAG
ACAACGTCATCCCCTGGCAGGCTAAAGTGCTGTATCCTTTAGTAAAATTGGAGGTAGCAAACACTAAGGT
GAAAAGATAATGATCTCATTGTTTATTAACCTGTATTCTGTTTACATGTCTTTAAAACAGTGGTTCTTAA
ATTGTAAGCTCAGGTTCAAAGTGTTGGTAATGCCTGATTCACAACTTTGAGAAGGTAGCACTGGAGAGAA
TTGGAATGGGTGGCGGTAATTGGTGATACTTCTTTGAATGTAGATTTCCAATCACATCTTTAGTGTCTGA
ATATATCCAAATGTTTTAGGATGTATGTTACTTCTTAGAGAGAAATAAAGCATTTTTGGGAAGAAT

HÌNH 1

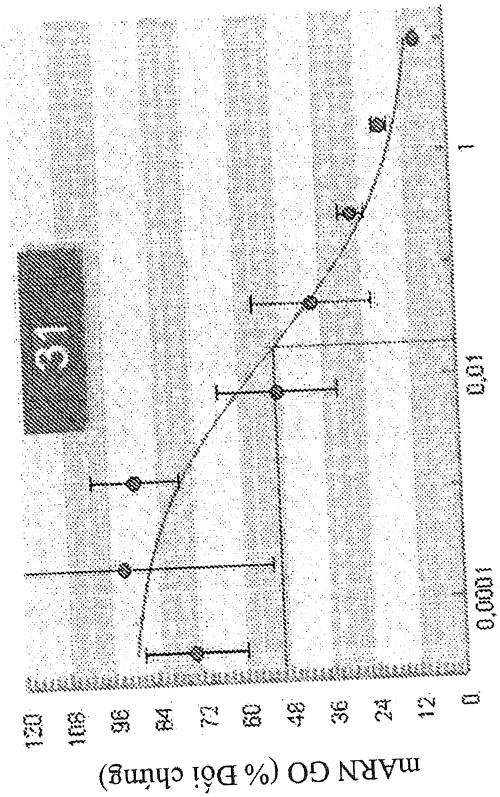
(SEQ ID NO:2)
>gi|133893166|ref|NM_010403.2| Hyđroxyaxit oxiđaza 1, ở gan (Hao1) Mus musculus , mARN

GGTTGCCCTACCCTGCCACAATGTTGCCTCGACTGGTCTGCATCAGTGATTATGAACAGCATGTCCGATC
AGTGCTTCAGAAGTCAGTGTATGACTATTACAGGTCTGGGGCAAATGATCAGGAGACGTTAGCTGATAAC
ATCCAAGCATTTTCTAGATGGAAGCTCTATCCACGGATGCTTCGCAACGTTGCTGATATCGATCTGTCAA
CTTCTGTTTTAGGACAGAGAGTCAGCATGCCAATATGTGTTGGGGCTACTGCCATGCAGTGCATGGCTCA
CGTGGACGGGGAGCTGGCCACTGTGCGAGCCTGTCAGACCATGGGAACTGGCATGATGCTGAGTTCTTGG
GCTACCTCCTCAATAGAAGAAGTGGCAGAAGCTGGCCCAGAGGCACTTCGCTGGATGCAACTGTACATCT
ACAAAGACCGTGAGATCAGCAGACAGATAGTGAAGCGAGCTGAGAAGCAGGGTTACAAGGCCATATTTGT
GACTGTGGACACCCCTTACCTGGGCAACCGCATTGATGACGTGCGGAACAGGTTCAAGCTGCCACCACAA
CTCAGGATGAAAAACTTTGAAACCAATGATTTGGCATTTTCTCCTAAGGGAAATTTTGGAGACAACAGTG
GACTTGCTGAATATGTGGCACAAGCTATAGACCCATCTCTCAGCTGGGATGATATTACATGGCTCAGACG
ATTGACATCACTGCCTATTGTTGTAAAGGGCATTTTGAGAGGTGATGATGCCAAGGAAGCTGTTAAACAT
GGTGTGGATGGGATCTTGGTGTCGAATCATGGGGCGCGACAACTGGATGGGGTGCCAGCTACTATTGATG
TCCTGCCAGAGATTGTTGAGGCTGTGGAAGGGAAGGTAGAAGTCTTCCTGGATGGGGGAGTAAGGAAAGG
TACTGATGTTCTCAAAGCTCTGGCCCTAGGAGCCAAGGCCGTTTTTGTGGGAAGACCCATCATCTGGGGC
TTGGCTTTCCAGGGGGAGAAAGGTTTCAAGATGTCCTCGAGATATTGAAGGAAGAATTCCGACTGGCCA
TGGCTCTGAGTGGGTGCCAGAATGTGGAAAGTCATCGACAAGACATTGGTGAGGAAAAATCCTTTGGCTGT
TTCCAAGATCTGACAGTGCACAATATTTTCCCATCTGTATTATTTTTTTTCCAGCGTGGATTACTTGACA
AAGAGACACTGTGCAGAGGGTGACCACAGACTGTAACTCCCCACTTCTATACAAAGGGTGTCGTTCTTTT
CCAACAAAATAGCCACCCCTTTTCCTTCATTGCTTTTGACTTTTCAATGGGTGTCCTAGGAACCTTCTAG
AAAGAAATGGACTTGCATCCTGGAAATATATTAACTGTTAAAAAGAAAACATTGAAAATGTGTTTGGGCA
ACGTCATCCCCTGGCAGGCTAAAGTGCTGGGGAACAAAAGATATCCTCTGGTGAGATTGCAGGTAGCATG
CTGAAGTGAAAGATACTGACCTCACTGTTCATTAACCTGTCTTCTGTTTAGATTTCCTTAAGACAGTGGC
TCTTACAGTTTGCACTTGGCTTTGAAATGCTGGAAATGCCCAGAGAAACATGAGGTTTGGATTTGCCATG
TTGAGAAAATAGCACCAGGTAGAATTGAAATGGATGGTGGTAATTTGTGATTTTTTTTCTAGAAACTTTT
CATTTTTTAACACCCTATTTTTTTGAAGGTAGATTTTTAGCTATATATCACACGTCTGAATATGTCTGGA
TGTTTTGTGGCACTCATTGCATTTGAAAGGGATGTGTCTAGTCCAGTTGGGACCACATGGAGCTATTTTT
ACTTTTGAACTTTGTCTCCTCATTCTCATTTTAAAATAAGTGTTGACTTCCTAATTCCTCTTGAATCTTT
TTTGATTTTCTCACTTTTCCTCATTTATAGTCACATTCAGTGTAAAGTACATATTTTGTGGGGTCCGTGA
TGAATAAAGATTTGAAATTCTTGTTCAGAAGGAAGGCAAAAAAAAAAAAAAGTCTTTCCTTTTATCACA

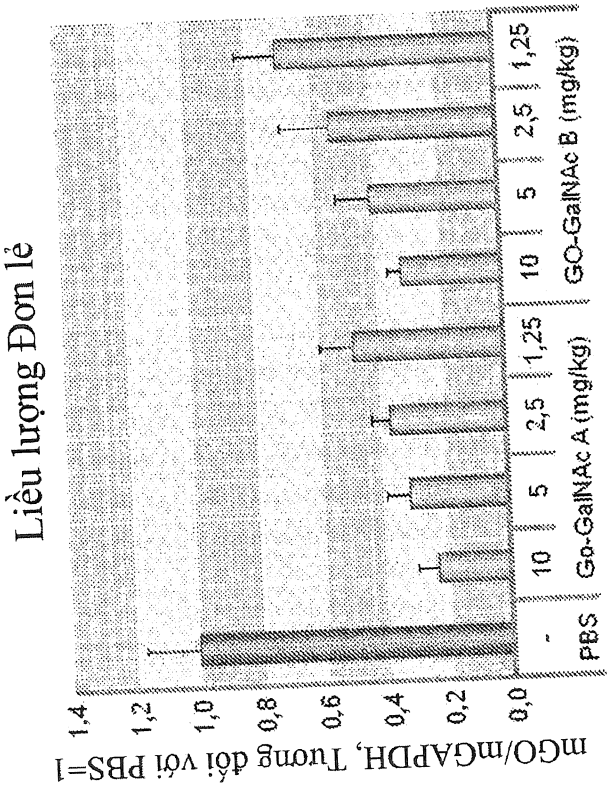
HÌNH 2



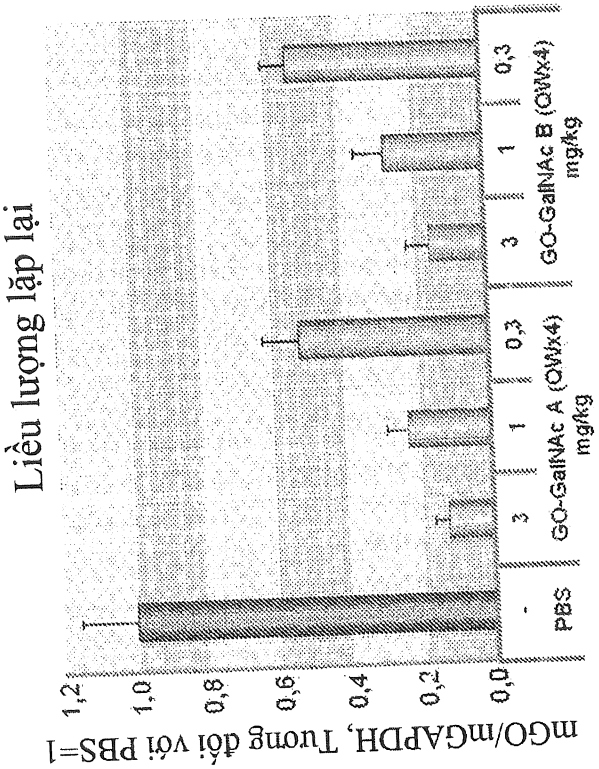
HÌNH 3A



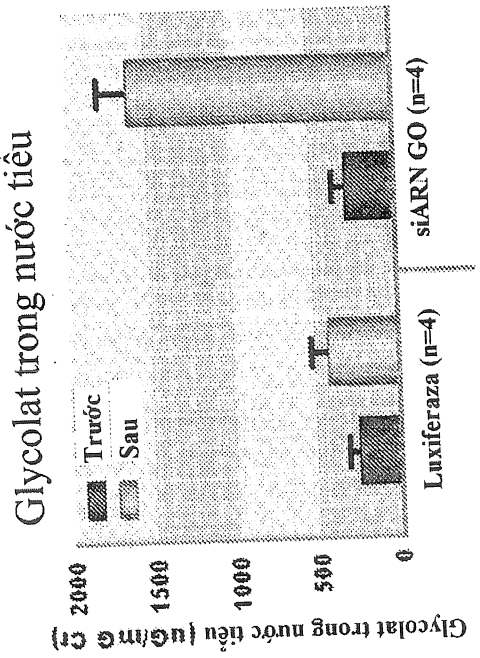
HÌNH 3B



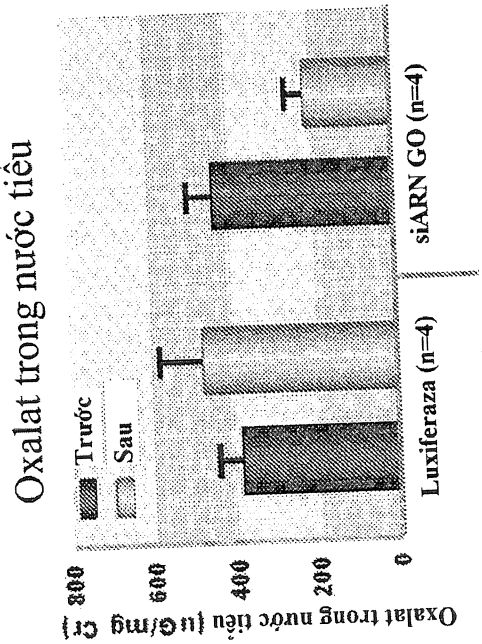
HÌNH 4A



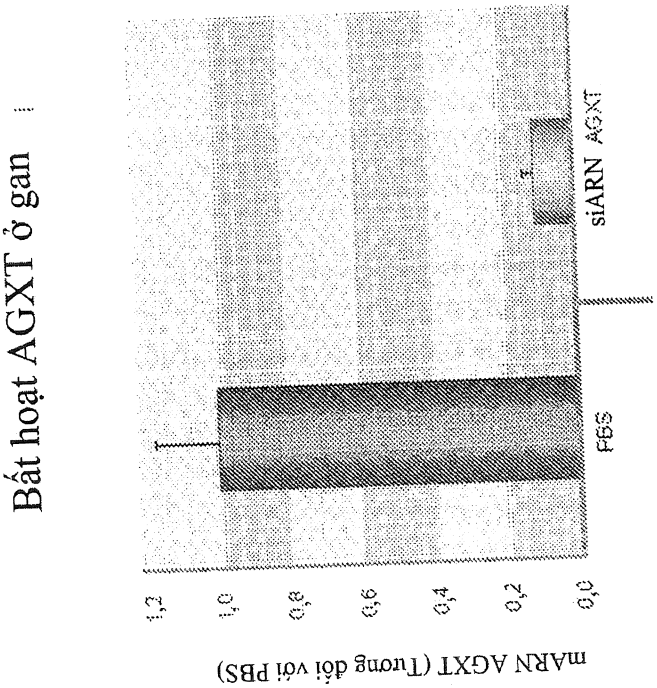
HÌNH 4B



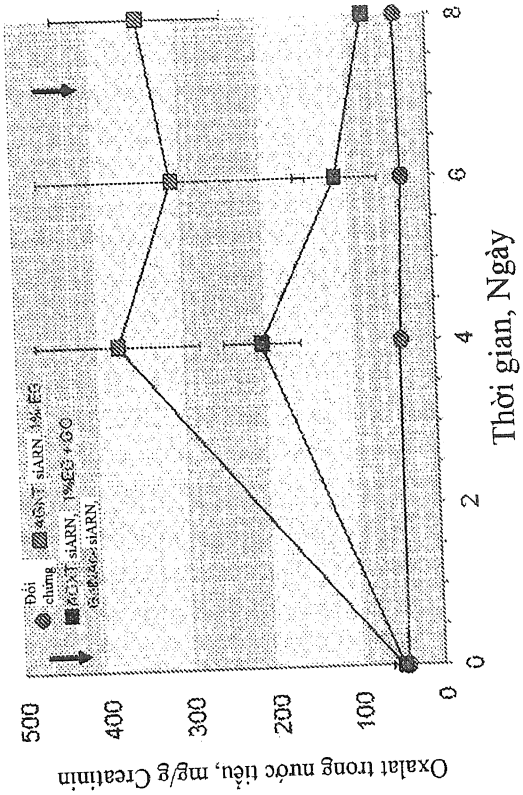
HÌNH 5B



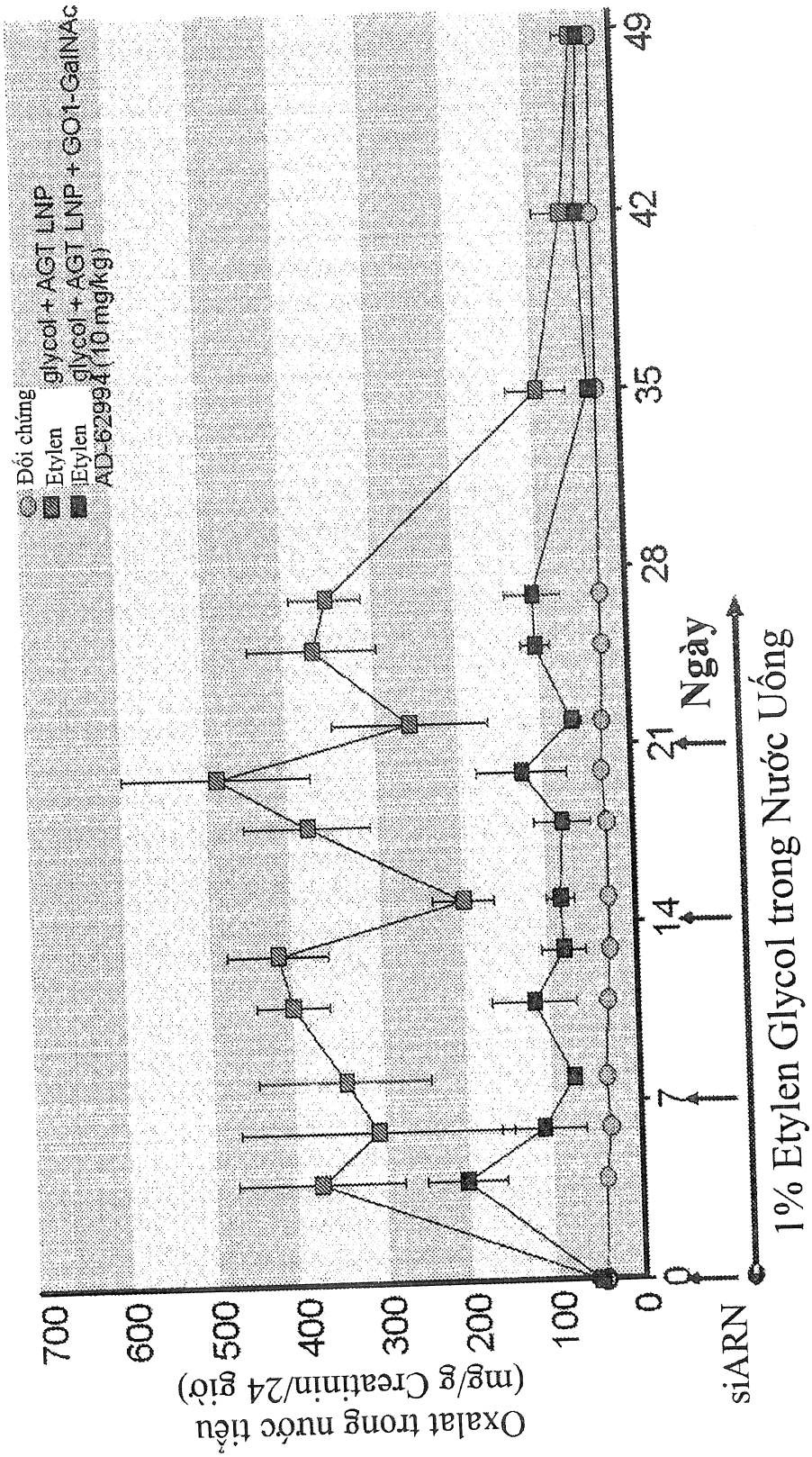
HÌNH 5A



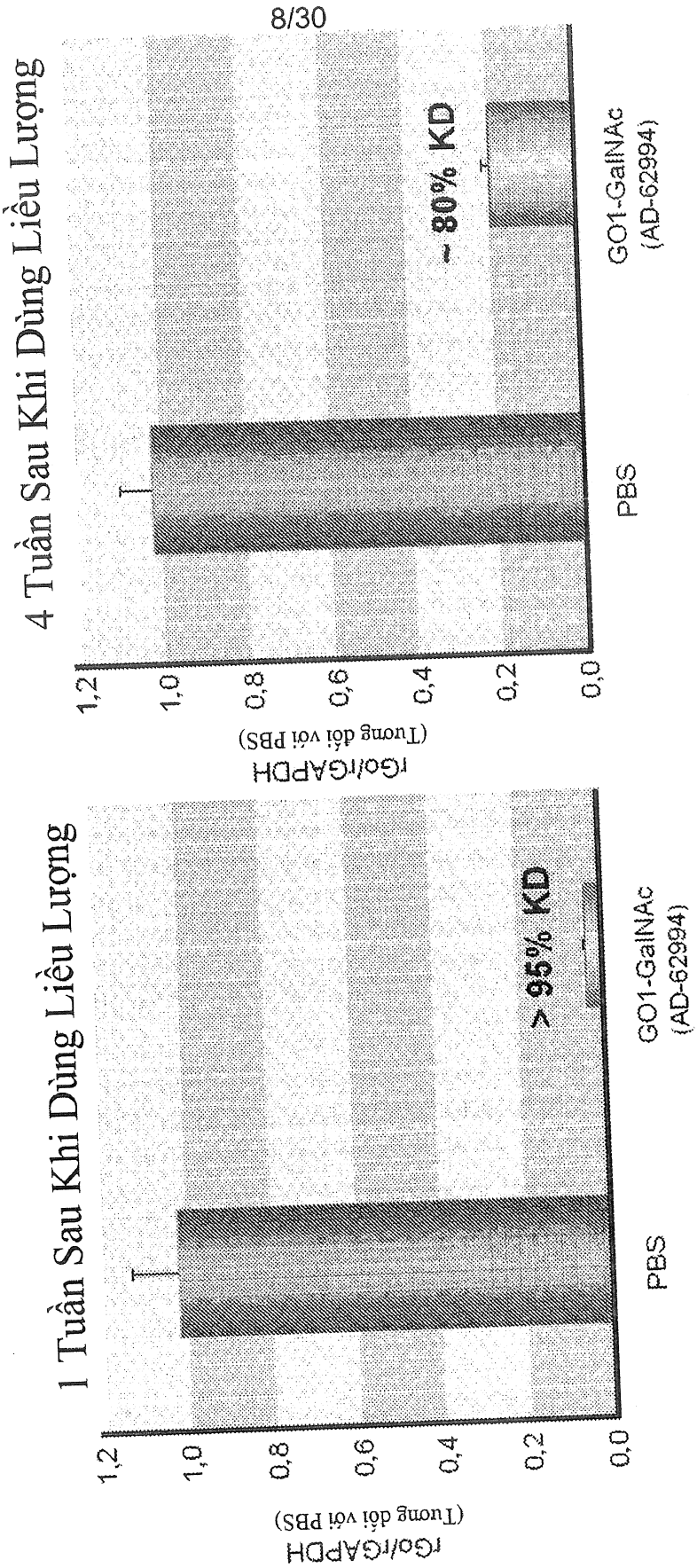
HÌNH 6A



HÌNH 6B


Đối chứng
Etylen
Etylen
glycol + AGT LNP
glycol + AGT LNP + GO1-GalNAc
AD-62994 (10 mg/kg)
Oxalat trong nước tiểu
(mg/g Creatinin/24 giờ)
700
600
500
400
300
200
100
0
siARN
0
7
14
21
28
35
42
49
Ngày
1% Etylen Glycol trong Nước Uống

HÌNH 6C


8/30
1 Tuần Sau Khi Dùng Liều Lượng
rGo/rGAPDH
(Tương đối với PBS)
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
> 95% KD
PBS
GO1-GalNAc
(AD-62994)
4 Tuần Sau Khi Dùng Liều Lượng
rGo/rGAPDH
(Tương đối với PBS)
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
~ 80% KD
PBS
GO1-GalNAc
(AD-62994)

HÌNH 6D

(SEQ ID NO:3)

ATTCTTCCCAAAAATGCTTTATTTCTCTCTAAGAAGTAACATACATCCTAAAACATTTGGATATATTCAGACACTAAAGA
TGTGATTGGAAATCTACATTCAAAGAAGTATCACCAATTACCGCCACCCATTCCAATTCTCTCCAGTGCTACCTTCTCAA
AGTTGTGAATCAGGCATTACCAACACTTTGAACCTGAGCTTACAATTTAAGAACCACTGTTTTAAAGACATGTAAACAGA
ATACAGGTTAATAAACAATGAGATCATTATCTTTTCACCTTAGTGTTTGCTACCTCCAATTTTACTAAAGGATACAGCAC
TTTAGCCTGCCAGGGGATGACGTTGTCTAAACACATTTTCAATGTTTTCTTTTTAACAGTTAATATATTTCCAGGATGAA
AGTCCATTTCTTTCTAAAAGGTTCCTAGGACACCCATTGAAAAGTCAAAAGCAATGAAATAAAAGGGATTGCTATTTTGT
TGGAAAAGAACGACACCCTTTGTATTGAAGTGGGGAATTACAGACTGTGGTCACCCTCTGCACAGTGTCTCTTTGTCAAG
TAATACATGCTGAAAAAAAATAATACAGATGGGAAAATATTGTGCACTGTCAGATCTTGGAAACGGCCAAAGGATTTTTC
CTCACCAATGTCTTGTCGATGACTTTCACATTCTGGCACCCACTCAGAGCCATGGCCAACCGGAATTCTTCCTTTAGTAT
CTCGAGGACATCTTGAACACCTTTCTCCCCCTGGAAAGCTAAGCCCCAAACGATTGGTCTCCCCACAAACACAGCCTTGG
CGCCAAGAGCCAGAGCTTTCAGAACATCAGTGCCTTTCCGCACACCCCCGTCCAGGAAGACTTCCACCTTCCCTTCCACA
GCCTCCACAATTTCTGGCAGAACATCAATAGTGGCTGGCACCCCATCGAGTTGTCGAGCCCCATGATTCGACACCAAGAT
CCCATTCAAGCCATGTTTAACAGCCTCCCTGGCATCATCACCTCTCAAAATGCCCTTTGCAACAATTGGCAATGATGTCA
GTCTTCTCAGCCATTTGATATCTTCCCAGCTGATAGATGGGTCTATTGCTTTAGCCACATATGCAGCAAGTCCACTGTCG
TCTCCAAAATTTTCCTCAGGAGAAAATGATAAAGTACTGGTTTCAAAATTTTTCATCCTGAGTTGTGGCGGCAGTTTGAA
TCTGTTACGCACATCATCCAGACGGTTGCCCAGGTAAGGTGTGTCCACTGTCACAAATATGGCCTTGTAGCCCATCTTCT
CTGCCTGCCGCACTAGCTTCTTGGTGACTTCTCGGTCCTTGTAGATATACAGTTGCAGCCAACGAAGTGCCTCAGGACCA
GCTTCCGCCACTTCTTCAATTGAGGAGGTGGCCCAGGAACTCAACATCATGCCCGTTCCCAGGGACTGACAGGCTCTCAC
AGTGGCAAGCTCGCCGTCCACATGAGCCATGCGCTGCATGGCCGTAGCCCCCACACATATTGGCATGCTGACCCTCTGTC
CTAAAACAGAAGTCGACAGATCTGTTTCAGCAACATTCCGGAGCATCCTTGGATACAGCTTCCATCTGGAAAATGCTGCA
ATATTATCAGCCAAAGTTTCTTCATCATTTGCCCCAGACCTGTAATAGTCATATATAGACTTTGGAAGTACTGATTTAGC
ATGTTGTTCATAATCATTGATACAAATTAGCCGGGGGAGCATTTTCACAGGTTATTGCTATCCCAG

HÌNH 7

(SEQ ID NO:4)

TGTGATAAAAGGAAAGACTTTTTTTTTTTTTTGCCTTCCTTCTGAACAAGAATTTCAAATCTTTATTCATCACGGACCCCACAAAATATGTACTTTAC
ACTGAATGTGACTATAAATGAGGAAAAGTGAGAAAATCAAAAAAGATTCAAGAGGAATTAGGAAGTCAACACTTATTTTAAAATGAGAATGAGGAGAC
AAAGTTCAAAAGTAAAAATAGCTCCATGTGGTCCCAACTGGACTAGACACATCCCTTTCAAATGCAATGAGTGCCACAAAACATCCAGACATATTCAG
ACGTGTGATATATAGCTAAAAATCTACCTTCAAAAAAATAGGGTGTTAAAAAATGAAAAGTTTCTAGAAAAAAAATCACAAATTACCACCATCCATTT
CAATTCTACCTGGTGCTATTTTCTCAACATGGCAAATCCAAACCTCATGTTTCTCTGGGCATTTCCAGCATTTCAAAGCCAAGTGCAAACTGTAAGAG
CCACTGTCTTAAGGAAATCTAAACAGAAGACAGGTTAATGAACAGTGAGGTCAGTATCTTTCACTTCAGCATGCTACCTGCAATCTCACCAGAGGATA
TCTTTTGTTCCCCAGCACTTTAGCCTGCCAGGGGATGACGTTGCCCAAACACATTTTCAATGTTTTCTTTTTAACAGTTAATATATTTCCAGGATGCA
AGTCCATTTCTTTCTAGAAGGTTCCTAGGACACCCATTGAAAAGTCAAAAGCAATGAAGGAAAAGGGGTGGCTATTTTGTTGGAAAAGAACGACACCC
TTTGTATAGAAGTGGGGAGTTACAGTCTGTGGTCACCCTCTGCACAGTGTCTCTTTGTCAAGTAATCCACGCTGGAAAAAAAATAATACAGATGGGAA
AATATTGTGCACTGTCAGATCTTGGAAACAGCCAAAGGATTTTTCCTCACCAATGTCTTGTCGATGACTTTCACATTCTGGCACCCACTCAGAGCCAT
GGCCAGTCGGAATTCTTCCTTCAATATCTCGAGGACATCTTGAACACCTTTCTCCCCCTGGAAAGCCAAGCCCCAGATGATGGGTCTTCCCACAAAAA
CGGCCTTGGCTCCTAGGGCCAGAGCTTTGAGAACATCAGTACCTTTCCTTACTCCCCCATCCAGGAAGACTTCTACCTTCCCTTCCACAGCCTCAACA
ATCTCTGGCAGGACATCAATAGTAGCTGGCACCCCATCCAGTTGTCGCGCCCCATGATTCGACACCAAGATCCCATCCACACCATGTTTAACAGCTTC
CTTGGCATCATCACCTCTCAAAATGCCCTTTACAACAATAGGCAGTGATGTCAATCGTCTGAGCCATGTAATATCATCCCAGCTGAGAGATGGGTCTA
TAGCTTGTGCCACATATTCAGCAAGTCCACTGTTGTCTCCAAAATTTCCCTTAGGAGAAAATGCCAAATCATTGGTTTCAAAGTTTTTCATCCTGAGT
TGTGGTGGCAGCTTGAACCTGTTCCGCACGTCATCAATGCGGTTGCCCAGGTAAGGGGTGTCCACAGTCACAAATATGGCCTTGTAACCCTGCTTCTC
AGCTCGCTTCACTATCTGTCTGCTGATCTCACGGTCTTTGTAGATGTACAGTTGCATCCAGCGAAGTGCCTCTGGGCCAGCTTCTGCCACTTCTTCTA
TTGAGGAGGTAGCCCAAGAACTCAGCATCATGCCAGTTCCCATGGTCTGACAGGCTCGCACAGTGGCCAGCTCCCCGTCCACGTGAGCCATGCACTGC
ATGGCAGTAGCCCCAACACATATTGGCATGCTGACTCTCTGTCCTAAAACAGAAGTTGACAGATCGATATCAGCAACGTTGCGAAGCATCCGTGGATA
GAGCTTCCATCTAGAAAATGCTTGGATGTTATCAGCTAACGTCTCCTGATCATTTGCCCCAGACCTGTAATAGTCATACACTGACTTCTGAAGCACTG
ATCGGACATGCTGTTCATAATCACTGATGCAGACCAGTCGAGGCAACATTGTGGCAGGGTAGGGCAACC

HÌNH 8

(SEQ ID NO:5).
>gi|544464345|ref|XM 005568381.1| PREDICTED: Hydroxyaxit oxiđaza (glycolat oxiđaza) 1 (HAO1).
Macaca fascicularis, mARN

GTGAGGATGTAGAAAGCAATACATTAAAAAAAACCCAAAAAACTCCATCTGGGATAACAATAACCTGTGA
AAATGCTCCCCCGGCTAATTTGTATCAATGATTATGAACAACATGCTAAATCAGTACTTCCAAAGTCTAT
ATATGACTATTATAGGTCTGGAGCAAATGATGAAGAAACTTTGGCCGATAATGTTGCAGCATTTTCCAGA
TGGAAGCTGTATCCAAGGATGCTCCGGAATGTTGCTGAAACAGATCTGTCGACTTCTGTTTTAGGACAGA
GGGTCAGCATGCCAATATGCGTGGGGGCCACGGCCATGCAGCGCATGGCTCATGTGGATGGCGAGCTTGC
CACTGTGCGAGCCTGTCAGTCCCTGGGAACGGGCATGATGTTGAGTTCCTGGGCCACCTCCTCAATTGAA
GAAGTGGCAGAAGCTGGTCCTGAGGCACTTCGTTGGTTGTAACTGTATATCTATAAGGACCGAGAAGTCA
CCAAGAAGCTGGTGCAGCAGGCAGAGAAGACGGGCTACAAGGCCATATTTGTGACAGTGGACACACCTTA
CCTGGGCAACCGTCTTGATGATGTACGTAACAGATTCAAGCTGCCACCACAACTCAGGATGAAAAATTTT
GAAACCAGTACTTTATCATTTTCTCCTGAGGAAAATTTTGGAGATGACAGTGGACTTGCTGCATATGTGG
CTAAAGCGATAGACCCATCTATCAGCTGGGAAGATATCAAATGGCTGAGAAGACTGACGTCATTGCCAAT
TGTTGCAAAGGGCATTTTGAGAGGTGATGATGCCAGGGAGGCTGTTAAACATGGCTTGAATGGGATCTTG
GTGTCGAATCATGGGGCTCGACAACTCGATGGGGTGCCAGCCACTATTGATGTTCTGCCAGAAATTGTGG
AGGCCGTGGAAGGGAAGGTGGAAGTCTTCCTGGACGGGGGTGTGCGGAAAGGCACTGATGTTCTGAAAGC
TCTGGCTCTTGGCGCCAAGGCTGTGTTTGTGGGGAGACCAATCATTTGGGGCTTAGCTTTCCAGGGGGAG
AAAGGTGTTCAAGATGTCCTTGAGATACTAAAGGAAGAATTCCGGTTGGCCATGGCTTTGAGTGGGTGCC
AGAATGTGAAAGTCATCGACAAGACATTGGTGAGGAAAAATCCTTTGGCCGTTTCCAAGATCTGACAGTG
CACAATATTTTCCCATCTGTATTATTTTTTTTTCAGCATGTATTACTTGACAAAGAGACACTGTGCAGAG
GGTGACCACAGTCTGTAATTCCCCACTTCAATACAAAGGATGTCGTTCTTTTCCAACAAAATAGCAATCC
CTTTTAGTTCATTGCTTTTGACTTTTCAATGGGTGTCCTAGGAACCTTTTAGAAAGAAATGGACTTTCAT
CCTGGAAATATATTAACTGTTAAAAAGAAAACATTGAAAATGTGTTTAGACAACGTCATCCTCTGGCAGG
CTAAAGTACTGTATCCTTTAGTAAAATTGGAGGTAGCAAACACTAAGGTGAAAAGATAATGATCTCATTG
TTTATTAACCTGTATTCTGTTTAGATGTCTTTAAAACAGTGGTTCTTAAATTGTAAGCTCAGGTTCAAAG
CATTGGAAATGCCTGATTGACAACATTGAGAAGGTAGCCCTGGATAGAATTGGAATGGATGGCAGTAACT
GGTGATACTTCTTTGAATGCAGCTTTCCAATCACATCTTTAGTGTCTGAATATATCCAAATGTTTTAGGA
TATATGTTACTTCTTAATCAGAGAGAAATAAAGCATTTTTTGGGAAGGATA

HÌNH 9

(SEQ ID NO:6).
>gi|564343200|ref|XM_006235096.1| PREDICTED: Hydroxyaxit oxiđaza (glycolat oxiđaza) 1 (HAO1) Rattus norvegicus, biến thể phiên mã X1,)
mRNAATACTGCCTTGCTGGCTTTGGAAATTCTAGAGTTTCTGAGGCATAGTAGACTTGGTGACCTCCAAGTTCTAACCGAGCAGAAAGAGTCTCATGG
CTTCTGTGACTACTATAGTGGAAGCTCTATCCACGGATGCTGCGCAACGTTGCTGATATCGACCTGTCGACTTCTGTTTTAGGACAGAGAGTGAGCAT
GCCAATATGCGTTGGGGCTACGGCTATGCAGTGCATGGCTCATGTGGATGGGGAGCTGGCCACTGTTCGAGCCTGTCAGACCATGGGAACTGGCATGA
TGTTGAGTTCCTGGGCCACTTCCTCAATAGAAGAGGTGGCAGAGGCTGGCCCGGAGGCACTTCGCTGGATGCAACTCTACATCTACAAAGATCGTGAG
GTCAGCAGTCAGCTAGTGAAGAGGGCTGAGCAGATGGGTTACAAGGCCATATTTGTGACTGTGGACACCCCTTACCTGGGAAATCGCTTCGATGATGT
GCGGAACAGGTTCAAGCTACCACCACAGCTCAGGATGAAAAACTTTGAAACCAACGATTTGGCATTTTCTCCTAAGGGGAATTTTGGAGACAACAGTG
GCCTTGCTGAATATGTGGCACAAGCCATAGACCCATCTCTCAGCTGGGATGATATTAAATGGCTCAGACGGTTGACCTCACTGCCCATTGTTGTAAAG
GGAATTTTGAGAGGTGATGATGCCCAGGAAGCTGTTAAACATGGTGTGGATGGGATCTTAGTGTCGAATCATGGGGCACGACAACTGGATGGGGTGCC
AGCTACTATTGATGCCCTGCCAGAGATCGTTGAGGCTGTGGAAGGGAAGGTAGAAGTCTTCCTGGATGGGGGAGTCAGGAAAGGCACCGATGTTCTCA
AAGCTCTGGCCCTGGGAGCCAGAGCTGTTTTTGTGGGGAGACCCATCATCTGGGGCTTGGCTTTCCAGGGGGAGAAAGGTGTTCAAGATGTCCTCGAG
ATACTGAAGGAAGAGTTCCGGCTGGCCATGGCTCTGAGTGGGTGCCAGAATGTGAAAGTCATCGACAAGACATTGGTGAGGAAAAATCCTTTGGCTGT
TTCCAAGATCTGACAGTGCACAATATTTTCCCATCTGTATTATTTTTTTCCAGCATGGATTACTTGACAAAGAGACACTGTGCAGAGGGTGACCACAG
ACTGTAACTCCCCACTTCAACACAAAGGGTGTCGTTCTTTTCCAACAAAATAGCCACCCCTTCTCCTTCATTGCTTTTGACTTTTCAATGGGTGTCCT
AGGAACCTTCTAGAAAGAAATGGACTTGCATCCTGGAAATATATTAACTGTTAAAAAGAAAACATTGAAAATGTGTTTGGGCAACGTCATCCCCTGGC
AGGCTAAAGTGAGGGGGAACAAAAGATATCCTCTGGTGAGATTGGAGGTAGCATGCCGAAGTAAAAGACACTGACCTCACTGTTTATTAACCTGTCTT
CTGTTTAGATTTCCTTAAGACAGTGGCTCTTACAGTGTGCGCTGGGCTTTGAAATGCCGGAAATGCCCAGAGAAACATGGGGTTTGGATTTGCCGTGT
TGAGAAAATAGCACCCGATAGAATTGAAACGGATGGTGGTAATTTGTGATTTTTCTAGAGACTTTTCATTTTTTAACACCCTATTTCTTTGAAGGTGG
ATTTCTAGCTATATATCGCATGTCTGAATATGTCTGGCTGTTTTGTGGCACTCACTGTGTTTGAAAGGAATGTGTCTAGTCCACTTGGGACCATGCAA
AGTTATTTTATTTTTGAACTCTGTCTCTTCATTCCCATTTTAAAGTAAGTGTTGACTTCCTAATTCCCCTTGAATCATTTTTATTTTCTCACTTCTCA
TTTATAGTCACATTCAGTGTCAAGTATATATTTTGTGGGGTCCATGGTGAATAAAGCTTTAAAATTCTTGTCCAGAAA

HÌNH 10

(SEQ ID NO:7)

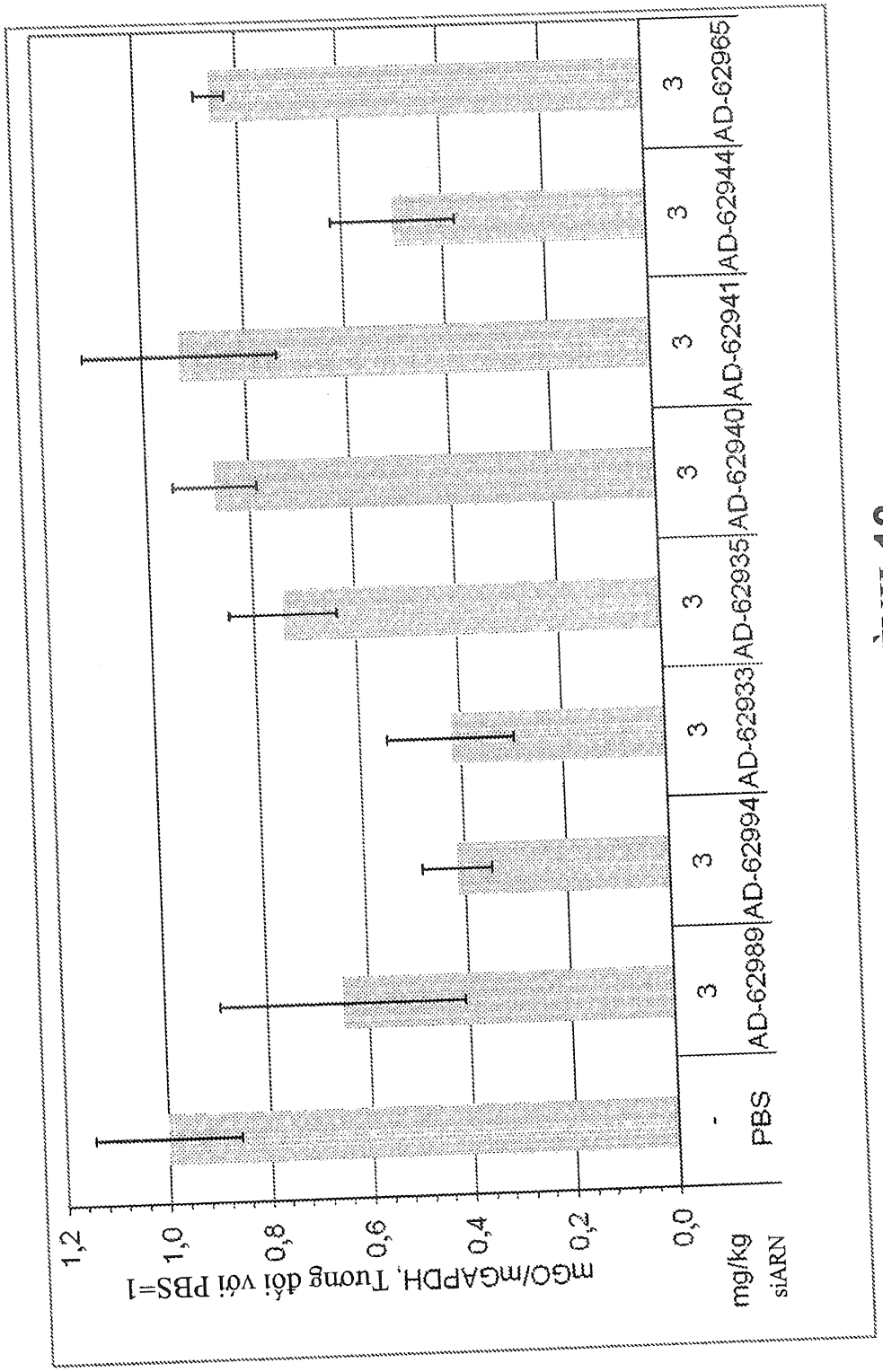
TATCCTTCCCAAAAAATGCTTTATTTCTCTCTGATTAAGAAGTAACATATATCCTAAAACATTTGGATATATTCAGACACTAAAGATGTGATTGGAA
AGCTGCATTCAAAGAAGTATCACCAGTTACTGCCATCCATTCCAATTCTATCCAGGGCTACCTTCTCAATGTTGTCAATCAGGCATTTCCAATGCTT
TGAACCTGAGCTTACAATTTAAGAACCACTGTTTTAAAGACATCTAAACAGAATACAGGTTAATAAACAATGAGATCATTATCTTTTCACCTTAGTG
TTTGCTACCTCCAATTTTACTAAAGGATACAGTACTTTAGCCTGCCAGAGGATGACGTTGTCTAAACACATTTTCAATGTTTTCTTTTTAACAGTTA
ATATATTTCCAGGATGAAAGTCCATTTCTTTCTAAAAGGTTCCTAGGACACCCATTGAAAAGTCAAAAGCAATGAACTAAAAGGGATTGCTATTTTG
TTGGAAAAGAACGACATCCTTTGTATTGAAGTGGGGAATTACAGACTGTGGTCACCCTCTGCACAGTGTCTCTTTGTCAAGTAATACATGCTGAAAA
AAAAATAATACAGATGGGAAAATATTGTGCACTGTCAGATCTTGGAAACGGCCAAAGGATTTTTCCTCACCAATGTCTTGTCGATGACTTTCACATT
CTGGCACCCACTCAAAGCCATGGCCAACCGGAATTCTTCCTTTAGTATCTCAAGGACATCTTGAACACCTTTCTCCCCCTGGAAAGCTAAGCCCCAA
ATGATTGGTCTCCCCACAAACACAGCCTTGGCGCCAAGAGCCAGAGCTTTCAGAACATCAGTGCCTTTCCGCACACCCCCGTCCAGGAAGACTTCCA
CCTTCCCTTCCACGGCCTCCACAATTTCTGGCAGAACATCAATAGTGGCTGGCACCCCATCGAGTTGTCGAGCCCCATGATTCGACACCAAGATCCC
ATTCAAGCCATGTTTAACAGCCTCCCTGGCATCATCACCTCTCAAAATGCCCTTTGCAACAATTGGCAATGACGTCAGTCTTCTCAGCCATTTGATA
TCTTCCCAGCTGATAGATGGGTCTATCGCTTTAGCCACATATGCAGCAAGTCCACTGTCATCTCCAAAATTTTCCTCAGGAGAAAATGATAAAGTAC
TGGTTTCAAAATTTTTCATCCTGAGTTGTGGTGGCAGCTTGAATCTGTTACGTACATCATCAAGACGGTTGCCCAGGTAAGGTGTGTCCACTGTCAC
AAATATGGCCTTGTAGCCCGTCTTCTCTGCCTGCTGCACCAGCTTCTTGGTGACTTCTCGGTCCTTATAGATATACAGTTACAACCAACGAAGTGCC
TCAGGACCAGCTTCTGCCACTTCTTCAATTGAGGAGGTGGCCCAGGAACTCAACATCATGCCCGTTCCCAGGGACTGACAGGCTCGCACAGTGGCAA
GCTCGCCATCCACATGAGCCATGCGCTGCATGGCCGTGGCCCCCACGCATATTGGCATGCTGACCCTCTGTCCTAAAACAGAAGTCGACAGATCTGT
TTCAGCAACATTCCGGAGCATCCTTGGATACAGCTTCCATCTGGAAAATGCTGCAACATTATCGGCCAAAGTTTCTTCATCATTTGCTCCAGACCTA
TAATAGTCATATATAGACTTTGGAAGTACTGATTTAGCATGTTGTTCATAATCATTGATACAAATTAGCCGGGGGAGCATTTTCACAGGTTATTGTT
ATCCCAGATGGAGTTTTTTGGGTTTTTTTTAATGTATTGCTTTCTACATCCTCAC

HÌNH 11

(SEQ ID NO:8)
TTTCTGGACAAGAATTTTAAAGCTTTATTCACCATGGACCCCACAAAATATATACTTGACACTGAATGTGACTATAAATGAGAAGTGAGAAAATAA
AAATGATTCAAGGGGAATTAGGAAGTCAACACTTACTTTAAAATGGGAATGAAGAGACAGAGTTCAAAAATAAAATAACTTTGCATGGTCCCAAGT
GGACTAGACACATTCCTTTCAAACACAGTGAGTGCCACAAAACAGCCAGACATATTCAGACATGCGATATATAGCTAGAAATCCACCTTCAAAGAA
ATAGGGTGTTAAAAAATGAAAAGTCTCTAGAAAAATCACAAATTACCACCATCCGTTTCAATTCTATCGGGTGCTATTTTCTCAACACGGCAAATC
CAAACCCCATGTTTCTCTGGGCATTTCCGGCATTTCAAAGCCCAGCGCACACTGTAAGAGCCACTGTCTTAAGGAAATCTAAACAGAAGACAGGTT
AATAAACAGTGAGGTCAGTGTCTTTTACTTCGGCATGCTACCTCCAATCTCACCAGAGGATATCTTTTGTTCCCCCTCACTTTAGCCTGCCAGGGG
ATGACGTTGCCCAAACACATTTTCAATGTTTTCTTTTTAACAGTTAATATATTTCCAGGATGCAAGTCCATTTCTTTCTAGAAGGTTCCTAGGACA
CCCATTGAAAAGTCAAAAGCAATGAAGGAGAAGGGGTGGCTATTTTGTTGGAAAAGAACGACACCCTTTGTGTTGAAGTGGGGAGTTACAGTCTGT
GGTCACCCTCTGCACAGTGTCTCTTTGTCAAGTAATCCATGCTGGAAAAAAATAATACAGATGGGAAAATATTGTGCACTGTCAGATCTTGGAAAC
AGCCAAAGGATTTTTCCTCACCAATGTCTTGTCGATGACTTTCACATTCTGGCACCCACTCAGAGCCATGGCCAGCCGGAACTCTTCCTTCAGTAT
CTCGAGGACATCTTGAACACCTTTCTCCCCCTGGAAAGCCAAGCCCCAGATGATGGGTCTCCCCACAAAAACAGCTCTGGCTCCCAGGGCCAGAGC
TTTGAGAACATCGGTGCCTTTCCTGACTCCCCCATCCAGGAAGACTTCTACCTTCCCTTCCACAGCCTCAACGATCTCTGGCAGGGCATCAATAGT
AGCTGGCACCCCATCCAGTTGTCGTGCCCCATGATTCGACACTAAGATCCCATCCACACCATGTTTAACAGCTTCCTGGGCATCATCACCTCTCAA
AATTCCCTTTACAACAATGGGCAGTGAGGTCAACCGTCTGAGCCATTTAATATCATCCCAGCTGAGAGATGGGTCTATGGCTTGTGCCACATATTC
AGCAAGGCCACTGTTGTCTCCAAAATTCCCCTTAGGAGAAAATGCCAAATCGTTGGTTTCAAAGTTTTTCATCCTGAGCTGTGGTGGTAGCTTGAA
CCTGTTCCGCACATCATCGAAGCGATTTCCCAGGTAAGGGGTGTCCACAGTCACAAATATGGCCTTGTAACCCATCTGCTCAGCCCTCTTCACTAG
CTGACTGCTGACCTCACGATCTTTGTAGATGTAGAGTTGCATCCAGCGAAGTGCCTCCGGGCCAGCCTCTGCCACCTCTTCTATTGAGGAAGTGGC
CCAGGAACTCAACATCATGCCAGTTCCCATGGTCTGACAGGCTCGAACAGTGGCCAGCTCCCCATCCACATGAGCCATGCACTGCATAGCCGTAGC
CCCAACGCATATTGGCATGCTCACTCTCTGTCCTAAAACAGAAGTCGACAGGTCGATATCAGCAACGTTGCGCAGCATCCGTGGATAGAGCTTCCA
CTATAGTAGTCACAGAAGCCATGAGACTCTTTCTGCTCGGTTAGAACTTGGAGGTCACCAAGTCTACTATGCCTCAGAAACTCTAGAATTTCCAAA
GCCAGCAAGGCAGTAT

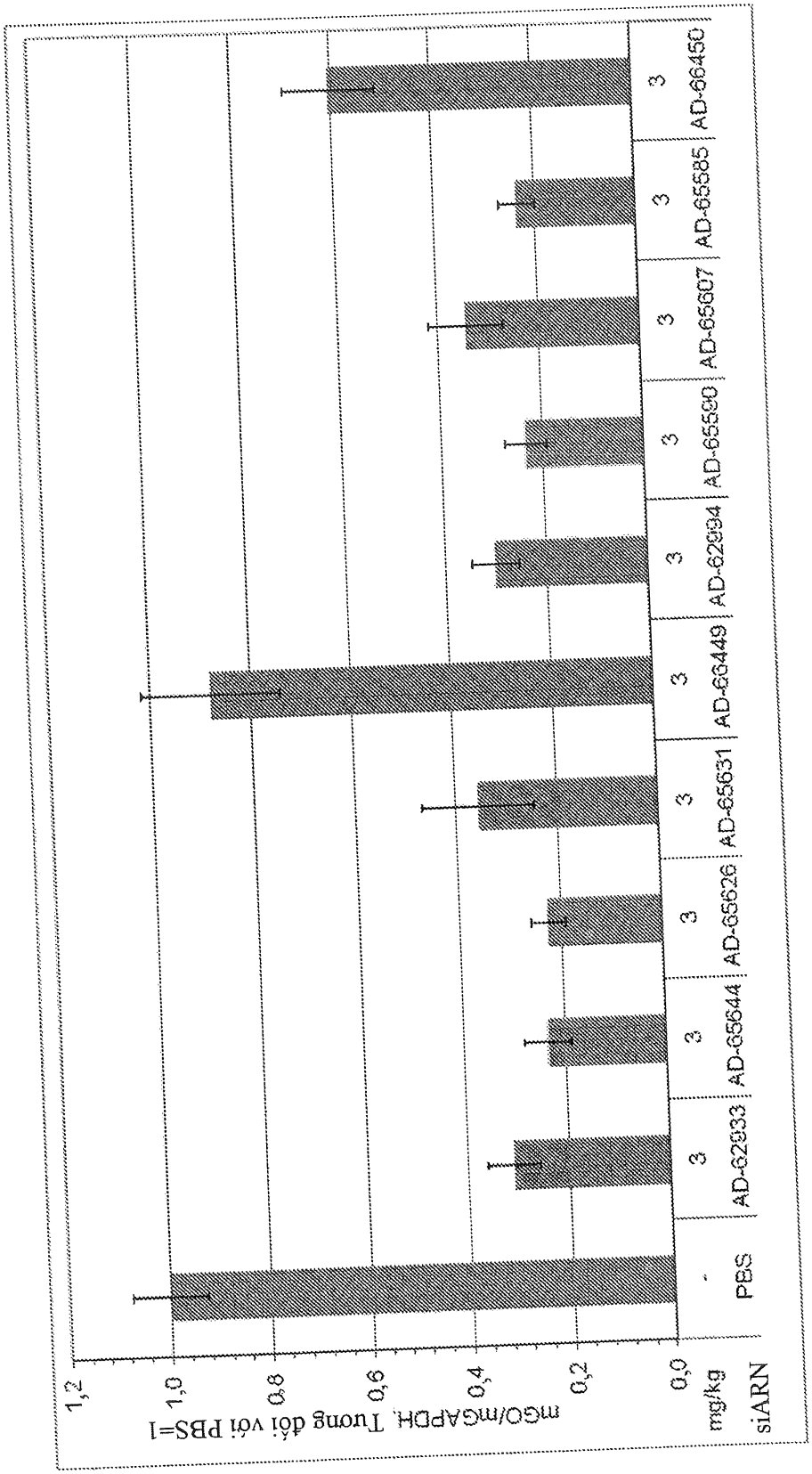
HÌNH 12

15/30

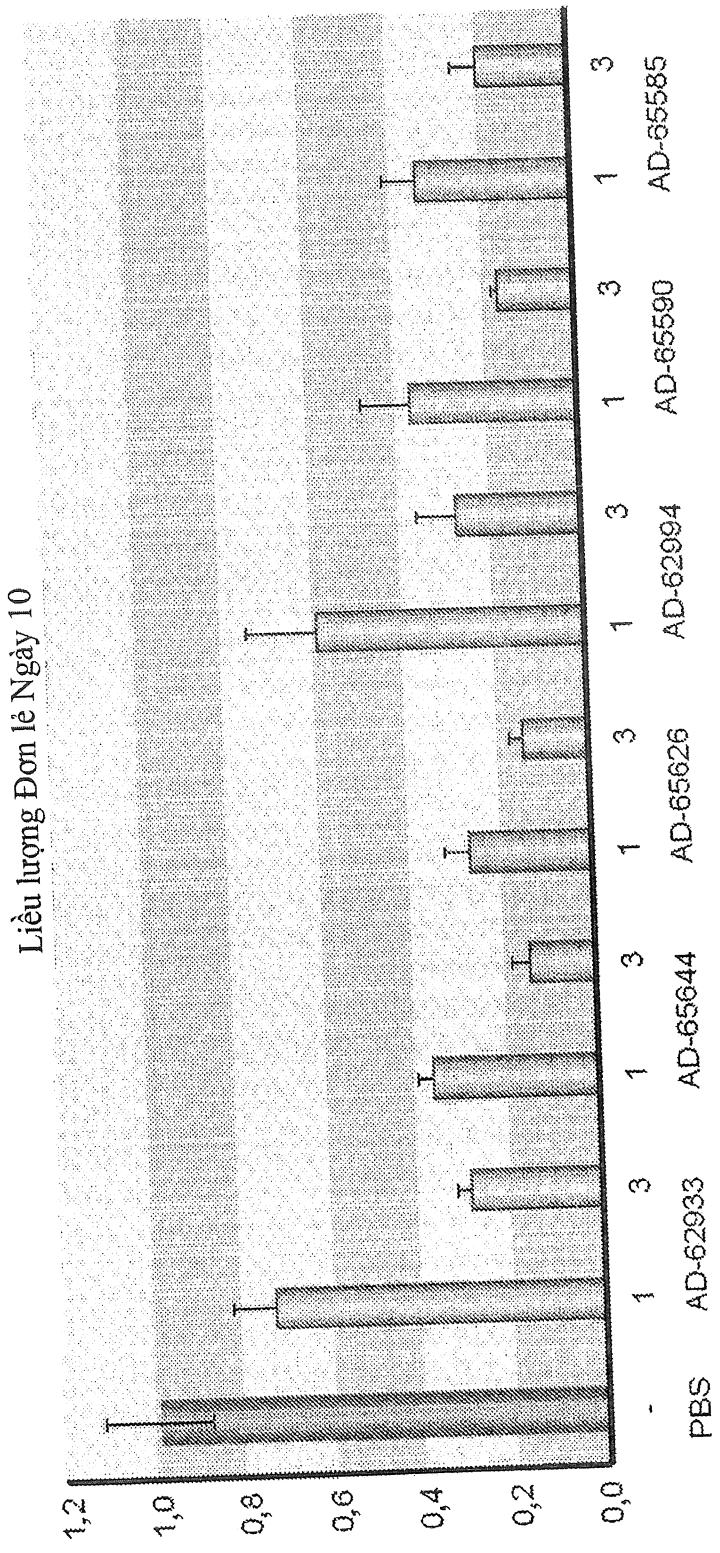

mGO/mGAPDH, Tương đối với PBS=1
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
mg/kg
siARN
-
PBS
3
AD-62989
3
AD-62994
3
AD-62933
3
AD-62935
3
AD-62940
3
AD-62941
3
AD-62944
3
AD-62965

HÌNH 13

16/30

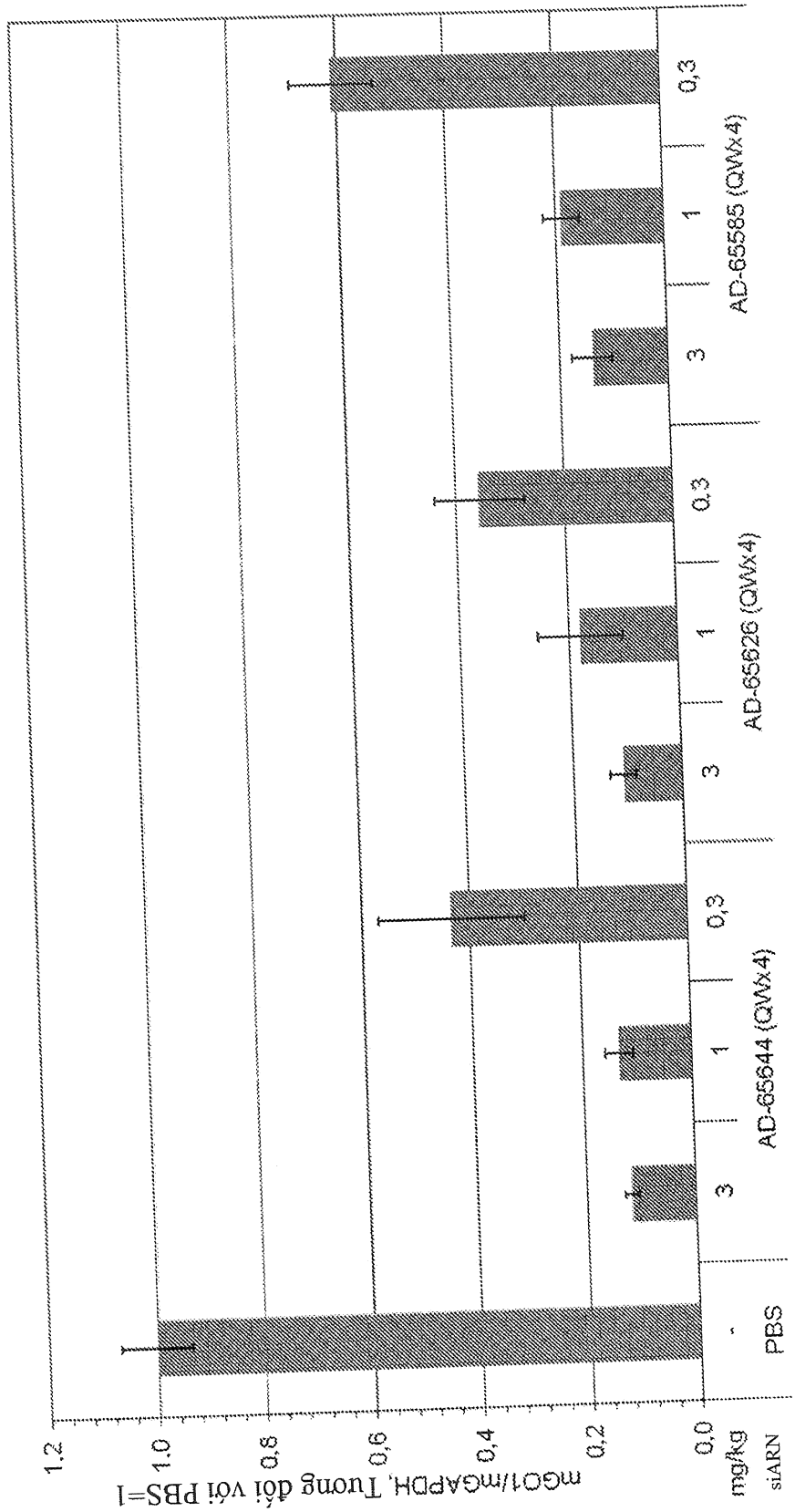

mGO/mGAPDH, Tương đối với PBS=1
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
mg/kg
siARN
-
PBS
3
AD-62933
3
AD-65644
3
AD-65626
3
AD-65631
3
AD-66449
3
AD-62994
3
AD-65560
3
AD-65607
3
AD-65585
3
AD-66450

HÌNH 14

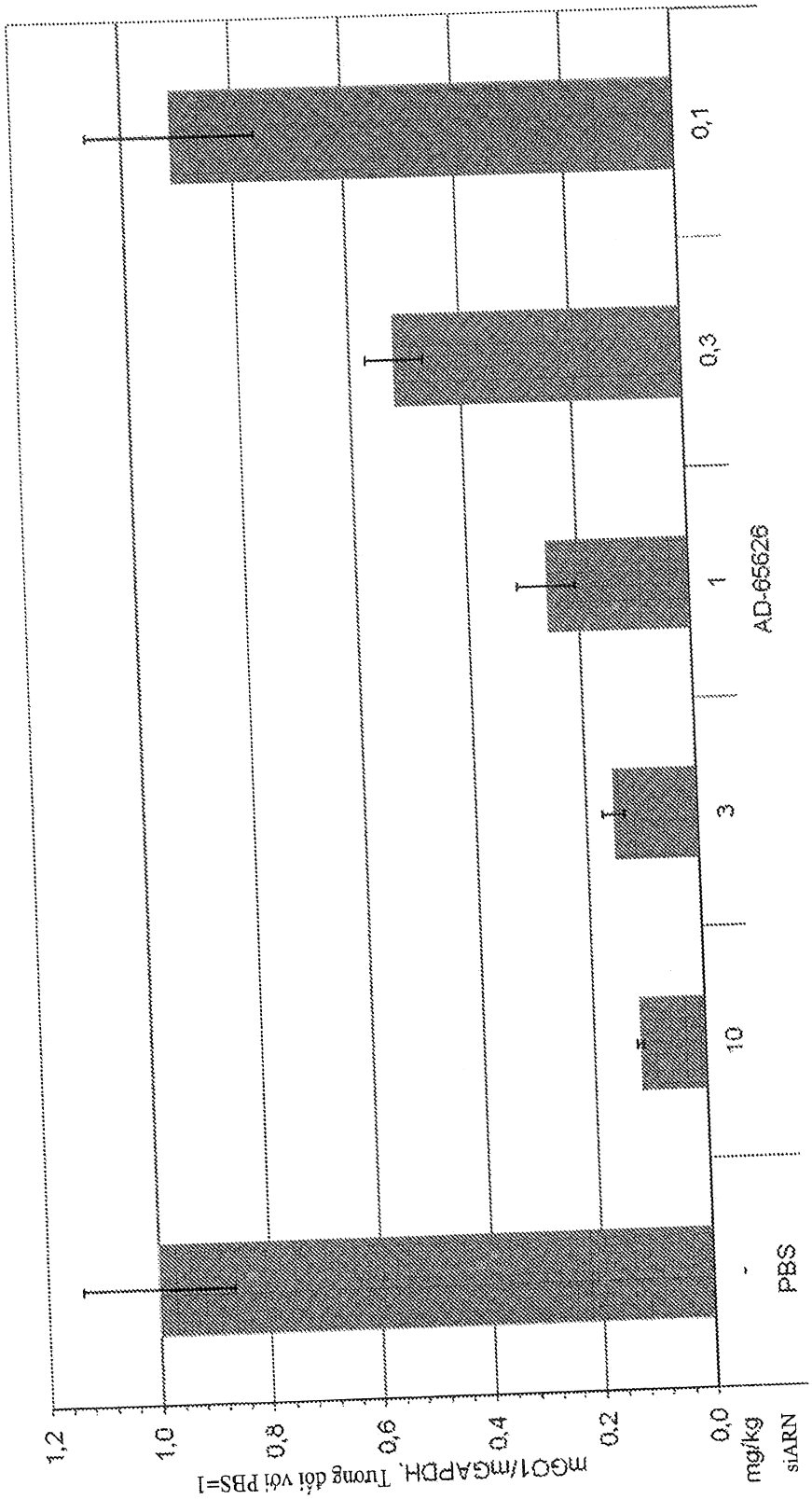

Liều lượng Đơn lẻ Ngày 10
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
-
PBS
1
3
AD-62933
1
3
AD-65644
1
3
AD-65626
1
3
AD-62994
1
3
AD-65590
1
3
AD-65585

HÌNH 15

18/30

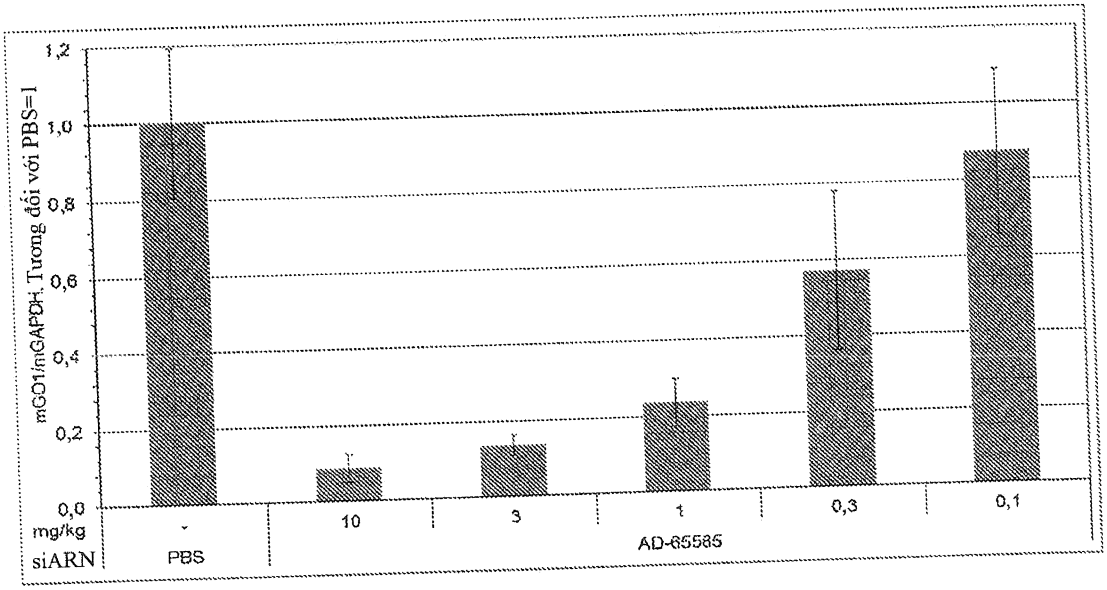

mGO1/mGAPDH, Tương đối với PBS=1
1.2
1.0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
mg/kg
siARN
-
PBS
3
1
0,3
AD-65644 (QWx4)
3
1
0,3
AD-65626 (QWx4)
3
1
0,3
AD-65585 (QWx4)

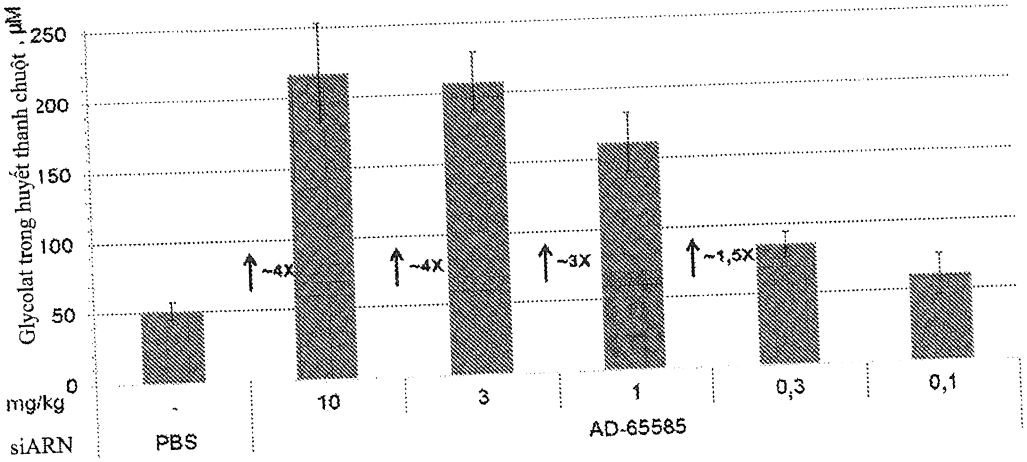
HÌNH 16


1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
mGO1/mGAPDH, Tương đối với PBS=1
mg/kg
siARN
-
PBS
10
3
1
0,3
0,1
AD-65626

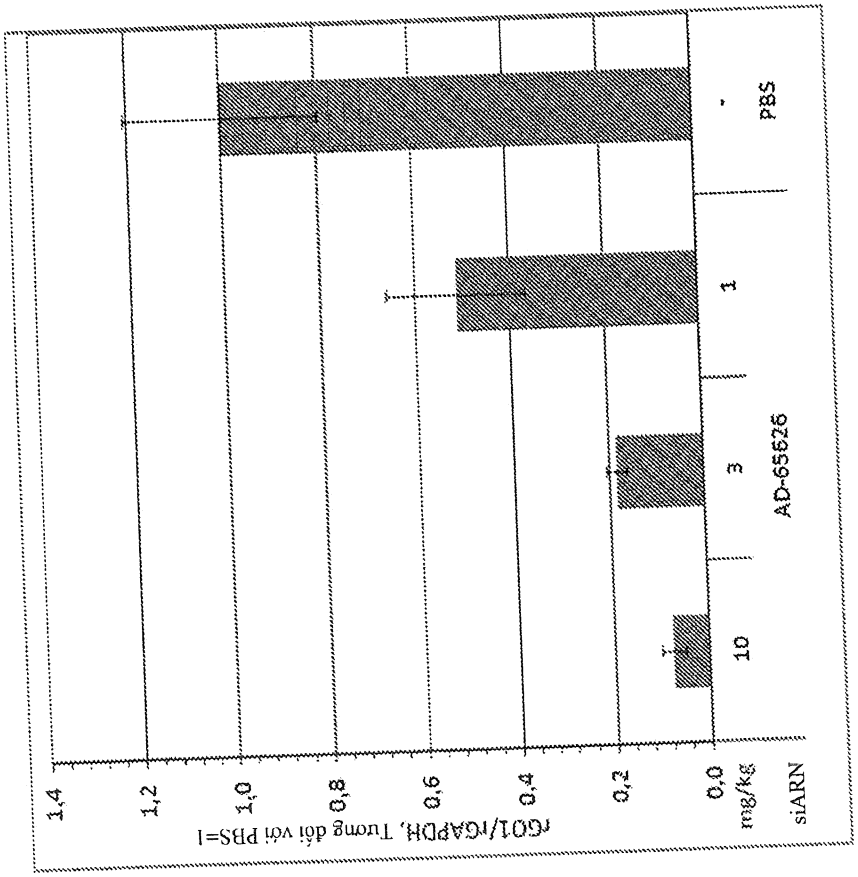
HÌNH 17

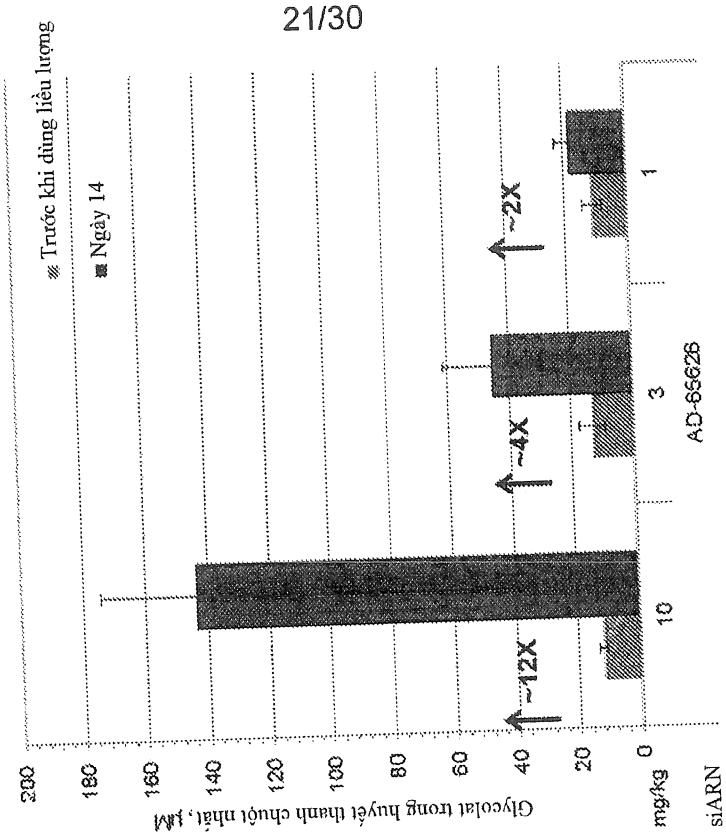
20/30


mGO1/mGAPDH, Tương đối với PBS=1
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
mg/kg
siARN
-
PBS
10
3
1
0,3
0,1
AD-65585

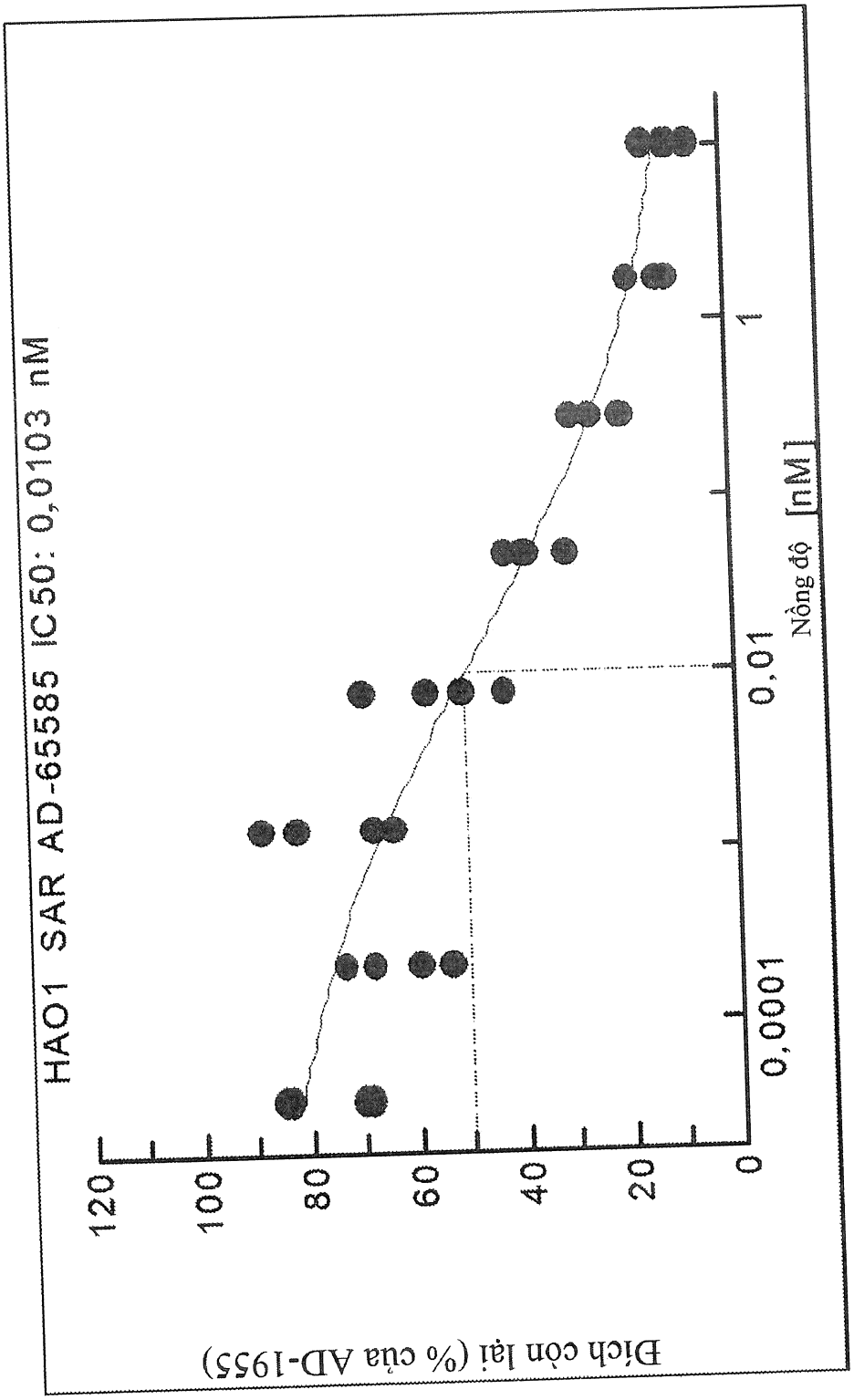

Glycolat trong huyết thanh chuột , µM
250
200
150
100
50
0
mg/kg
siARN
-
PBS
10
3
1
0,3
0,1
AD-65585
~4X
~4X
~3X
~1,5X

HÌNH 18

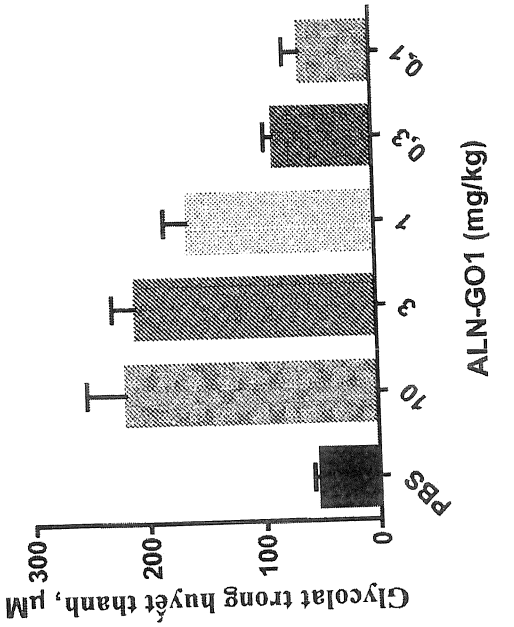

rG01/rGAPDH, Tương đối với PBS=1
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
mg/kg
siARN
10
3
1
-
AD-65626
PBS

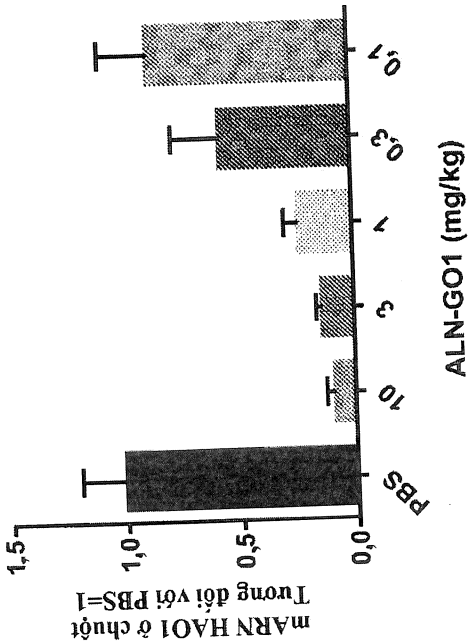

Trước khi dùng liều lượng
Ngày 14
Glycolat trong huyết thanh chuột nhắt, µM
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
mg/kg
siARN
~12X
~4X
~2X
10
3
1
AD-65626

HÌNH 19

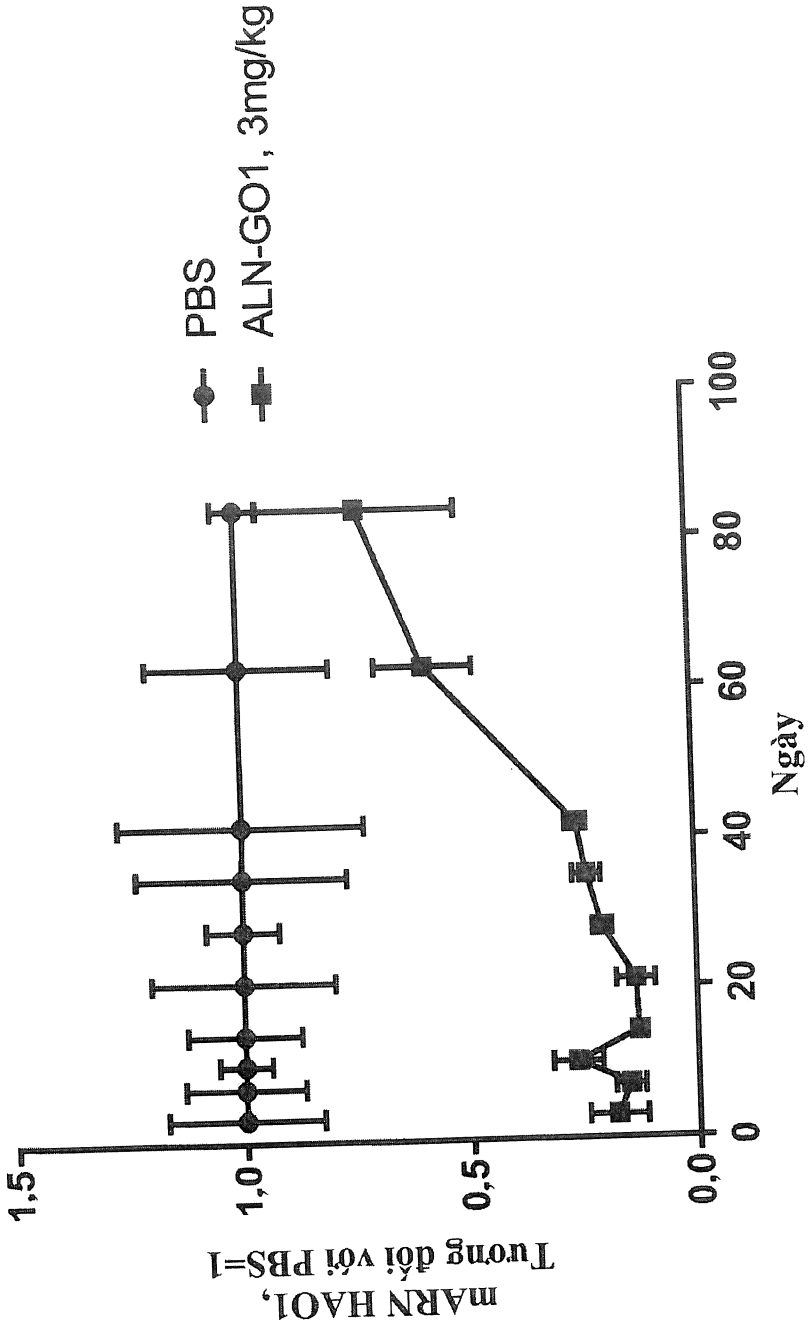

HAO1 SAR AD-65585 IC50: 0,0103 nM
Dịch còn lại (% của AD-1955)
120
100
80
60
40
20
0
0,0001
0,01
1
Nồng độ [nM]

HÌNH 20

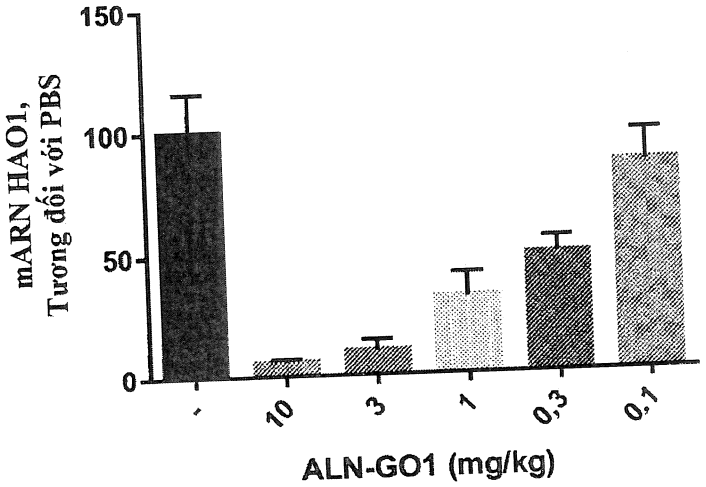

Glycolat trong huyết thanh, µM
300
200
100
0
PBS
10
3
1
0,3
0,1
ALN-GO1 (mg/kg)

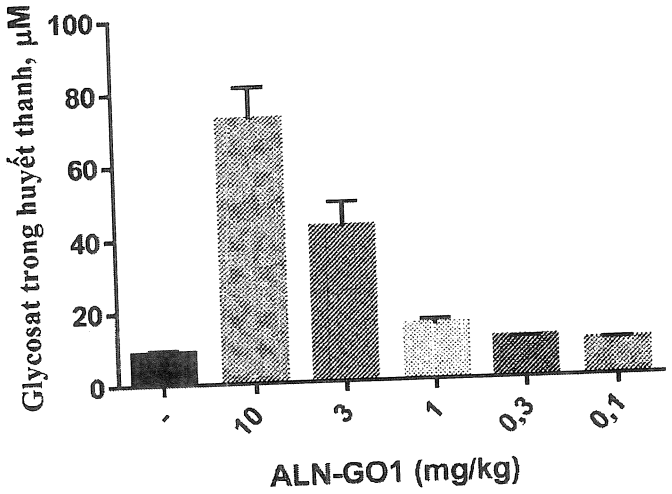

mARN HAO1 ở chuột
Tương đối với PBS=1
1,5
1,0
0,5
0,0
PBS
10
3
1
0,3
0,1
ALN-GO1 (mg/kg)

HÌNH 21

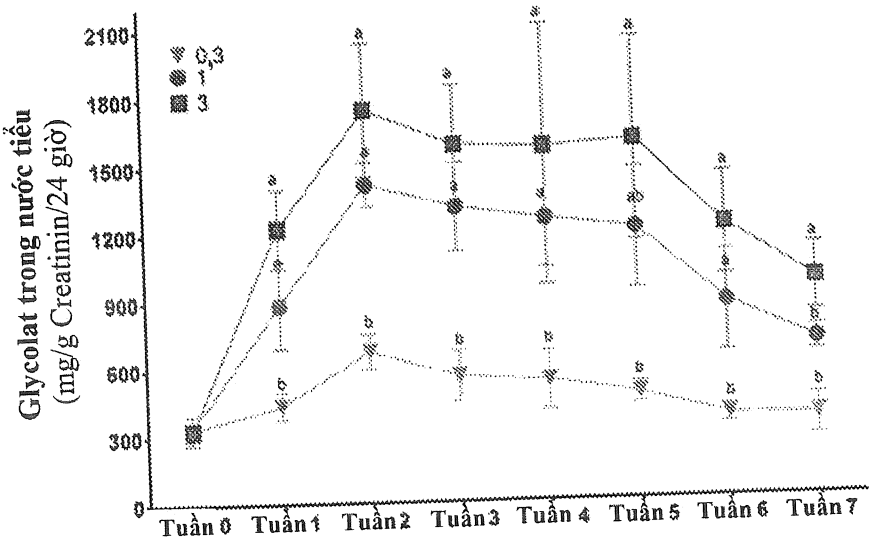

PBS
ALN-GO1, 3mg/kg
mARN HAO1,
Tương đối với PBS=1
1,5
1,0
0,5
0,0
0
20
40
60
80
100
Ngày

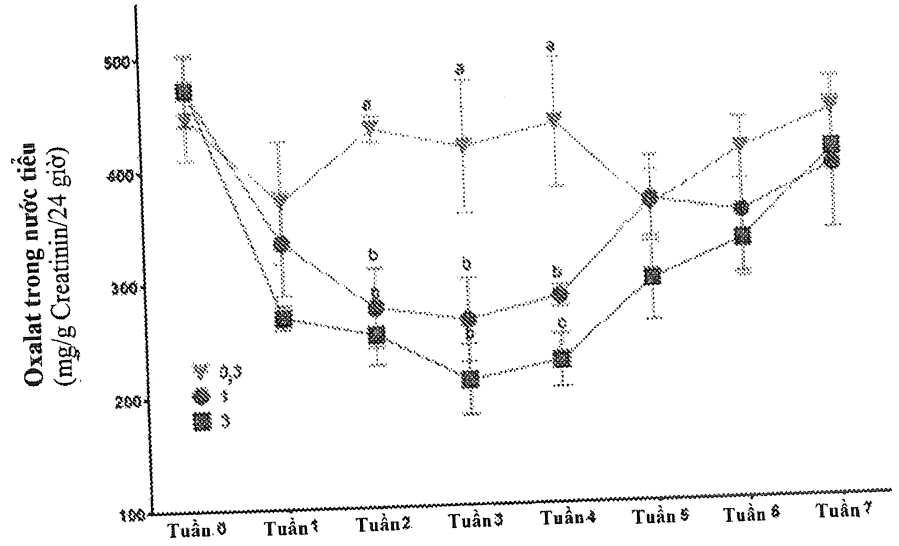
HÌNH 22


mARN HAO1,
Tương đối với PBS
150
100
50
0
-
10
3
1
0,3
0,1
ALN-GO1 (mg/kg)


Glycosat trong huyết thanh, µM
100
80
60
40
20
0
-
10
3
1
0,3
0,1
ALN-GO1 (mg/kg)

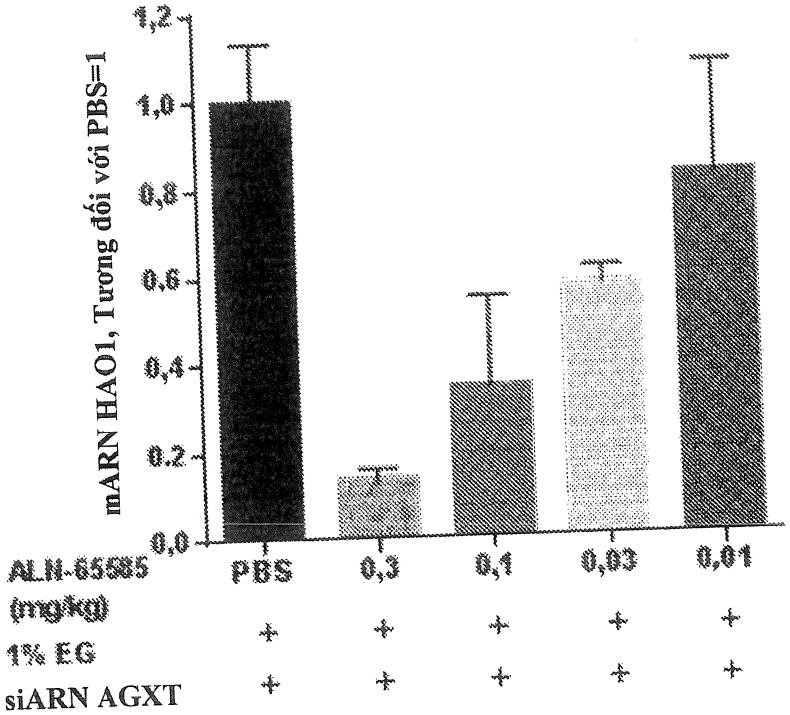
HÌNH 23

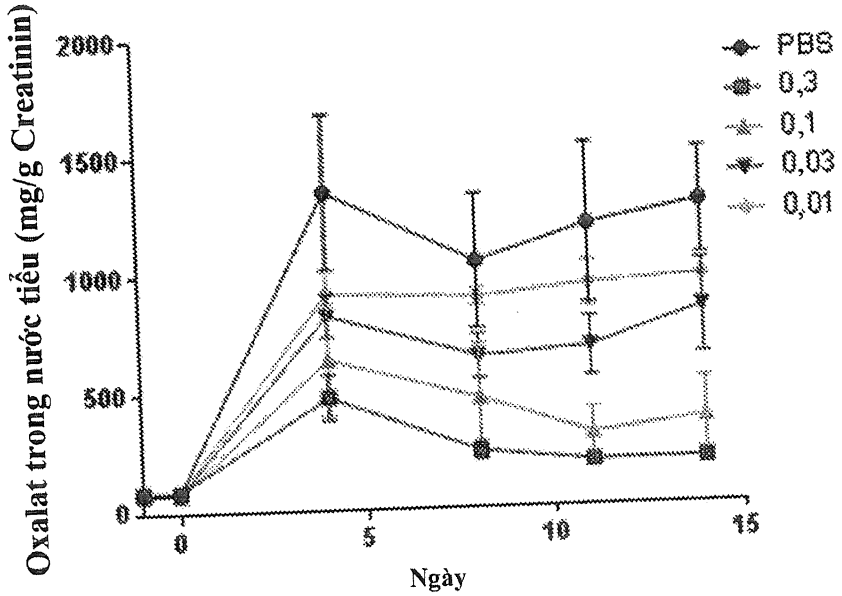

Glycolat trong nước tiểu
(mg/g Creatinin/24 giờ)
2100
1800
1500
1200
900
600
300
0
0,3
1
3
Tuần 0
Tuần 1
Tuần 2
Tuần 3
Tuần 4
Tuần 5
Tuần 6
Tuần 7


Oxalat trong nước tiểu
(mg/g Creatinin/24 giờ)
500
400
300
200
100
0,3
1
3
Tuần 0
Tuần 1
Tuần 2
Tuần 3
Tuần 4
Tuần 5
Tuần 6
Tuần 7

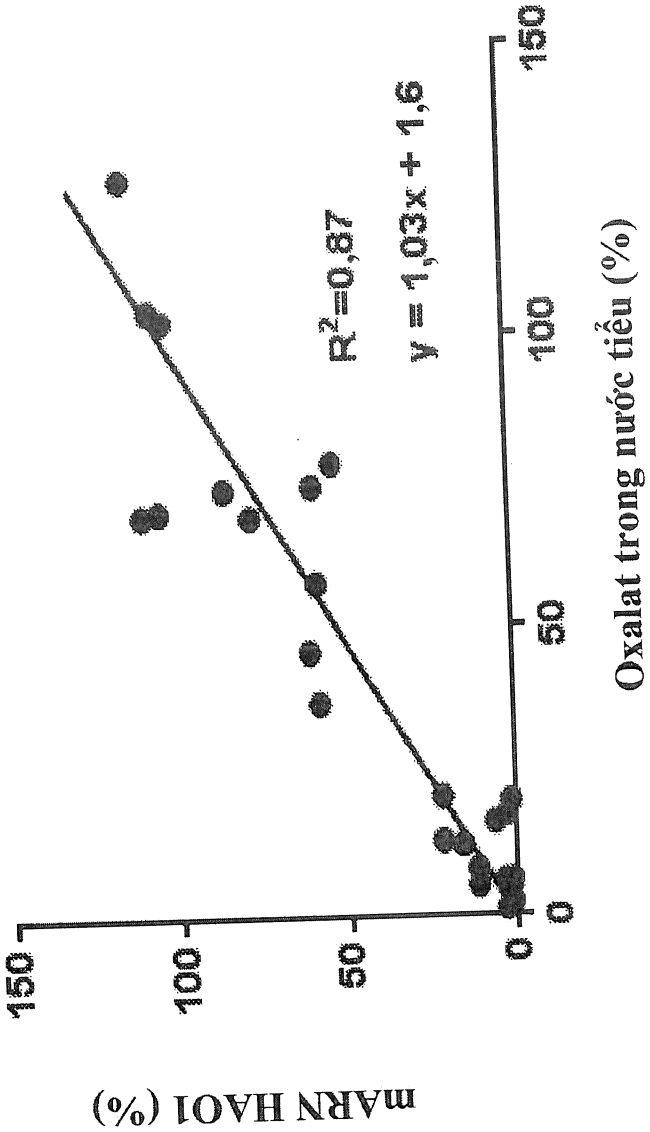
HÌNH 24

27/30

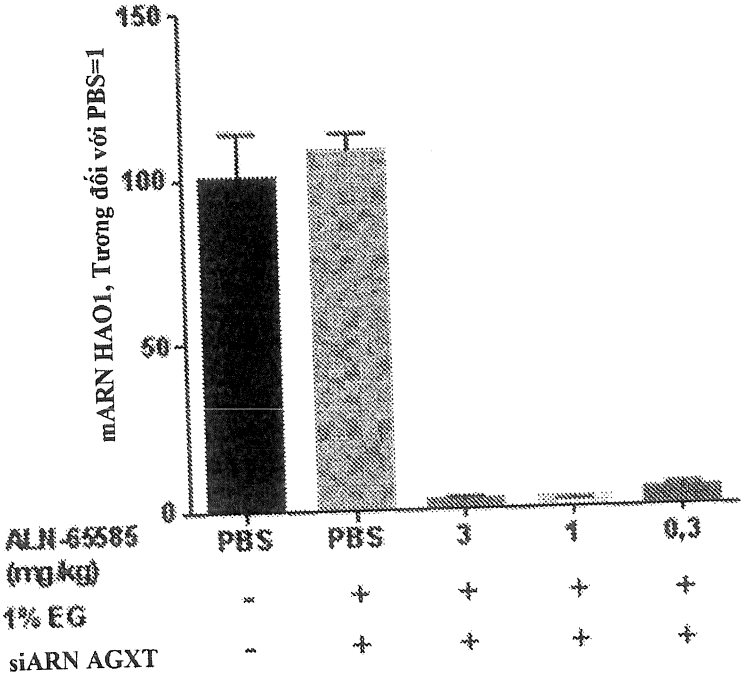


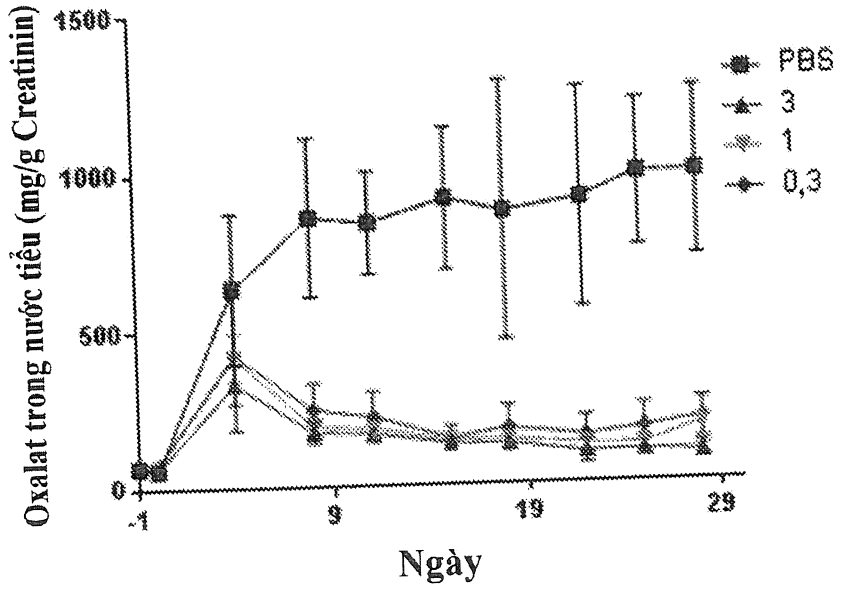


HÌNH 25A

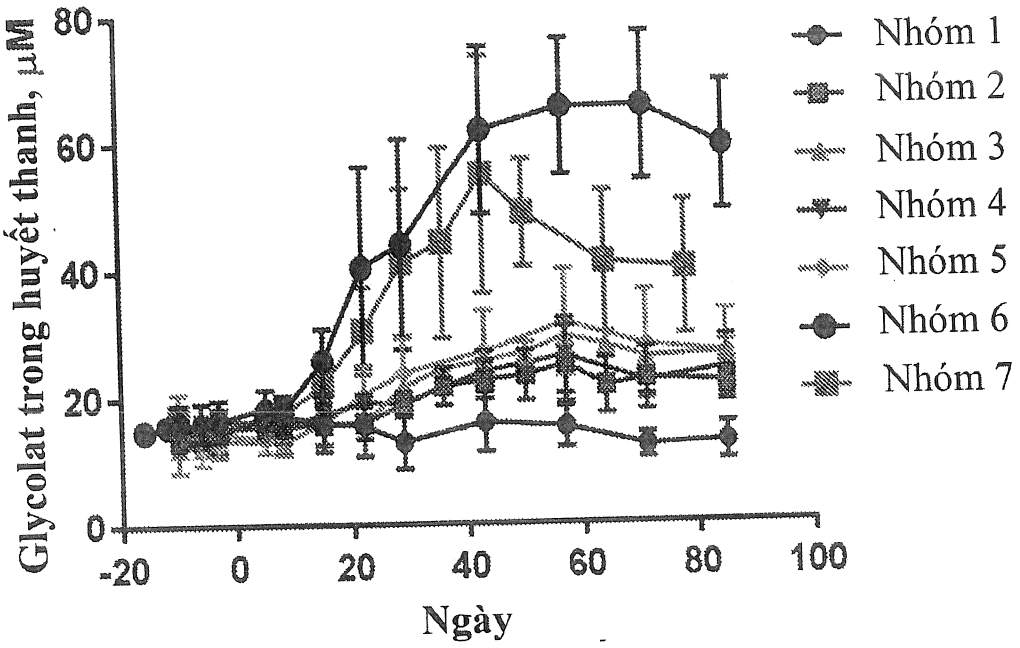

mARN HAO1 (%)
150
100
50
0
0
50
100
150
Oxalat trong nước tiểu (%)
R^2=0,87
y = 1,03x + 1,6

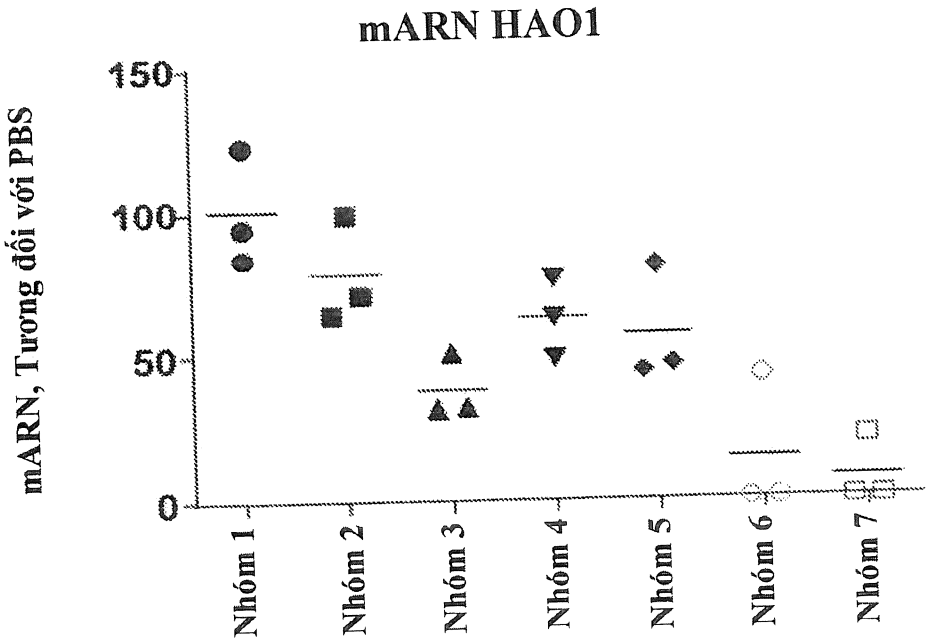
HÌNH 25B


mARN HAO1, Tương đối với PBS=1
150
100
50
0
ALN-65585 (mg/kg)
PBS
PBS
3
1
0,3
1% EG
siARN AGXT


Oxalat trong nước tiểu (mg/g Creatinin)
1500
1000
500
0
-1
9
19
29
Ngày
PBS
3
1
0,3

HÌNH 26


Glycolat trong huyết thanh, µM
80
60
40
20
0
-20
0
20
40
60
80
100
Ngày
Nhóm 1
Nhóm 2
Nhóm 3
Nhóm 4
Nhóm 5
Nhóm 6
Nhóm 7


mARN HAO1
mARN, Tương đối với PBS
150
100
50
0
Nhóm 1
Nhóm 2
Nhóm 3
Nhóm 4
Nhóm 5
Nhóm 6
Nhóm 7

HÌNH 27