



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ  
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ  
(51)<sup>2020.01</sup> C12N 15/113; A61K 31/713; A61P 31/20 (13) B



1-0053400

---

(21) 1-2021-01257 (22) 12/08/2019  
(86) PCT/US2019/046142 12/08/2019 (87) WO 2020/036862 20/02/2020  
(30) 62/718,314 13/08/2018 US  
(45) 25/11/2025 452 (43) 26/07/2021 400A  
(73) ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. (US)  
300 Third Street, 3rd Floor, Cambridge, Massachusetts 02142, United States of  
America  
(72) JADHAV, Vasant R. (US); MAIER, Martin A. (DE); MILSTEIN, Stuart (US);  
SCHLEGEL, Mark K. (US).  
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

---

(54) TÁC NHÂN DSARN VIRUT VIÊM GAN B (HBV) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA  
TÁC NHÂN NÀY

(21) 1-2021-01257

(57) Sáng chế đề cập đến tác nhân ARN sợi kép gắn đích bộ gen virus viêm gan B (HBV) và dược phẩm chứa tác nhân này để ức chế sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen HBV và để điều trị cho các đối tượng mắc tình trạng nhiễm HBV hoặc rối loạn do HBV, ví dụ, tình trạng tình trạng nhiễm virus viêm gan B mạn tính.

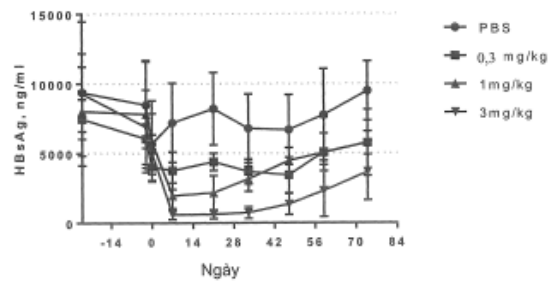


FIG. 2A

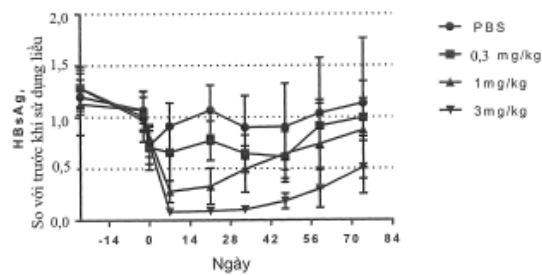


FIG. 2B

**Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến tác nhân ARN sợi kép gắn đích bộ gen virus viêm gan B (HBV) và được phẩm chứa tác nhân này để ức chế sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen HBV và điều trị cho các đối tượng mắc tình trạng nhiễm HBV hoặc rối loạn do HBV, ví dụ, tình trạng nhiễm virus viêm gan B mạn tính

**Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Hơn 400 triệu người trên toàn thế giới bị nhiễm HBV mạn tính, và do đó, có nguy cơ cao phát triển thành bệnh gan nghiêm trọng, như bệnh viêm gan mạn tính, bệnh xơ gan, bệnh suy gan, và bệnh ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) gây ra 600.000 ca tử vong theo ước tính mỗi năm.

Sự phát triển tự nhiên của tình trạng nhiễm HBV mạn tính bao gồm bốn pha liên tục: (1) pha “dung nạp miễn dịch” sớm, mức độ sao chép virus cao và tình trạng viêm gan tối thiểu; (2) pha phản ứng miễn dịch, tình trạng viêm gan đáng kể và aminotransferaza huyết thanh tăng; với một số bệnh nhân phát triển thành (3) pha ‘không sao chép’, sự chuyển hóa trong huyết thanh thành kháng HBe, mức virus trong máu thấp hoặc không phát hiện được (dưới 2000 IU/ml bằng thử nghiệm dựa trên PCR), và giảm tình trạng viêm gan; và (4) bệnh viêm gan B mạn tính âm tính với HBeAg, do sự phát sinh các đột biến virus cụ thể, ngăn cản sự sản sinh HBeAg nhưng không ngăn cản sự sao chép virus. Dạng viêm gan B mạn tính (CHB) này được đặc trưng bằng các mức HBV ADN huyết thanh và aminotransferaza (ALT và AST) huyết thanh thay đổi và bệnh gan tiến triển. Cần lưu ý rằng CHB có thể ở dạng CHB dương tính HBeAg hoặc âm tính HBeAg. Các nghiên cứu dọc trên các bệnh nhân mắc CHB chỉ ra rằng tỷ lệ mắc tích lũy 5 năm của bệnh xơ gan phát triển nằm trong khoảng từ 8 đến 20%. Tỷ lệ mắc tích lũy 5 năm của tình trạng mất bù gan là khoảng 20%. Tỷ lệ mắc HCC trên toàn thế giới đã gia tăng và hiện nay là bệnh ung thư đứng thứ năm về mức độ phổ biến. Tỷ lệ mắc hàng năm của HCC liên quan đến HBV là cao, nằm trong khoảng từ 2-5% khi bệnh xơ gan đã xác lập.

Mục tiêu chính của việc điều trị HBV là để ngăn chặn lâu dài sự sao chép HBV và cải thiện bệnh gan. Mục tiêu ngắn hạn quan trọng về mặt lâm sàng là đạt được sự

chuyển hóa huyết thanh HBeAg, sự bình thường hóa của ALT và AST huyết thanh, sự giảm viêm gan, và ngăn ngừa sự mất bù gan. Mục tiêu cuối cùng của việc điều trị là để đạt được đáp ứng bền vững để ngăn cản sự phát triển của bệnh xơ gan và ung thư gan để kéo dài sự sống. Tình trạng nhiễm HBV không thể được loại bỏ hoàn toàn do sự bền vững của dạng đặc biệt của ADN vòng khép kín đồng hóa trị của virus (cccHBV ADN) trong nhân của tế bào gan bị nhiễm. Tuy nhiên, sự thải trừ HBsAg huyết thanh do điều trị là dấu hiệu kết thúc tình trạng nhiễm HBV mạn tính và có liên quan đến kết quả lâu dài tốt nhất.

Các phương pháp điều trị HBV chuẩn hiện nay bao gồm các liệu pháp miễn dịch dựa trên interferon hoặc thymosin  $\alpha 1$  và ngăn chặn sự sản sinh virus bằng cách ức chế HBV polymeraza. Các chất ức chế HBV polymeraza là hữu hiệu trong việc làm giảm sự sản sinh virus nhưng có rất ít hoặc không có tác dụng trong việc làm giảm nhanh HBsAg hoặc có thể làm giảm từ từ HBsAg với việc điều trị lâu dài ở số lượng bệnh nhân giới hạn (như trong trường hợp với tenofovir disoproxil fumarat). Liệu pháp miễn dịch dựa trên interferon có thể đạt được sự giảm cả về sự sản sinh virus và loại bỏ sớm HBsAg ra khỏi máu, nhưng chỉ ở tỷ lệ phần trăm nhỏ các đối tượng được điều trị. Vai trò được chấp nhận chung của HBsAg trong máu là cô lập các kháng thể kháng HBsAg và cho phép các hạt virus gây nhiễm thoát khỏi sự phát hiện miễn dịch, đây có thể là một trong những nguyên nhân dẫn đến sự nhiễm HBV vẫn là một tình trạng mãn tính. Ngoài ra HBsAg, HBeAg, và HBcAg đều có các đặc điểm ức chế miễn dịch và sự tồn tại dai dẳng của các protein virus này trong máu của bệnh nhân sau khi sử dụng phương pháp điều trị bất kỳ trong số các phương pháp sẵn có hiện nay cho HBV có thể có tác động đáng kể đến việc ngăn chặn bệnh nhân đạt được sự kiểm soát miễn dịch tình trạng nhiễm HBV của họ.

Mặc dù ba protein HBV chính (HBsAg, HBeAg, và HBcAg) đều có các đặc điểm ức chế miễn dịch, HBsAg chiếm đại đa số các protein HBV trong hệ tuần hoàn của đối tượng bị nhiễm HBV. Ngoài ra, mặc dù sự loại bỏ (nhờ chuyển hóa huyết thanh) HBeAg hoặc sự giảm virus trong huyết thanh máu không tương quan với sự phát triển khả năng kiểm soát kéo dài tình trạng nhiễm HBV không điều trị, sự loại bỏ HBsAg huyết thanh ra khỏi máu (và sự chuyển hóa huyết thanh) ở tình trạng nhiễm HBV là dấu hiệu tiên lượng được công nhận của đáp ứng kháng virus trong việc điều trị, sẽ dẫn đến khả năng kiểm soát được tình trạng nhiễm HBV không điều trị (mặc dù điều này chỉ xuất hiện ở

tỷ lệ nhỏ các bệnh nhân nhận được liệu pháp miễn dịch). Do đó, mặc dù sự giảm cả ba protein HBV chính (HBsAg, HBeAg, và HBcAg) có thể dẫn đến việc loại bỏ tối ưu tác dụng ức chế, việc loại bỏ một mình HBsAg có thể là đủ và chỉ cần loại bỏ một mình nó có thể làm giảm phần lớn tác dụng ức chế chức năng miễn dịch của virus ở bệnh nhân nhiễm HBV.

Do đó, vì chưa có phác đồ điều trị nào hiện nay có thể phục hồi sự kiểm soát miễn dịch đối với HBV ở tỷ lệ lớn bệnh nhân, có nhu cầu về phương pháp điều trị hữu hiệu chống lại tình trạng nhiễm HBV mà có thể ức chế sự sao chép virus cũng như phục hồi khả năng kiểm soát miễn dịch ở phần lớn các bệnh nhân. Do đó, trong lĩnh vực này có nhu cầu về các liệu pháp thay thế và các liệu pháp kết hợp cho các bệnh nhân bị nhiễm HBV hoặc mắc bệnh do HBV.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các chế phẩm chứa tác nhân axit ribonucleic chuỗi kép (dsARN), chế phẩm này tác động đến sự cắt các sản phẩm phiên mã ARN của gen virus viêm gan B (HBV) gây ra bởi phức hợp tắt gen được cảm ứng bởi ARN (RNA-induced silencing complex: (RISC)). Gen HBV có thể nằm trong tế bào, ví dụ, tế bào của đối tượng, như người.

Sáng chế cũng mô tả các phương pháp và liệu pháp điều trị cho bệnh nhân mắc rối loạn mà có thể có lợi nếu ức chế sự biểu hiện của gen HBV, ví dụ, tình trạng nhiễm HBV hoặc bệnh do HBV, như tình trạng nhiễm virus viêm gan B mạn tính (CHB), bằng cách sử dụng chế phẩm chứa tác nhân dsARN mà tác động đến sự cắt các sản phẩm phiên mã ARN của gen HBV gây ra bởi phức hợp tắt gen được cảm ứng bởi ARN để ức chế sự biểu hiện của gen HBV.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tác nhân dsARN để ức chế sự biểu hiện HBV. Ví dụ, sáng chế đề xuất tác nhân dsARN chứa chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa tạo thành vùng chuỗi kép, trong đó chuỗi đối nghĩa chứa trình tự nucleotit biến đổi như được chỉ ra trong:

5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:16),

5'-usGfsuga(Agn)gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:18),

5'-usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:20),

5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:23),

5'-usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:24),

5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu-3' (SEQ ID NO:25), hoặc

5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:28),

trong đó a, c, g, và u lần lượt là 2'-O-metyladenosin-3'-phosphat, 2'-O-metylxytidin-3'-phosphat, 2'-O-metylguanosin-3'-phosphat, và 2'-O-metyluridin-3'-phosphat;

Af, Cf, Gf, và Uf lần lượt là 2'-floadenosin-3'-phosphat, 2'-floxytidin-3'-phosphat, 2'-floguanosin-3'-phosphat, và 2'-flouridin-3'-phosphat;

dA, dC, dG, và dT lần lượt là 2'-deoxyadenosin-3'-phosphat, 2'-deoxyxytidin-3'-phosphat, 2'-deoxyguanosin-3'-phosphat, và 2'-deoxythymidin-3'-phosphat;

(Agn) là adenosin-axit glycol nucleic (GNA); và

s là liên kết phosphorothioat.

Theo một số phương án, chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit biến đổi 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29),

trong đó a, c, g, và u là 2'-O-metyladenosin-3'-phosphat, 2'-O-metylxytidin-3'-phosphat, 2'-O-metylguanosin-3'-phosphat, và 2'-O-metyluridin-3'-phosphat, tương ứng;

Af, Cf, Gf, và Uf là 2'-floadenosin-3'-phosphat, 2'-floxytidin-3'-phosphat, 2'-floguanosin-3'-phosphat, và 2'-flouridin-3'-phosphat, tương ứng; và

s là liên kết phosphorothioat.

Theo một số phương án, chuỗi đối nghĩa và chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit biến đổi như được chỉ ra trong:

(a) 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:16) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(b) 5'-usGfsuga(Agn)gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:18) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(c) 5'-usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:20) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(d) 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:23) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(e) 5'-usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:24) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(f) 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu-3' (SEQ ID NO:25) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29); hoặc

(g) 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:28) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

trong đó a, c, g, và u lần lượt là 2'-O-methyladenosin-3'-phosphat, 2'-O-methylxytidin-3'-phosphat, 2'-O-methylguanosin-3'-phosphat, và 2'-O-methyluridin-3'-phosphat;

Af, Cf, Gf, và Uf lần lượt là 2'-floadenosin-3'-phosphat, 2'-floxytidin-3'-phosphat, 2'-floguanosin-3'-phosphat, và 2'-flouridin-3'-phosphat;

dA, dC, dG, và dT lần lượt là 2'-deoxyadenosin-3'-phosphat, 2'-deoxyxytidin-3'-phosphat, 2'-deoxyguanosin-3'-phosphat, và 2'-deoxythymidin-3'-phosphat;

(Agn) là adenosin-axit glycol nucleic (GNA); và

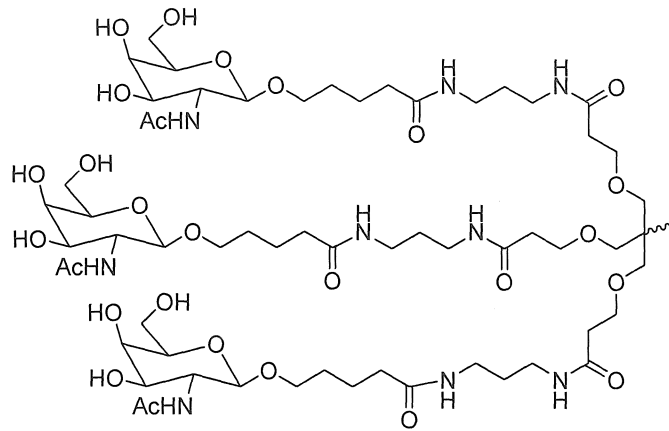
s là liên kết phosphorothioat.

Theo một số phương án, ít nhất một chuỗi của tác nhân dsARN chứa phần nhô ra 3' gồm ít nhất 1 nucleotit. Theo một số phương án, ít nhất một chuỗi của tác nhân dsARN chứa phần nhô ra 3' gồm 2 nucleotit.

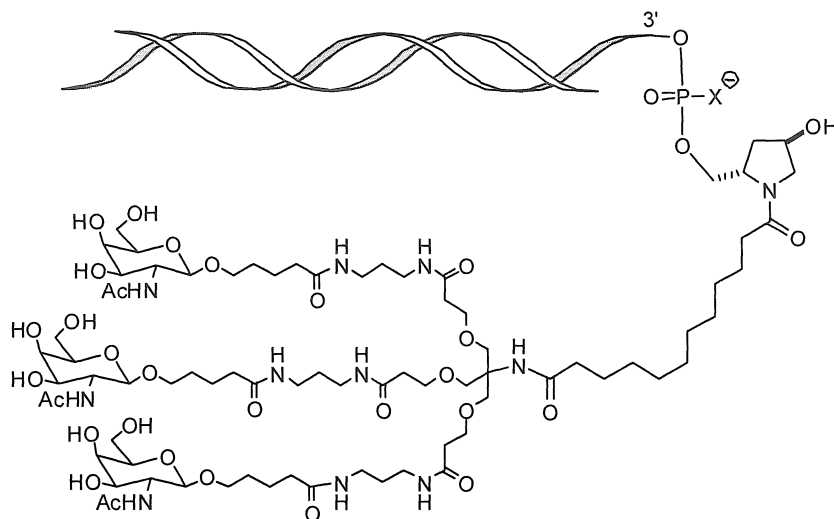
Theo một số phương án, vùng chuỗi kép của tác nhân dsARN dài 19-21 cặp nucleotit.

Theo một số phương án, mỗi chuỗi của tác nhân dsARN độc lập chứa 19-23 nucleotit. Theo một số phương án, mỗi chuỗi của tác nhân dsARN độc lập chứa 19-21 nucleotit.

Theo một số phương án, tác nhân dsARN còn bao gồm phối tử. Theo một số phương án, phối tử này được liên hợp với đầu 3' của chuỗi có nghĩa của tác nhân dsARN. Theo một số phương án, phối tử này là dẫn xuất N-axetylgalactosamin (GalNAc). Theo một số phương án, phối tử này là



Theo một số phương án, tác nhân dsARN được liên hợp với phối tử này như được thể hiện trong sơ đồ dưới đây



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

Theo một số phương án, chuỗi đối nghĩa gồm trình tự nucleotit biến đổi như được chỉ ra trong:

- 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:16),
- 5'-usGfsuga(Agn)gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:18),
- 5'-usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:20),
- 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:23),
- 5'-usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:24),
- 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu-3' (SEQ ID NO:25), hoặc
- 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:28),

trong đó a, c, g, và u lần lượt là 2'-O-metyladenosin-3'-phosphat, 2'-O-metylxytidin-3'-phosphat, 2'-O-metylguanosin-3'-phosphat, và 2'-O-metyluridin-3'-phosphat;

Af, Cf, Gf, và Uf lần lượt là 2'-floadenosin-3'-phosphat, 2'-floxytidin-3'-phosphat, 2'-floguanosin-3'-phosphat, và 2'-flouridin-3'-phosphat;

dA, dC, dG, và dT lần lượt là 2'-deoxyadenosin-3'-phosphat, 2'-deoxyxytidin-3'-phosphat, 2'-deoxyguanosin-3'-phosphat, và 2'-deoxythymidin-3'-phosphat;

(Agn) là adenosin-axit glycol nucleic (GNA); và

s là liên kết phosphorothioat.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tác nhân dsARN, trong đó chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa gồm các trình tự nucleotit biến đổi như được chỉ ra trong:

(a) 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:16) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(b) 5'-usGfsuga(Agn)gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:18) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(c) 5'-usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:20) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(d) 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:23) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(e) 5'-usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:24) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(f) 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu-3' (SEQ ID NO:25) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29); hoặc

(g) 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:28) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

trong đó a, c, g, và u lần lượt là 2'-O-metyladenosin-3'-phosphat, 2'-O-metylxytidin-3'-phosphat, 2'-O-metylguanosin-3'-phosphat, và 2'-O-metyluridin-3'-phosphat;

Af, Cf, Gf, và Uf lần lượt là 2'-floadenosin-3'-phosphat, 2'-floxytidin-3'-phosphat, 2'-floguanosin-3'-phosphat, và 2'-flouridin-3'-phosphat;

dA, dC, dG, và dT lần lượt là 2'-deoxyadenosin-3'-phosphat, 2'-deoxyxytidin-3'-phosphat, 2'-deoxyguanosin-3'-phosphat, và 2'-deoxythymidin-3'-phosphat;

(Agn) là adenosin-axit glycol nucleic (GNA);

s là liên kết phosphorothioat; và

đầu 3' của chuỗi có nghĩa được liên hợp với phối tử N-[tris(GalNAc-alkyl)-amidodecanoyl]-4-hydroxyprolinol (L96).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất tế bào chứa tác nhân dsARN như được mô tả ở đây.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa tác nhân dsARN được mô tả ở đây và tá được.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp ức chế sự biểu hiện gen virus viêm gan B (HBV) trong tế bào, phương pháp này bao gồm bước cho tế bào tiếp xúc với tác nhân dsARN hoặc được phẩm như được mô tả ở đây, nhờ đó ức chế sự biểu hiện của gen HBV trong tế bào. Theo một số phương án, tế bào này ở trong đối tượng. Trong một số phương án, đối tượng này là người. Theo một số phương án, đối tượng này mắc bệnh do HBV. Theo một số phương án, tế bào này là *in vitro*. Theo một số phương án, sự biểu hiện gen HBV bị ức chế ít nhất là 80%, 90%, 95%, hoặc 98%, hoặc đến thấp hơn mức phát hiện được của phương pháp thử nghiệm.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp ức chế sự sao chép của virus viêm gan B (HBV) trong tế bào, phương pháp này bao gồm bước cho tế bào tiếp xúc với tác nhân dsARN hoặc được phẩm như được mô tả ở đây, nhờ đó ức chế sự sao chép của HBV trong tế bào. Theo một số phương án, tế bào này ở trong đối tượng. Trong một số phương án, đối tượng này là người. Theo một số phương án, đối tượng này mắc bệnh do HBV. Theo một số phương án, tế bào này là *in vitro*. Theo một số phương án, sự sao chép HBV trong tế bào bị ức chế ít nhất là 80%, 90%, 95%, hoặc 98%, hoặc đến thấp hơn mức phát hiện được của phương pháp thử nghiệm.

Còn được đề xuất ở đây là phương pháp làm giảm mức nồng độ kháng nguyên virus viêm gan B (HBV) ở đối tượng bị nhiễm HBV, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu điều trị của tác nhân dsARN hoặc được phẩm như được mô tả ở đây, nhờ đó làm giảm mức nồng độ của kháng nguyên HBV ở đối tượng này. Theo một số phương án, kháng nguyên HBV là HBsAg. Theo một số phương án, kháng nguyên HBV là HBeAg. Theo một số phương án, kháng nguyên HBV được đo trong huyết thanh của đối tượng. Theo một số phương án, đối tượng này dương tính với HBeAg. Theo một số phương án, đối tượng này âm tính với HBeAg. Theo một số

phương án, mức nồng độ kháng nguyên HBV được làm giảm trong huyết thanh ít nhất là 1 log10, ít nhất là 2 log10, ít nhất là 3 log10, hoặc ít nhất là 4 log10; hoặc đến thấp hơn mức phát hiện được của thử nghiệm.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp làm giảm tải lượng virus của virus viêm gan B (HBV) ở đối tượng bị nhiễm HBV, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu điều trị của tác nhân dsARN hoặc được phẩm như được mô tả ở đây, nhờ đó làm giảm tải lượng virus của HBV ở đối tượng này. Theo một số phương án, tải lượng virus HBV được đo trong huyết thanh của đối tượng. Theo một số phương án, đối tượng này dương tính với HBeAg. Theo một số phương án, đối tượng này âm tính với HBeAg. Theo một số phương án, tải lượng virus HBV được làm giảm trong huyết thanh ít nhất là 1 log10, ít nhất là 2 log10, ít nhất là 3 log10, hoặc ít nhất là 4 log10; hoặc đến thấp hơn mức phát hiện được của thử nghiệm.

Còn được đề cập ở đây là phương pháp điều trị cho đối tượng mắc bệnh nhiễm virus viêm gan B (HBV) hoặc rối loạn do HBV, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu điều trị của tác nhân dsARN hoặc được phẩm như được mô tả ở đây, nhờ đó điều trị được cho đối tượng này. Theo một số phương án, đối tượng này dương tính với HBeAg. Theo một số phương án, đối tượng này âm tính với HBeAg. Theo một số phương án, rối loạn do HBV là bệnh viêm gan mạn tính và đối tượng này dương tính với HBeAg. Theo một số phương án, rối loạn do HBV là bệnh viêm gan mạn tính và đối tượng này âm tính với HBeAg.

Theo một số phương án của các phương pháp được đề cập trên đây, tác nhân dsARN được sử dụng cho đối tượng ở liều là 0,01 mg/kg đến 10 mg/kg, 0,5 mg/kg đến 50 mg/kg, hoặc 3 mg/kg đến 10 mg/kg. Theo một số phương án của các phương pháp này, tác nhân dsARN được sử dụng cho đối tượng ở liều là 3 mg/kg đến 10 mg/kg. Theo một số phương án của các phương pháp này, tác nhân dsARN được sử dụng cho đối tượng ở liều cố định là 50 mg đến 200 mg.

Theo một số phương án của các phương pháp được đề cập trên đây, tác nhân dsARN được sử dụng cho đối tượng theo đường dưới da.

Theo một số phương án của các phương pháp được đề cập trên đây, tác nhân dsARN được sử dụng cho đối tượng với hai hoặc nhiều liều.

Theo một số phương án của các phương pháp được đề cập trên đây, tác nhân dsARN được sử dụng cho đối tượng một lần mỗi tháng, một lần mỗi hai tháng, hoặc

một lần mỗi ba tháng. Theo một số phương án của các phương pháp này, tác nhân dsARN được sử dụng cho đối tượng không nhiều hơn một lần mỗi tháng.

Theo một số phương án của các phương pháp được đề cập trên đây, phương pháp này còn bao gồm bước sử dụng cho đối tượng được chất bổ sung, *ví dụ*, một hoặc nhiều được chất bổ sung. Được chất bổ sung có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất chống virus, chất ức chế transcriptaza đảo, chất kích thích miễn dịch, vacxin điều trị, chất ức chế sự xâm nhập của virus, oligonucleotit ức chế sự tiết hoặc giải phóng HbsAg, chất ức chế capsit, và chất ức chế ADN của HBV dạng vòng khép kín đồng hóa trị (ccc), và sự kết hợp của bất kỳ trong số chúng. Theo một số phương án, được chất bổ sung là chất ức chế transcriptaza đảo.

Theo một số phương án, nhiều hơn một được chất bổ sung được sử dụng, và được chất bổ sung này là chất ức chế transcriptaza đảo và chất kích thích miễn dịch. Chất ức chế transcriptaza đảo có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Tenofovir disoproxil fumarat (TDF), Tenofovir alafenamit, Lamivudine, Adefovir dipivoxil, Entecavir (ETV), Telbivudine, và AGX-1009. Chất kích thích miễn dịch có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, interferon alfa được peg hóa 2a (PEG-IFN- $\alpha$ 2a), Interferon alfa-2b, interleukin người tái tổ hợp-7, và chất chủ vận thụ thể giống Toll 7 (TLR7).

Cũng được đề xuất ở đây là các chế phẩm để thực hành bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả ở đây. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tác nhân dsARN hoặc được phẩm như được mô tả ở đây để sử dụng trong việc điều trị tình trạng nhiễm virus viêm gan B (HBV) ở đối tượng. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tác nhân dsARN hoặc được phẩm như được mô tả ở đây để sử dụng trong việc điều trị rối loạn do virus viêm gan B (HBV) ở đối tượng. Theo một số phương án, rối loạn do HBV là bệnh viêm gan mạn tính và đối tượng này dương tính với HBeAg. Theo một số phương án, rối loạn do HBV là bệnh viêm gan mạn tính và đối tượng này âm tính với HBeAg. Theo một số phương án, đối tượng này đang hoặc đã được sử dụng được chất bổ sung, *ví dụ*, chất chống virus, chất ức chế transcriptaza đảo, chất kích thích miễn dịch, vacxin điều trị, chất ức chế sự xâm nhập của virus, oligonucleotit ức chế sự tiết hoặc giải phóng HbsAg, chất ức chế capsit, hoặc chất ức chế ADN của HBV dạng vòng khép kín đồng hóa trị (ccc), hoặc sự kết hợp của bất kỳ trong số chúng. Theo một số phương án, được chất bổ sung là chất ức chế transcriptaza đảo, *ví dụ*, Tenofovir disoproxil fumarat (TDF), Tenofovir alafenamit, Lamivudine, Adefovir dipivoxil, Entecavir (ETV),

Telbivudine, hoặc AGX-1009. Theo một số phương án, dược chất bổ sung được sử dụng là chất ức chế transcriptaza đảo (ví dụ, Tenofovir disoproxil fumarat (TDF), Tenofovir alafenamit, Lamivudine, Adefovir dipivoxil, Entecavir (ETV), Telbivudine, hoặc AGX-1009) và chất kích thích miễn dịch (ví dụ, interferon alfa được peg hóa 2a (PEG-IFN- $\alpha$ 2a), Interferon alfa-2b, interleukin-7 người tái tổ hợp, hoặc chất chủ vận thụ thể giống Toll 7 (TLR7)).

Sáng chế đề xuất việc sử dụng tác nhân dsARN hoặc dược phẩm như được mô tả ở đây, để thực hành bất kỳ trong số các phương pháp được đề cập trên đây.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng tác nhân dsARN như được mô tả ở đây để bào chế hoặc sản xuất thuốc để thực hành bất kỳ trong số các phương pháp được đề cập trên đây.

Sáng chế còn đề xuất kit chứa tác nhân dsARN hoặc dược phẩm như được mô tả ở đây, tùy ý cùng với hướng dẫn thực hành phương pháp được mô tả ở đây.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 mô tả bằng sơ đồ cấu trúc của bộ gen HBV chuỗi kép xấp xỉ 3,2 kb. Sự sao chép bộ gen HBV xảy ra nhờ chất trung gian ARN và tạo ra 4 sản phẩm phiên mã virut gói lên nhau (sản phẩm phiên mã khoảng 3,5 kb, sản phẩm phiên mã khoảng 2,4 kb, sản phẩm phiên mã khoảng 2,1 kb, và sản phẩm phiên mã khoảng 0,7 kb) mã hóa bảy protein virut (pre-S1, pre-S2, S, P, X, pre-C, và C) được dịch mã qua ba khung đọc mở.

Fig.2A-2B thể hiện (A) nồng độ HBsAg huyết thanh (ng/mL) và (B) các mức HBsAg huyết thanh so với trước khi sử dụng liều trong mô hình chuột AAV-HBV. Fig.2A thể hiện các mức huyết thanh của HBsAg của chuột HBV-AAV trước khi sử dụng liều (ngày 24, 2, 0), hoặc sau một liều duy nhất của AD-81890 ở mức 0,3, 1, hoặc 3mg/kg (ngày 14, 21, 33, 47, 59, 74). Mỗi điểm thể hiện giá trị trung bình của n=6-9 động vật và các thanh thể hiện SD. Fig.2B thể hiện các mức huyết thanh của HBsAg của chuột HBV-AAV so với trước khi sử dụng liều (ngày 24, 2, 0), hoặc sau một liều duy nhất của AD-81890 ở mức 0,3, 1, hoặc 3mg/kg (ngày 14, 21, 33, 47, 59, 74). Mỗi điểm thể hiện giá trị trung bình của n là 6-9 động vật và các thanh thể hiện SD.

Fig.3 thể hiện các mức HBsAg huyết thanh so với trước khi sử dụng liều trong mô hình chuột AAV-HBV vào ngày 55, 27, 13, 0, 14, 28, 42, 56, 84, 112, và 140. Các phác đồ liều bao gồm đối chứng (PBS) Q2W x 6; AD-66810 (1 mg/kg; Q2W x 6); AD-

81890 (1 mg/kg; Q2W x 6); AD-81890 (1 mg/kg; QM x 3); AD-81890 (3 mg/kg; Q2W x 6); AD-81890 (3 mg/kg; QM x 3); và AD-81890 (9 mg/kg; QM x 1). Liều thứ nhất được sử dụng ở ngày 0. Mỗi điểm thể hiện giá trị trung bình của n là 4-6 động vật và các thanh thể hiện SD.

Fig.4 là biểu đồ dạng hộp thể hiện số lần thay đổi theo log2 (điều trị/đối chứng) đối với tất cả các gen được điều hòa giảm đáng kể (giá trị p được điều chỉnh  $< 0,05$ , số lần thay đổi theo log2  $< 0$ ) ở AD-66810 hoặc AD-81890. Đường nằm ngang đậm thể hiện giá trị số lần thay đổi theo log2 trung vị, vùng theo chiều dọc của mỗi hộp thể hiện độ trải giữa (interquartile range: IQR), và đường râu kéo dài đến  $\pm 1,58 \text{ IQR}/\sqrt{N}$ , trong đó N là số lượng gen trong mỗi nhóm. Ý nghĩa thống kê được đánh giá bằng cách sử dụng kiểm định t hai mẫu, hai bên của Welch.

Fig.5A-5B thể hiện mức ALT ở chuột PXB qua thời gian sau khi sử dụng AD-66810 (Fig.5A) hoặc AD-81890 (Fig.5B), so với chuột được sử dụng PBS. Chuột được sử dụng liều vào ngày 0, 21, 28, 35, và 42 với 12, 36, hoặc 100 mg/kg AD-66810, AD-81890, hoặc PBS (đối chứng) bằng cách tiêm dưới da (n=4 mỗi nhóm). Máu được lấy bằng cách làm chảy máu sau hốc mắt hai lần mỗi tuần và huyết thanh được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các chế phẩm chứa tác nhân dsARN, chế phẩm này tác động đến sự cắt các sản phẩm phiên mã ARN của gen virus viêm gan B (HBV) gây ra bởi phức hợp tất gen được cảm ứng bởi ARN (RNA-induced silencing complex: (RISC). Gen này có thể nằm trong tế bào, ví dụ, tế bào của bệnh nhân, như người. Việc sử dụng các tác nhân dsARN này cho phép gây thoái biến hướng đích các mARN của gen tương ứng (gen HBV) ở động vật có vú.

Tác nhân dsARN được mô tả ở đây được thiết kế để gắn đích các vùng trong bộ gen HBV mà được bảo tồn qua ít nhất là tám kiểu gen đã biết của HBV. Ngoài ra, các tác nhân dsARN theo sáng chế được thiết kế để ức chế tất cả các bước của chu trình sống của HBV, ví dụ, sao chép, lắp ráp, tiết virus, và tiết các kháng nguyên có cấu trúc dưới virus, bằng cách ức chế sự biểu hiện của nhiều hơn một gen HBV. Cụ thể là, vì sự phiên mã của bộ gen HBV tạo ra các ARN đa xistron, gộp lên nhau, theo một số phương án tác nhân dsARN gắn đích một gen HBV duy nhất gây ra tác dụng ức chế đáng kể sự

biểu hiện của phần lớn hoặc tất cả các sản phẩm phiên mã HBV. Ví dụ, vì bộ gen HBV được phiên mã thành mARN đơn, tác nhân dsARN theo sáng chế gắn đích gen S sẽ gây ra tác dụng ức chế không chỉ sự biểu hiện của gen S mà cả sự biểu hiện của gen polymeraza “xuôi dòng”. Ngoài ra, tác nhân dsARN theo sáng chế được thiết kế để ức chế sự sao chép virus HBV bằng cách gắn đích các gen cấu trúc HBV, và gen HBV X nhờ đó cho phép hệ miễn dịch của đối tượng phát hiện và đáp lại sự có mặt của HBsAg để sản sinh ra các kháng thể kháng HBV để loại bỏ tình trạng nhiễm HBV. Không dự định bị giới hạn bởi lý thuyết, tin là sự kết hợp hoặc dưới mức kết hợp của các đặc điểm trên đây và các vị trí đích cụ thể hoặc các biến đổi cụ thể trong các tác nhân dsARN này làm cho tác nhân dsARN theo sáng chế có hiệu quả, độ ổn định, độ an toàn, hiệu lực và tuổi thọ được cải thiện.

Bằng cách sử dụng các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo*, các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng tác nhân dsARN gắn đích gen HBV có thể tạo ra ARNi một cách hiệu lực, gây ra tác dụng ức chế đáng kể sự biểu hiện của nhiều hơn một gen HBV. Do đó, các phương pháp và các chế phẩm bao gồm các tác nhân dsARN này là hữu ích để điều trị cho đối tượng mắc tình trạng nhiễm HBV hoặc bệnh do HBV, như bệnh viêm gan B mạn tính (CHB).

Do đó, sáng chế cũng đề xuất các phương pháp để điều trị cho đối tượng mắc rối loạn mà có thể có lợi nếu ức chế hoặc làm giảm sự biểu hiện của gen HBV, ví dụ, bệnh do HBV, như tình trạng nhiễm virus viêm gan B mạn tính (CHB), bằng cách sử dụng chế phẩm chứa tác nhân dsARN mà tác động đến sự cắt các sản phẩm phiên mã ARN của gen HBV gây ra bởi phức hợp tất gen được cảm ứng bởi ARN.

Tác nhân dsARN theo sáng chế bao gồm chuỗi ARN (chuỗi đối nghĩa) có vùng bổ sung dài khoảng 19-21 nucleotit, ví dụ, dài khoảng 19 nucleotit mà gần như bổ sung với ít nhất là một phần của sản phẩm phiên mã mARN của gen HBV thuộc ít nhất là một kiểu gen HBV. Được hiểu là có nhiều kiểu gen HBV sao cho tác nhân dsARN theo sáng chế có thể thay đổi mức độ bổ sung của nó thành các kiểu gen HBV khác nhau.

Theo một số phương án, chuỗi có nghĩa và đối nghĩa tạo thành sợi kép gồm 19-21 nucleotit liên tục.

Phần mô tả chi tiết sau đây mô tả cách tạo ra và sử dụng các chế phẩm chứa tác nhân dsARN để ức chế sự biểu hiện của gen HBV cũng như các chế phẩm, cách sử

dụng, và phương pháp điều trị cho đối tượng mắc bệnh và rối loạn mà sẽ có lợi nếu ức chế hoặc làm giảm sự biểu hiện của gen HBV.

### I. Định nghĩa

Để sáng chế có thể được hiểu dễ dàng hơn, trước hết một số thuật ngữ được định nghĩa. Ngoài ra, nên lưu ý là bất kể khi nào khoảng các giá trị của một tham số được trích dẫn, dự định là các giá trị và các khoảng nằm giữa các giá trị được trích dẫn này cũng được dự định là một phần của dấu hiệu này.

Trừ khi ngữ cảnh yêu cầu theo cách khác, trong toàn bộ phần mô tả và yêu cầu bảo hộ, từ “bao gồm” và các biến thể của nó, như “bao gồm” và “việc bao gồm”, cần được hiểu là theo nghĩa mở, bao hàm, nghĩa là “bao gồm, nhưng không giới hạn ở”. “Chứa” có nghĩa là loại trừ các yếu tố nhiều hơn vi lượng của các thành phần khác hoặc các bước quan trọng khác của phương pháp được mô tả ở đây. Ví dụ, polynucleotit chứa một trình tự nucleotit khi nó không bao gồm các nucleotit bổ sung bất kỳ, nhưng không loại trừ việc kết hợp phối tử, *ví dụ*, phối tử gắn đích, hoặc các biến đổi. Thuật ngữ “chủ yếu chứa” giới hạn phạm vi của yêu cầu bảo hộ vào các nguyên liệu hoặc bước xác định, hoặc vào các nguyên liệu hoặc bước mà không tác động đáng kể đến các đặc điểm cơ bản của sáng chế được bảo hộ. Ví dụ, được phẩm chủ yếu chứa các các yếu tố như được xác định ở đây sẽ không loại trừ các tạp chất vi lượng từ phương pháp tách và tinh chế và các chất mang được dụng, như nước muối đệm phosphat, chất bảo quản và các chất tương tự. Tương tự, polynucleotit chủ yếu chứa trình tự nucleotit khi polynucleotit này bao gồm các nucleotit bổ sung mà đóng góp nhiều nhất là 20% vào độ dài của polynucleotit này và không tác động đáng kể đến hoạt động của polynucleotit này (*ví dụ*, làm thay đổi hoạt động của polynucleotit này không nhiều hơn 50%). Các phương án được xác định bởi mỗi thuật ngữ trong số các thuật ngữ chuyên tiếp nằm trong phạm vi của sáng chế.

Các mạo từ “một” được sử dụng trong bản mô tả này chỉ một hoặc nhiều hơn một (*nghĩa là*, ít nhất là một) đối tượng ngữ pháp của mạo từ này. Ví dụ, “một yếu tố” có nghĩa là một yếu tố hoặc nhiều hơn một yếu tố, ví dụ, nhiều yếu tố.

Thuật ngữ “bao gồm” được sử dụng ở đây có nghĩa là, và được sử dụng thay thế lẫn nhau 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 thế lẫn nhau với thuật ngữ “và/hoặc” trừ khi ngữ cảnh chỉ ra rõ ràng theo cách khác. Ví dụ,

“chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa” được hiểu là “chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa hoặc chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa”.

Thuật ngữ “khoảng” được sử dụng ở đây có nghĩa là nằm trong các khoảng dung sai cụ thể trong lĩnh vực này. Ví dụ, “khoảng” có thể được hiểu là trong phạm vi 2 độ lệch chuẩn từ giá trị trung bình. Khi “khoảng” đứng trước một dãy số hoặc khoảng, được hiểu là “khoảng” có thể bỏ nghĩa cho mỗi số trong các số nằm trong dãy hoặc khoảng này.

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

Như được sử dụng ở đây, “không nhiều hơn” hoặc “ít hơn” được hiểu là giá trị liền kề với cụm từ này và các giá trị hoặc số nguyên thấp hơn về mặt logic, như là logic từ ngữ cảnh, đến 0. Ví dụ, chuỗi kép có phần nhô ra chứa “không nhiều hơn 2 nucleotit” có phần nhô ra chứa 2, 1, hoặc 0 nucleotit. Khi “không nhiều hơn là” đứng trước một dãy số hoặc khoảng, nó được hiểu là “không nhiều hơn là” có thể bỏ nghĩa cho mỗi số trong các số nằm trong dãy hoặc khoảng này.

Như được sử dụng ở đây, các khoảng bao gồm cả giới hạn trên và giới hạn dưới.

Trong trường hợp có xung đột giữa một trình tự và vị trí được chỉ ra của nó trên sản phẩm phiên mã hoặc trình tự khác, trình tự nucleotit được trích dẫn trong phần mô tả sẽ chiếm ưu thế.

Các phương án khác nhau của sáng chế có thể được kết hợp như được xác định thích hợp bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này.

Như được sử dụng ở đây, “virus viêm gan B” được sử dụng thay thế lẫn nhau với thuật ngữ “HBV” đề cập đến virus ADN gan-nhiệt đới, không gây bệnh trên tế bào đã được biết rõ thuộc họ Hepadnaviridae.

Bộ gen HBV là ADN vòng, chuỗi kép một phần có các khung đọc gối lên nhau (xem, ví dụ, Fig.1).

Có bốn sản phẩm phiên mã (có thể được gọi ở đây là “gen” hoặc “khung đọc mở”) theo kích thước, được mã hóa bởi bộ gen HBV. Các sản phẩm phiên mã này chứa các khung đọc mở gọi là C, X, P, và S. Protein lõi được mã hóa bởi gen C (HBcAg). Kháng nguyên viêm gan B e (HBeAg) được sản sinh bằng cách xử lý phân giải protein tiền protein lõi (pre-C). ADN polymeraza được mã hóa bởi gen P. Gen S là gen mã hóa các kháng nguyên bề mặt (HBsAg). Gen HBsAg là một khung đọc mở dài chứa ba codon “khởi đầu” (ATG) trong khung tạo ra các polypeptit có ba kích thước khác nhau gọi là các kháng nguyên S lớn, trung bình và nhỏ, pre-S1 + pre-S2 + S, pre-S2 + S, hoặc S. Các kháng nguyên bề mặt, ngoài việc trang trí cho màng bọc HBV, cũng là một phần của các hạt dưới virus, được sản sinh dư thừa nhiều so với các hạt virus, và đóng vai trò trong sự dung nạp miễn dịch và cô lập các kháng thể kháng HBsAg, nhờ đó cho phép các hạt gây nhiễm thoát khỏi sự phát hiện miễn dịch. Chức năng của protein phi cấu trúc được mã hóa bởi gen X chưa được hiểu đầy đủ, nhưng nó đóng vai trò trong việc hoạt hóa chéo sự phiên mã và sao chép và liên quan đến sự phát triển bệnh ung thư gan.

HBV là một trong vài virus ADN sử dụng transcriptaza đảo trong quá trình sao chép, mà bao gồm nhiều giai đoạn bao gồm xâm nhập, bỏ màng bao, và vận chuyển bộ gen virus vào nhân. Ban đầu, sự sao chép của bộ gen HBV bao gồm tạo ra chất trung gian ARN mà sau đó được phiên mã ngược để tạo ra bộ gen virus ADN.

Khi tế bào nhiễm HBV, ADN vòng (rcADN) bị giãn của bộ gen virus được vận chuyển vào nhân của tế bào và được chuyển hóa thành ADN vòng khép kín đồng hóa trị (cccADN) thể bổ sung, mà đóng vai trò là khuôn phiên mã cho mARN virus. Sau khi phiên mã và đưa ra khỏi nhân, ARN tiền bộ gen (pgRNA) của virus ở tế bào chất được lắp ráp với HBV polymeraza và các protein vỏ capsit để tạo ra nucleocapsit, bên trong đó sự phiên mã ngược được xúc tác bởi polymeraza tạo ra ADN sợi âm, được sao chép tiếp thành ADN sợi dương để tạo ra bộ gen rcADN dòng con. Sau đó các nucleocapsit trưởng thành được đóng gói bằng protein màng bao virus đi ra dưới dạng hạt virus hoặc được vận chuyển đến nhân để khuếch đại nguồn chứa cccADN bằng con đường khuếch đại cccADN trong tế bào. cccADN là thành phần thiết yếu của chu trình sao chép HBV và chịu trách nhiệm về việc xác lập tình trạng nhiễm và sự tồn tại dai dẳng của virus.

Tình trạng nhiễm HBV dẫn đến sự sản sinh hai hạt khác nhau sau đây: 1) chính virus HBV gây nhiễm (hoặc hạt Dane), mà bao gồm vỏ capsit của virus được lắp ráp từ HBcAg và được bao bọc bằng màng bao chứa màng lipid với các kháng nguyên bề mặt

HBV, và 2) các hạt dưới virus (hoặc các SVP) mà chứa các dạng nhỏ và trung bình của kháng nguyên bề mặt viêm gan B HBsAg, mà không gây nhiễm. Đối với mỗi hạt virus được tạo ra, trên 10.000 SVP được giải phóng vào máu. Như vậy, SVP (và protein HBsAg mà chúng mang) đại diện cho đại đa số protein virus trong máu. Các tế bào bị nhiễm HBV cũng tiết ra sản phẩm phân giải protein hòa tan của tiền protein lõi được gọi là kháng nguyên e HBV (HBeAg).

Tám kiểu gen của HBV, được ký hiệu là A đến H, đã được xác định, và hai kiểu gen bổ sung I và J đã được đề xuất, mỗi kiểu gen có phân bố địa lý riêng. Virus không gây bệnh tế bào, với tính miễn dịch tế bào đặc hiệu virus là yếu tố quyết định chính cho hậu quả của việc phơi nhiễm với tình trạng nhiễm cấp tính HBV với sự giảm các bệnh gan với 6 tháng, hoặc tình trạng nhiễm HBV mạn tính thường bị gây ra bởi tổn thương gan tiến triển.

Thuật ngữ “HBV” bao gồm bất kỳ trong số các kiểu gen của HBV (A đến J). Trình tự mã hóa đầy đủ của trình tự tham chiếu của bộ gen HBV có thể được tìm thấy trong ví dụ, số truy cập Ngân hàng gen GI:21326584 (SEQ ID NO:1) và GI:3582357 (SEQ ID NO:3). Các trình tự đối nghĩa được cung cấp lần lượt trong SEQ ID NO:2 và SEQ ID NO:4. Các trình tự axit amin cho protein C, X, P, và S có thể được tìm thấy, ví dụ ở số truy cập NCBI là YP\_009173857.1 (protein C) (SEQ ID NO:37); YP\_009173867.1 và BAA32912.1 (protein X) (SEQ ID No: 36 và 40); YP\_009173866.1 và BAA32913.1 (protein P) (SEQ ID No:32 và 38); và YP\_009173869.1, YP\_009173870.1, YP\_009173871.1, và BAA32914.1 (protein S) (SEQ ID NO: 33, 34, 35, 39). Các trình tự protein và ADN của chủng ayw, kiểu gen D của HBV, được cung cấp trong SEQ ID NO: 36-37. Các trình tự protein và ADN của kiểu gen C của HBV, được cung cấp trong SEQ ID NO: 38-39. Các ví dụ bổ sung về các trình tự protein HBV và ADN, hoặc các trình tự bổ sung ngược của chúng, được cung cấp trong SEQ ID No: 41-49.

Các ví dụ bổ sung về các trình tự HBV mARN dễ dàng sẵn có bằng cách sử dụng các cơ sở dữ liệu có sẵn công khai, ví dụ, GenBank, UniProt, và OMIM. Lưu trữ quốc tế cho dữ liệu chủng virus viêm gan B có thể được truy cập tại <http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/HepSEQ/main.php>.

Thuật ngữ “HBV”, như được sử dụng ở đây, còn đề cập đến các biến thể trình tự ADN xuất hiện tự nhiên của bộ gen HBV, *ví dụ*, các kiểu gen A-J và các biến thể của chúng.

Như được sử dụng ở đây, “virut viêm gan D” được sử dụng thay thế lẫn nhau với thuật ngữ “HDV” đề cập đến virut ADN gan-nhiệt đới, không gây bệnh trên tế bào đã được biết rõ thuộc họ Hepadnaviridae. *Xem, ví dụ*, Ciancio và Rizzetto, Nat. Rev. 11:68-71, 2014; Le Gal *et al.*, Emerg. Infect. Dis. 12:1447-1450, 2006; và Abbas và Afzal, World J. Hep., 5:666-675, 2013, tất cả các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Trừ khi có quy định khác, HDV đề cập đến tất cả các nhánh và các biến thể của HDV.

HDV sản sinh ra một protein, được gọi là HDAg. Protein này có hai dạng; HDAg lớn 27kDa (còn được gọi là LHD, L-HDAg, và kháng nguyên HDV lớn), và HDAg nhỏ 24kDa (còn được gọi là sHD, S-HDAg, và kháng nguyên HDV nhỏ). Các đầu cùng N của hai dạng này là giống nhau; chúng khác nhau bởi 19 axit amin ở đầu cùng C của HDAg lớn. Cả hai isoform đều được sản sinh từ cùng một khung đọc, chứa codon dừng UAG ở codon 196 và bình thường chỉ sản sinh HDAg nhỏ. Tuy nhiên, việc biên tập bằng enzym tế bào adenosin deaminaza-1 làm thay đổi codon dừng thành UCG, cho phép HDAg lớn được sản sinh ra. Mặc dù có các trình tự tương đồng 90%, hai protein này đóng vai trò khác nhau trong quá trình gây nhiễm. HDAg-S được sản sinh ở giai đoạn sớm của tình trạng nhiễm và đi vào nhân và hỗ trợ sự sao chép virut. Ngược lại, HDAg-L, được sản sinh trong các giai đoạn muộn hơn của tình trạng nhiễm, đóng vai trò là chất ức chế sự sao chép virut, và cần thiết cho sự lắp ráp các hạt virut.

Các ví dụ bổ sung về các trình tự mARN của HDV dễ dàng sẵn có bằng cách sử dụng các cơ sở dữ liệu có sẵn công khai, *ví dụ*, GenBank, UniProt, và OMIM.

Thuật ngữ “HDV”, như được sử dụng ở đây, còn đề cập đến các biến thể trình tự ADN xuất hiện tự nhiên của bộ gen HDV.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất tương tự nucelot(s)it” hoặc “chất ức chế transcriptaza đảo” là chất ức chế sự sao chép ADN mà tương tự về cấu trúc với nucleotit hoặc nucleosit và ức chế đặc hiệu sự sao chép của HBV cccADN và không ức chế đặc hiệu sự sao chép của ADN vật chủ (*ví dụ*, người). Các chất ức chế này bao gồm Tenofovir disoproxil fumarat (TDF), Tenofovir alafenamit (TAF), Lamivudine, Adefovir dipivoxil, Entecavir (ETV), Telbivudine, AGX-1009, emtricitabine,

clevudine, ritonavir, dipivoxil, lobucavir, famvir, FTC, N-acetyl-Cysteine (NAC), PC1323, theradigm-HBV, thymosin-alpha, ganciclovir, besifovir (ANA-380/LB-80380), và tenofvir-exaliade (TLX/CMX157). Theo một số phương án, chất tương tự nucleot(s)it là Entecavir (ETV). Các chất tương tự nucleot(s)it đã có trên thị trường từ nhiều nguồn và được sử dụng trong các phương pháp được đề xuất ở đây theo chỉ định trên nhãn của chúng (*ví dụ*, thường được sử dụng bằng đường miệng ở liều cụ thể) hoặc như được xác định bởi người có kiến thức trung bình trong việc điều trị HBV.

Như được sử dụng ở đây, “trình tự đích” đề cập đến phần liên tục của trình tự nucleotit của phân tử mARN được tạo ra trong quá trình phiên mã của gen HBV, bao gồm mARN là sản phẩm của quá trình xử lý ARN của sản phẩm phiên mã bậc một. Theo một số phương án, phần đích của trình tự ít nhất là đủ dài để đóng vai trò là cơ chất cho sự cắt được điều khiển bởi tác nhân dsARN tại hoặc gần phần đó của trình tự nucleotit của phân tử mARN được tạo ra trong quá trình phiên mã của gen HBV.

Trình tự đích có thể dài khoảng 19 đến 21 nucleotit, *ví dụ*, dài 19, 20, hoặc 21 nucleotit.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chuỗi chứa trình tự” đề cập đến oligonucleotit chứa chuỗi nucleotit được mô tả bằng trình tự được gọi tên bằng cách sử dụng danh pháp nucleotit chuẩn.

Mỗi “G”, “C”, “A”, “T” và “U” thường đại diện cho một nucleotit chứa guanin, xytosin, adenin, thymidin, và uraxil là bazơ, tương ứng. Tuy nhiên, sẽ được hiểu là thuật ngữ “ribonucleotit” hoặc “nucleotit” cũng có thể đề cập đến nucleotit biến đổi, như được mô tả chi tiết hơn dưới đây, hoặc gốc thế đại diện (*xem, ví dụ*, Bảng 1). Người có kiến thức trung bình sẽ nhận ra là guanin, xytosin, adenin, và uraxil có thể được thay thế bằng các gốc khác mà không làm thay đổi đáng kể các đặc điểm tạo cặp bazơ của oligonucleotit chứa nucleotit mang các gốc thế này. Ví dụ, không giới hạn, nucleotit chứa inosin làm bazơ của nó có thể tạo cặp bazơ với nucleotit chứa adenin, xytosin, hoặc uraxil. Vì vậy, nucleotit chứa uraxil, guanin, hoặc adenin có thể được thay thế trong các trình tự nucleotit của dsARN được mô tả trong sáng chế bằng nucleotit chứa, ví dụ, inosin. Trong một ví dụ khác, adenin và xytosin ở bất kỳ đâu trong oligonucleotit có thể được thay thế lần lượt bằng guanin và uraxil, để tạo ra bazơ G-U Wobble tạo cặp với mARN đích. Các trình tự chứa các gốc thay thế này là thích hợp cho các chế phẩm và các phương pháp được mô tả trong sáng chế.

Các thuật ngữ “tác nhân dsARN”, “tác nhân ARNi”, “tác nhân iARN” “iARN”, và “tác nhân can thiệp ARN” như được sử dụng thay thế lẫn nhau ở đây, đề cập đến tác nhân chứa ARN như thuật ngữ này được xác định ở đây, và gây ra sự cắt gắn đích sản phẩm phiên mã ARN bằng con đường phức hợp tắt gen được cảm ứng bởi ARN (RISC). Tác nhân dsARN điều khiển sự thoái biến mRNA đặc hiệu trình tự nhờ quá trình được biết là can thiệp ARN (ARNi). Tác nhân dsARN điều biến, *ví dụ*, ức chế, sự biểu hiện của gen HBV (*ví dụ*, một hoặc nhiều gen HBV) trong tế bào, *ví dụ*, tế bào ở đối tượng, như đối tượng động vật có vú.

“Tác nhân dsARN” để sử dụng trong chế phẩm, các ứng dụng, và các phương pháp được mô tả ở đây là ARN sợi kép và được gọi ở đây là “tác nhân dsARN,” “tác nhân ARN sợi kép”, “phân tử ARN sợi kép (dsARN)”, “dsARN”, “iARN”, “tác nhân iARN”, “tác nhân dsARNi”, “tác nhân ARNi”, hoặc “siARN”. Thuật ngữ “dsARN” đề cập đến phức hợp phân tử axit ribonucleic, có cấu trúc kép chứa hai chuỗi axit nucleic gần như bổ sung và đối song, được gọi là có các hướng “có nghĩa” và “đối nghĩa” đối với ARN đích, nghĩa là, gen HBV. Theo một số phương án của sáng chế, dsARN gây ra sự thoái biến của ARN đích, *ví dụ*, mRNA, thông qua cơ chế tắt gen sau phiên mã được gọi ở đây là can thiệp ARN hoặc iARN.

Nói chung, mỗi chuỗi của phân tử dsARN có thể chứa ribonucleotit, nhưng như được mô tả chi tiết ở đây, mỗi chuỗi hoặc cả hai chuỗi cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều đơn phân không phải ribonucleotit, *ví dụ*, deoxyribonucleotit hoặc nucleotit biến đổi. Ngoài ra, như được sử dụng trong phần mô tả này, “tác nhân dsARN” có thể bao gồm ribonucleotit có các biến đổi hóa học; tác nhân dsARN có thể bao gồm các biến đổi quan trọng ở nhiều nucleotit. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nucleotit biến đổi” đề cập đến nucleotit, độc lập, có gốc đường biến đổi, cầu nối giữa các nucleotit biến đổi, hoặc nucleobazơ biến đổi. Do đó, thuật ngữ nucleotit biến đổi bao gồm các biến đổi thay thế, bổ sung, hoặc loại bỏ, *ví dụ*, nguyên tử hoặc nhóm chức, đối với các cầu nối giữa các nucleosit, các gốc đường, hoặc các nucleobazơ. Các biến đổi thích hợp để sử dụng trong các tác nhân theo sáng chế bao gồm tất cả các loại biến đổi được mô tả ở đây hoặc được biết trong lĩnh vực này. Các biến đổi bất kỳ này, như được sử dụng trong phân tử kiểu tác nhân dsARN, được bao gồm bởi “tác nhân dsARN” cho các mục đích của phần mô tả và yêu cầu bảo hộ này.

Thuật ngữ “ức chế”, như được sử dụng ở đây, được sử dụng thay thế lẫn nhau với “làm giảm”, “làm tắt”, “điều hòa giảm”, “chặn” và các thuật ngữ tương tự khác, và bao gồm mức độ ức chế bất kỳ. Tốt hơn, nếu tác dụng ức chế bao gồm ức chế có ý nghĩa thống kê hoặc ức chế có ý nghĩa lâm sàng.

Cụm từ “ức chế sự biểu hiện của HBV” hoặc “ức chế sự biểu hiện của gen HBV” như được sử dụng ở đây, bao gồm tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen HBV bất kỳ (ví dụ, gen HBV được biểu hiện từ HBV ở tình trạng nhiễm virus HBV, gen HBV được biểu hiện từ cấu trúc biểu hiện trong tế bào) cũng như các biến thể hoặc đột biến của gen HBV mã hóa protein HBV. Các thuật ngữ này bao gồm sự bất hoạt sản phẩm phiên mã HBV bất kỳ (ví dụ, sản phẩm phiên mã 3,5 kb, 2,4 kb, 2,1 kb, hoặc 0,7 kb) mã hóa một hoặc nhiều protein virus HBV (như, ví dụ, preS1/2-S, preS, S, P, X, preC, và C), cũng như các biến thể hoặc đột biến của gen HBV.

“Ức chế sự biểu hiện của gen HBV” bao gồm mức độ ức chế bất kỳ đối với gen hoặc sản phẩm phiên mã HBV, ví dụ, ít nhất là ngăn chặn một phần sự biểu hiện của gen HBV, ví dụ gen HBV S, P, X, hoặc C, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng, ví dụ, S, P, và C. Sự biểu hiện của gen HBV có thể được đánh giá dựa trên mức độ, hoặc sự thay đổi mức độ, của biến số bất kỳ liên quan đến sự biểu hiện gen HBV, ví dụ, mức HBV mRNA hoặc mức protein HBV, hoặc mức HBV cccADN. Mức độ này có thể được đánh giá ở tế bào đơn lẻ hoặc trong nhóm các tế bào, bao gồm, ví dụ, mẫu thu được của đối tượng, ví dụ, các mức độ này có thể được theo dõi trong huyết thanh. Tác dụng ức chế có thể được đánh giá bằng sự giảm mức độ tuyệt đối hoặc tương đối của một hoặc nhiều trong số các biến số này so với mức đối chứng. Mức đối chứng này có thể là kiểu mức đối chứng bất kỳ mà được sử dụng trong lĩnh vực này, ví dụ, mức đường cơ sở trước khi sử dụng liệu, hoặc mức được xác định từ đối tượng hoặc quần thể tương tự tính trung bình từ đối tượng, tế bào hoặc mẫu đối chứng thích hợp mà không được điều trị hoặc được điều trị bằng đối chứng (ví dụ, đối chứng chỉ chứa đệm hoặc đối chứng là chất không có hoạt tính).

Theo một số phương án của các phương pháp theo sáng chế, sự biểu hiện của gen HBV bị ức chế ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, ví dụ, ở đối tượng bởi ít nhất là 1 log 10, 2 log 10, 3 log 10, hoặc 4 log 10, hoặc đến thấp hơn mức phát hiện được của thử nghiệm. Trong các phương án được ưu tiên, tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen HBV ở đối tượng gây ra sự ức chế hợp lý về mặt lâm sàng đối với mức biểu hiện gen, ví dụ,

bị ức chế đủ để cho phép đáp ứng miễn dịch hữu hiệu kháng lại protein HBV, khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các chất khác để tăng cường hoặc cải thiện đáp ứng miễn dịch.

Trong thử nghiệm dựa trên tế bào *in vitro* hoặc sự biểu hiện của gen khác loại trong mô hình *in vivo*, ví dụ, mô hình AAV-hHBV chuột được cung cấp ở đây, tác dụng ức chế toàn bộ sự biểu hiện HBV ít nhất là 90% được ưu tiên hơn, ví dụ, ít nhất là 1 log 10, 2 log10, hoặc 3 log10. Khi điều trị cho đối tượng mắc tình trạng nhiễm HBV, sự giảm ít nhất là 90% mức protein hoặc gen HBV, nghĩa là, sự khác biệt về mức protein hoặc gen HBV trước và sau khi điều trị, được ưu tiên hơn. Nhiều hơn một liều có thể là cần thiết để đạt được mức ức chế mong muốn.

Tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen HBV có thể được chứng minh bằng sự giảm lượng ARN được biểu hiện bởi tế bào hoặc nhóm tế bào thứ nhất (các tế bào này có thể có mặt, ví dụ, trong mẫu thu được từ đối tượng) trong đó gen HBV được phiên mã và các tế bào này đã được điều trị (ví dụ, bằng cách cho tế bào hoặc các tế bào này tiếp xúc với tác nhân dsARN theo sáng chế, hoặc bằng cách sử dụng tác nhân dsARN theo sáng chế cho đối tượng mà trong đó các tế bào này có mặt hoặc đã có mặt) sao cho sự biểu hiện của gen HBV bị ức chế, so với tế bào hoặc nhóm tế bào thứ hai gần như giống với tế bào hoặc nhóm tế bào thứ nhất nhưng chưa được điều trị ((các) tế bào đối chứng). Trong các phương án được ưu tiên, tác dụng ức chế này được đánh giá bằng phương pháp rtPCR được cung cấp trong Ví dụ 2 của WO2016/077321 (phương pháp này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), cùng với các thử nghiệm *in vitro* được thực hiện trong dòng tế bào phù hợp một cách thích hợp với chuỗi kép ở nồng độ 10 nM, và thể hiện mức mARN ở các tế bào được điều trị dưới dạng tỷ lệ phần trăm so với mức mARN ở các tế bào đối chứng, bằng cách sử dụng công thức sau đây:

$$\frac{(\text{mARN trong tế bào đối chứng}) - (\text{mARN trong tế bào được điều trị})}{\text{mARN trong tế bào đối chứng}} \cdot 100\%$$

Theo cách khác, tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen HBV có thể được đánh giá về sự giảm các tham số liên quan về mặt chức năng với sự biểu hiện gen HBV. Tác dụng tắt gen HBV có thể được xác định trong tế bào bất kỳ biểu hiện gen HBV, cơ định hoặc bằng cách thao tác di truyền bộ gen, và bằng thử nghiệm bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Tác dụng ức chế sự biểu hiện của protein HBV có thể được chứng minh bằng sự giảm mức protein HBV được biểu hiện bởi tế bào hoặc nhóm tế bào (ví dụ, mức protein được biểu hiện trong mẫu thu được từ đối tượng). Như đã giải thích trên đây, đối với việc đánh giá sự ức chế mRNA, tác dụng ức chế các mức biểu hiện protein ở tế bào hoặc nhóm tế bào được điều trị có thể được thể hiện tương tự dưới dạng tỷ lệ phần trăm của mức protein trong tế bào hoặc nhóm tế bào đối chứng hoặc trong huyết thanh.

Tế bào hoặc nhóm tế bào đối chứng mà có thể được sử dụng để đánh giá tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen HBV bao gồm tế bào hoặc nhóm tế bào vẫn chưa được tiếp xúc với tác nhân dsARN theo sáng chế. Ví dụ, tế bào hoặc nhóm tế bào đối chứng có thể thu được từ một đối tượng đơn lẻ (ví dụ, đối tượng là người hoặc động vật) trước khi điều trị cho đối tượng này bằng tác nhân dsARN. Trong các phương án khác, mức này có thể được so sánh với mẫu đối chứng thích hợp, ví dụ, mẫu đối chứng của quần thể đã biết.

Mức HBV ARN mà được biểu hiện bởi tế bào hoặc nhóm tế bào, hoặc mức HBV ARN tuần hoàn, có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để đánh giá sự biểu hiện của mRNA, tốt hơn là sử dụng phương pháp rtPCR được cung cấp trong Ví dụ 2 của WO2016/077321. Theo một số phương án, mức biểu hiện của gen HBV (ví dụ, toàn bộ HBV ARN, sản phẩm phiên mã HBV, ví dụ, sản phẩm phiên mã HBV 3,5 kb) trong mẫu được xác định bằng cách phát hiện polynucleotit được phiên mã, hoặc một phần của nó, ví dụ, ARN của gen HBV. ARN có thể được chiết từ tế bào bằng cách sử dụng các kỹ thuật chiết tách ARN bao gồm, ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật chiết phenol axit/guanidin isothiocyanat (RNAzol B; Biogenesis), kit điều chế RNeasy ARN (Qiagen®) hoặc PAXgene (PreAnalytix, Thụy Sĩ). Các dạng thử nghiệm điển hình sử dụng kỹ thuật lai axit ribonucleic bao gồm các thử nghiệm run-on hạt nhân, RT-PCR, các thử nghiệm bảo vệ RNase (Melton *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12:7035), kỹ thuật thấm tách northern, kỹ thuật lai *in situ*, và phân tích Microarray. HBV mRNA tuần hoàn có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong WO 2012/177906, các phương pháp này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, mức biểu hiện của gen HBV được xác định bằng cách sử dụng đoạn dò axit nucleic. Thuật ngữ “đoạn dò”, như được sử dụng ở đây, đề cập đến phân tử bất kỳ có khả năng liên kết chọn lọc với gen HBV cụ thể. Các đoạn dò có thể được tổng hợp bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này, hoặc thu được từ

các chế phẩm sinh học thích hợp. Các đoạn dò có thể được thiết kế đặc hiệu để được gắn nhãn. Ví dụ về các phân tử có thể được sử dụng làm đoạn dò bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ARN, ADN, protein, kháng thể, và các phân tử hữu cơ.

ARN được phân lập có thể được sử dụng trong các thử nghiệm lai hoặc khuếch đại bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phân tích northern, phân tích phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), và dãy dò. Một phương pháp để xác định các mức mARN bao gồm cho mARN đã phân lập tiếp xúc với phân tử axit nucleic (đoạn dò) mà có thể lai với HBV mARN. Theo một số phương án, mARN được bắt động trên bề mặt rắn và được tiếp xúc với đoạn dò, ví dụ bằng cách chạy mARN đã phân lập trên gen agarosa và chuyển mARN này từ gel lên màng, như nitroxyenluloza. Trong một số phương án khác, (các) đoạn dò được bắt động trên bề mặt rắn và mARN được cho tiếp xúc với (các) đoạn dò, ví dụ, trong dãy chip gen Affymetrix®. Người có hiểu biết trung bình có thể dễ dàng điều chỉnh các phương pháp phát hiện mARN đã biết cho thích hợp để sử dụng trong việc xác định mức HBV mARN.

Phương pháp khác để xác định mức biểu hiện của gen HBV trong mẫu bao gồm quy trình khuếch đại axit nucleic hoặc transcriptaza đảo (để tạo ra cADN) của, ví dụ, mARN trong mẫu, ví dụ, bằng RT-PCR (phương án thử nghiệm được đưa ra trong Mullis, 1987, patent Mỹ số 4,683,202), phản ứng chuỗi ligaza (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), phương pháp sao chép trình tự tự duy trì (Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), hệ thống khuếch đại phiên mã (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), kỹ thuật sao chép vòng tròn lẫn (Lizardi *et al.*, patent Mỹ số 5,854,033), hoặc phương pháp khuếch đại axit nucleic bất kỳ khác, sau đó phát hiện các phân tử đã được khuếch đại bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các kỹ thuật phát hiện này đặc biệt hữu ích để phát hiện phân tử axit nucleic nếu các phân tử này có mặt với lượng rất thấp. Theo các khía cạnh cụ thể của sáng chế, mức biểu hiện của gen HBV được xác định bằng RT-PCR sinh huỳnh quang định lượng (*nghĩa là*, hệ thống TaqMan™), ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp được đề xuất ở đây.

Các mức biểu hiện của HBV ARN có thể được theo dõi bằng cách sử dụng thẩm tách màng (như được sử dụng trong phân tích lai như northern, điểm, và tương tự), hoặc vi giếng, ống mẫu, gel, hạt hoặc sợi (hoặc giá đỡ rắn bất kỳ chứa các axit nucleic đã liên

kết). Xem patent Mỹ số 5,770,722, 5,874,219, 5,744,305, 5,677,195, và 5,445,934, các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến các phần giải thích liên quan đến các phương pháp này. Việc xác định mức biểu hiện HBV cũng có thể bao gồm sử dụng các đoạn dò axit nucleic trong dung dịch.

Trong các phương án được ưu tiên, mức biểu hiện ARN được đánh giá bằng cách sử dụng PCR thời gian thực (qPCR). Việc sử dụng các phương pháp này được mô tả và được minh họa trong Ví dụ 2 của WO2016/077321.

Mức biểu hiện của protein HBV có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để đo các mức protein. Các phương pháp này bao gồm, ví dụ, điện di, điện di mao quản, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký siêu khuếch tán, các phản ứng kết tủa chất lỏng hoặc gel, quang phổ hấp thụ, thử nghiệm đo màu, thử nghiệm đo quang phổ, phương pháp đo tế bào theo dòng, phương pháp khuếch tán miễn dịch (đơn hoặc kép), phương pháp điện di miễn dịch, phương pháp thấm tách western, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), các thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch, các thử nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang, và các phương pháp tương tự.

#### Tác nhân dsARN

Vùng kép có thể có độ dài bất kỳ cho phép thoái biến đặc hiệu ARN đích mong muốn qua con đường RISC, và có thể có độ dài nằm trong khoảng từ khoảng 19-21 cặp bazơ, ví dụ, dài khoảng 19, 20, hoặc 21 cặp bazơ. Tác nhân dsARN điển hình được cung cấp ở đây bao gồm độ dài chuỗi kép là 19-21 cặp bazơ.

Khi hai chuỗi gần như bổ sung của dsARN được tạo bởi các phân tử ARN riêng biệt, các phân tử này không cần phải, nhưng có thể được nối đồng hóa trị. Khi hai chuỗi được nối đồng hóa trị bằng cách thức không phải chuỗi nucleotit liên tục giữa đầu 3' của một chuỗi và đầu 5' của chuỗi khác tương ứng tạo ra cấu trúc kép, cấu trúc nối này được gọi là “cầu nối”. Các chuỗi ARN có thể có số nucleotit giống hoặc khác nhau. Số cặp bazơ tối đa là số lượng nucleotit trong chuỗi ngắn nhất của dsARN trừ đi trình tự nhô ra bất kỳ có mặt trong chuỗi kép. Ngoài cấu trúc kép này, tác nhân dsARN có thể chứa một hoặc nhiều nucleotit nhô ra.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nucleotit nhô ra” đề cập đến ít nhất là một nucleotit không bắt cặp nhô ra khỏi cấu trúc kép của tác nhân dsARN chuỗi kép. Ví dụ, khi đầu 3' của một chuỗi của dsARN kéo dài quá đầu 5' của chuỗi còn lại, hoặc ngược

*lại*, xuất hiện nucleotit nhô ra. dsARN có thể chứa trình tự nhô ra có ít nhất là một nucleotit; theo cách khác, trình tự nhô ra này có thể chứa hai nucleotit. Nucleotit nhô ra có thể chứa hoặc gồm chất tương tự nucleotit/nucleosit, bao gồm deoxynucleotit/nucleosit. (Các) trình tự nhô ra có thể nằm trên chuỗi có nghĩa, chuỗi đối nghĩa, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Ngoài ra, (các) nucleotit của trình tự nhô ra có thể nằm trên đầu 5', đầu 3', hoặc cả hai đầu của chuỗi đối nghĩa hoặc có nghĩa của dsARN. Trong một phương án được ưu tiên, nucleotit nhô ra nằm trên đầu 3' của chuỗi đối nghĩa.

“Tù” hoặc “đầu tù” có nghĩa là không có nucleotit không bắt cặp ở đầu đó của tác nhân dsARN chuỗi kép, nghĩa là, không có nucleotit nhô ra. Tác nhân dsARN “đầu tù” là dsARN có chuỗi kép trên toàn bộ chiều dài của nó, nghĩa là, không có nucleotit nhô ra ở cả hai đầu của phân tử. Theo một số phương án, tác nhân dsARN theo sáng chế bao gồm tác nhân dsARN có các nucleotit nhô ra ở một đầu (*nghĩa là*, tác nhân có một đầu nhô ra và một đầu tù) hoặc có các nucleotit nhô ra ở cả hai đầu.

Thuật ngữ “chuỗi đối nghĩa” hoặc “chuỗi dẫn” đề cập đến chuỗi của tác nhân dsARN, bao gồm vùng gần như bổ sung với trình tự đích, *ví dụ*, HBV mARN. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vùng có tính bổ sung” đề cập đến vùng trên chuỗi đối nghĩa gần như bổ sung với một trình tự, *ví dụ* trình tự đích, *ví dụ*, trình tự nucleotit của HBV, như được xác định ở đây. Khi vùng có tính bổ sung không bổ sung hoàn toàn với trình tự đích, các bắt cặp nhầm có thể nằm trong các vùng đầu cùng hoặc vùng bên trong của phân tử. Nói chung, các bắt cặp nhầm ít gây ảnh hưởng nhất là ở trong vùng đầu cùng, *ví dụ*, trong khoảng 5, 4, 3, 2, hoặc 1 nucleotit của đầu cùng 5' hoặc 3' của tác nhân dsARN. Theo một số phương án, tác nhân dsARN theo sáng chế bao gồm bắt cặp nhầm nucleotit trong chuỗi đối nghĩa. Theo một số phương án, tác nhân dsARN theo sáng chế bao gồm bắt cặp nhầm nucleotit trong chuỗi có nghĩa. Theo một số phương án, bắt cặp nhầm nucleotit nằm trong khoảng, *ví dụ*, 5, 4, 3, 2, hoặc 1 nucleotit từ đầu cùng 3' của tác nhân dsARN. Theo một số phương án, bắt cặp nhầm nucleotit nằm ở, *ví dụ*, nucleotit đầu cùng 3' của tác nhân dsARN.

Thuật ngữ “chuỗi có nghĩa” hoặc “chuỗi khách” như được sử dụng ở đây, đề cập đến chuỗi của tác nhân dsARN bao gồm vùng gần như bổ sung với vùng của chuỗi đối nghĩa như thuật ngữ này được định nghĩa ở đây.

Như được sử dụng ở đây, và trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “bổ sung” khi được sử dụng để mô tả trình tự nucleotit thứ nhất trong mối quan hệ với trình tự nucleotit thứ hai, đề cập đến khả năng của oligonucleotit hoặc polynucleotit chứa trình tự nucleotit thứ nhất lai với và tạo ra cấu trúc kép trong một số điều kiện với oligonucleotit hoặc polynucleotit chứa trình tự nucleotit thứ hai, như được hiểu bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này. 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 sau đó rửa (*xem, ví dụ, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press*). Các điều kiện khác, như các điều kiện phù hợp về sinh lý như có thể gặp bên trong cơ thể, có thể áp dụng. Người có kiến thức trung bình này có thể xác định tập hợp các điều kiện thích hợp nhất cho thử nghiệm về tính bổ sung của hai trình tự phù hợp với việc sử dụng sau cùng của nucleotit được lai.

Các trình tự bổ sung trong tác nhân dsARN, *ví dụ*, trong tác nhân dsARN như được mô tả ở đây, bao gồm sự bắt cặp bazơ của oligonucleotit hoặc polynucleotit chứa trình tự nucleotit thứ nhất với oligonucleotit hoặc polynucleotit chứa trình tự nucleotit thứ hai trên toàn bộ chiều dài của một hoặc cả hai trình tự nucleotit này. Các trình tự này có thể được gọi là “bổ sung hoàn toàn” với nhau ở đây. Tuy nhiên, khi trình tự thứ nhất được gọi là “gần như bổ sung” đối với trình tự thứ hai ở đây, hai trình tự này có thể là bổ sung hoàn toàn, hoặc chúng có thể tạo ra một hoặc nhiều, nhưng nói chung là không nhiều hơn 4, 3, hoặc 2 cặp bazơ bắt cặp nhầm khi lai đối với chuỗi kép có đến 21 cặp bazơ, trong khi vẫn duy trì khả năng lai trong các điều kiện phù hợp nhất với ứng dụng cuối cùng của chúng, *ví dụ*, ức chế sự biểu hiện gen *qua* con đường RISC. Tuy nhiên, khi hai oligonucleotit được thiết kế để tạo ra, khi lai, một hoặc nhiều trình tự nhô ra chuỗi đơn, các trình tự nhô ra này sẽ không được xem là các bắt cặp nhầm liên quan đến việc xác định tính bổ sung. Ví dụ, tác nhân dsARN chứa một oligonucleotit dài 21 nucleotit và oligonucleotit khác dài 23 nucleotit, trong đó oligonucleotit dài hơn chứa trình tự gồm 21 nucleotit bổ sung hoàn toàn với oligonucleotit ngắn hơn, có thể 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, cũng có thể bao gồm, hoặc được tạo ra hoàn toàn từ, các cặp bazơ không phải Watson-Crick hoặc các cặp bazơ được tạo ra từ nucleotit không tự nhiên và biến đổi, ở mức độ mà các yêu cầu trên đây về khả

năng lai của chúng vẫn được thỏa mãn. Các cặp bazơ không phải Watson-Crick này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sự tạo cặp bazơ G:U Wobble hoặc Hoogsteen.

Các thuật ngữ “bổ sung”, “bổ sung hoàn toàn”, và “gần như bổ sung” ở đây có thể được sử dụng đối với sự bắt cặp bazơ giữa chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa của dsARN, hoặc giữa chuỗi đối nghĩa của tác nhân dsARN và trình tự đích, như sẽ được hiểu trong ngữ cảnh sử dụng chúng. Được hiểu là nhiều kiểu gen HBV là đã biết. Do đó, tác nhân dsARN được thiết kế để bổ sung hoàn toàn với một kiểu gen HBV có thể không bổ sung hoàn toàn với tất cả các kiểu gen HBV. Tác nhân dsARN gắn đích một vị trí cụ thể là hữu hiệu trong việc bất hoạt đích trong số nhiều kiểu gen mà không bổ sung hoàn toàn trong số tất cả các kiểu gen.

Như được sử dụng ở đây, polynucleotit mà “gần như bổ sung với ít nhất một phần của” ARN thông tin (mRNA) đề cập đến polynucleotit mà gần như bổ sung với phần liên tục của mARN cần quan tâm (ví dụ, mARN mã hóa gen HBV). Ví dụ, polynucleotit bổ sung với ít nhất là một phần của HBV mARN nếu trình tự này gần như bổ sung với phần liên tục của mARN mã hóa gen HBV.

Theo đó, theo một số phương án, polynucleotit chuỗi đối nghĩa được mô tả ở đây là bổ sung hoàn toàn với trình tự HBV đích. Trong một số phương án khác, polynucleotit chuỗi đối nghĩa được mô tả ở đây là gần như bổ sung với trình tự HBV đích và chứa trình tự nucleotit liên tục mà bổ sung ít nhất là 80% trên toàn bộ chiều dài của nó với vùng tương đương của trình tự nucleotit của SEQ ID NO:1, hoặc một đoạn của SEQ ID NO:1, như bổ sung ít nhất là 80%, 85%, 90%, hoặc 95%.

Theo một số phương án, tác nhân dsARN theo sáng chế bao gồm chuỗi có nghĩa gần như bổ sung với polynucleotit đối nghĩa mà, polynucleotit đối nghĩa này lại bổ sung với trình tự HBV đích, và trong đó polynucleotit chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit liên tục mà bổ sung ít nhất là 80% trên toàn bộ chiều dài của nó với vùng tương đương của trình tự nucleotit của SEQ ID NO:2, như bổ sung ít nhất là 85%, 90%, hoặc 95%.

Theo một số phương án, tác nhân dsARN bao gồm chuỗi đối nghĩa gần như bổ sung với trình tự HBV đích và chứa trình tự nucleotit liên tục mà bổ sung ít nhất là 80% trên toàn bộ chiều dài của nó với vùng tương đương của trình tự nucleotit của bất kỳ một trong các trình tự nucleotit có nghĩa trong Bảng 2, hoặc một đoạn của bất kỳ một trong các trình tự nucleotit có nghĩa trong Bảng 2, như bổ sung ít nhất là 85%, 90%, hoặc 95%.

Như được mô tả chi tiết ở đây, mỗi một hoặc cả hai chuỗi cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều đơn phân không phải ribonucleotit, *ví dụ*, deoxyribonucleotit hoặc nucleotit biến đổi. Ngoài ra, tác nhân dsARN có thể bao gồm ribonucleotit có các biến đổi hóa học. Các biến đổi này có thể bao gồm tất cả các loại biến đổi được mô tả ở đây hoặc đã biết trong lĩnh vực này. Các biến đổi bất kỳ này, như được sử dụng trong tác nhân dsARN, có thể được bao gồm bởi “tác nhân dsARN” cho các mục đích của phần mô tả này và yêu cầu bảo hộ.

Theo một số phương án, phần lớn các nucleotit của mỗi chuỗi là ribonucleotit, nhưng như được mô tả chi tiết ở đây, mỗi một hoặc cả hai chuỗi cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều đơn phân không phải ribonucleotit, *ví dụ*, deoxyribonucleotit hoặc nucleotit biến đổi. Ngoài ra, tác nhân dsARN có thể bao gồm ribonucleotit có các biến đổi hóa học. Các biến đổi này có thể bao gồm tất cả các loại biến đổi được mô tả ở đây hoặc đã biết trong lĩnh vực này. Các biến đổi bất kỳ này, như được sử dụng trong tác nhân dsARN, được bao gồm bởi “tác nhân dsARN” và “tác nhân dsARN” cho các mục đích của phần mô tả này và yêu cầu bảo hộ.

Thuật ngữ “thấp hơn” trong ngữ cảnh mức độ biểu hiện gen HBV hoặc sự sản sinh protein HBV ở đối tượng, hoặc dấu ấn của bệnh hoặc triệu chứng đề cập đến sự giảm có ý nghĩa thống kê đối với mức độ này. Sự giảm có thể là, *ví dụ*, ít nhất là 80%, 85%, 90%, hoặc 95%, hoặc thấp hơn mức phát hiện được đối với phương pháp phát hiện, hoặc nhiều hơn hướng đến hoặc đến mức bình thường (mức này có thể bằng hoặc có thể không bằng 0). Khi theo dõi tình trạng nhiễm HBV, thang log10 thường được sử dụng để mô tả mức kháng nguyên trong máu (*ví dụ*, mức HBsAg trong huyết thanh) hoặc virus trong máu (mức HBV ADN trong huyết thanh). Được hiểu là sự giảm 1 log10 là sự giảm 90% (còn lại 10%), sự giảm 2 log10 là sự giảm 99% (còn lại 1%), v.v. Theo một số phương án, dấu ấn của bệnh được giảm xuống đến thấp hơn mức phát hiện được. Theo một số phương án, các phương pháp này bao gồm tác dụng ức chế phù hợp về mặt lâm sàng sự biểu hiện của HBV, *ví dụ*, như được chứng minh bằng kết quả phù hợp về mặt lâm sàng sau khi điều trị cho đối tượng bằng tác nhân làm giảm sự biểu hiện của HBV. Theo một số phương án, tác dụng ức chế ít nhất một phần sự biểu hiện của gen HBV được đánh giá bằng sự giảm lượng HBV mRNA, mà có thể được phân lập từ hoặc được phát hiện trong tế bào hoặc nhóm tế bào thứ nhất mà trong đó gen HBV được phiên mã và đã được điều trị sao cho sự biểu hiện của gen HBV bị ức chế, so với tế bào hoặc

nhóm tế bào thứ hai gần như giống với tế bào hoặc nhóm tế bào thứ nhất nhưng chưa được điều trị như vậy (tế bào đối chứng).

Theo một số phương án, “hạ xuống” hoặc “làm giảm” được hiểu là hạ xuống hoặc làm giảm mức hướng đến hoặc đến mức bình thường, *nghĩa là*, bình thường hóa mức. Theo một số phương án, sự biểu hiện của đích được bình thường hóa đến mức chấp nhận được nằm trong khoảng bình thường đối với cá thể không mắc rối loạn này, *ví dụ*, mức của dấu ấn bệnh, như, ALT hoặc AST, được giảm xuống đến mức chấp nhận được nằm trong khoảng bình thường đối với cá thể không mắc rối loạn này. Khi mức liên quan đến bệnh được tăng lên so với mức bình thường, sự thay đổi này được tính từ mức bình thường trên (ULN). Khi mức liên quan đến bệnh được giảm so với mức bình thường, sự thay đổi này được tính từ mức bình thường thấp (LLN). Tác dụng làm giảm là tỷ lệ phần trăm chênh lệch của sự thay đổi giữa giá trị của đối tượng và giá trị bình thường. Ví dụ, mức AST bình thường có thể được báo cáo là 10 đến 40 đơn vị mỗi lit. Nếu đối tượng có mức AST là 200 đơn vị mỗi lit, *nghĩa là*, gấp 5 lần ULN, cao hơn mức bình thường cao 160 đơn vị mỗi lit trước khi điều trị, có mức AST là 120 đơn vị mỗi lit, *nghĩa là*, gấp 3 lần ULN, cao hơn mức bình thường cao 80 đơn vị mỗi lit sau khi điều trị, AST gia tăng được làm giảm 50% hướng đến bình thường (80/160).

Một ví dụ khác, mức ALT bình thường được xem là 7 đến 55 đơn vị mỗi lit (U/L), dẫn đến mức bình thường cao là 55 U/L. Đối tượng có mức ALT là 100 U/L trước khi điều trị (cao hơn mức bình thường cao 45 U/L) và 75 U/L sau khi điều trị (giảm đi 25 U/L), ALT của đối tượng được làm giảm 55% hướng đến mức bình thường ( $25/45 \times 100\%$ ). Như được sử dụng ở đây, nếu bệnh liên quan đến giá trị tăng đối với triệu chứng, “bình thường” được xem là mức bình thường cao. Nếu bệnh liên quan đến giá trị giảm đối với triệu chứng, “bình thường” được xem là mức bình thường thấp.

Cụm từ “cho tế bào tiếp xúc với tác nhân dsARN,” như dsARN, như được sử dụng ở đây, bao gồm cho tế bào tiếp xúc bằng phương pháp có thể bất kỳ. Cho tế bào tiếp xúc với tác nhân dsARN bao gồm cho tế bào tiếp xúc in vitro với tác nhân dsARN hoặc cho tế bào tiếp xúc in vivo với tác nhân dsARN. Việc tiếp xúc này có thể được thực hiện trực tiếp hoặc gián tiếp. Do đó, ví dụ, tác nhân dsARN có thể được đặt vào sự tiếp xúc vật lý với tế bào bằng việc cá thể thực hiện phương pháp, hoặc theo cách khác, tác nhân dsARN có thể được đặt vào tình huống mà sẽ cho phép hoặc làm cho nó sau đó trở nên 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 dsARN. Việc cho tế bào tiếp xúc *in vivo* có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách tiêm tác nhân dsARN vào hoặc vào gần mô mà tế bào này nằm trong đó, hoặc bằng cách tiêm tác nhân dsARN vào vùng khác, ví dụ, dòng máu hoặc khoang dưới da, sao cho tác nhân này sau đó sẽ đi đến mô mà tế bào được cho tiếp xúc nằm trong đó. Ví dụ, tác nhân dsARN có thể chứa hoặc được kết hợp với phối tử, ví dụ, GalNAc<sub>3</sub>, mà điều khiển tác nhân dsARN đến vị trí quan tâm, ví dụ, gan. Sự kết hợp các phương pháp cho tiếp xúc *in vitro* và *in vivo* cũng là khả thi. Ví dụ, tế bào cũng có thể được cho tiếp xúc *in vitro* với tác nhân dsARN và sau đó được cấy vào đối tượng.

Theo một số phương án, việc cho tế bào tiếp xúc với tác nhân dsARN bao gồm “đưa vào” hoặc “phân phối tác nhân dsARN vào tế bào” bằng cách tạo thuận lợi cho hoặc thực hiện việc hấp thu hoặc hấp thụ vào trong tế bào. Sự hấp thụ hoặc hấp thu tác nhân dsARN có thể xảy ra nhờ quá trình khuếch tán không được hỗ trợ hoặc quá trình tế bào chủ động, hoặc bằng chất hoặc thiết bị hỗ trợ. Việc đưa tác nhân dsARN vào trong tế bào có thể là *in vitro* hoặc *in vivo*. Ví dụ, để đưa vào *in vivo*, tác nhân dsARN có thể được tiêm vào vị trí mô hoặc được sử dụng toàn thân. Việc đưa *in vitro* vào tế bào bao gồm các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này như xung điện và chuyển gen bằng liposom. Các phương pháp khác được mô tả dưới đây hoặc đã biết trong lĩnh vực này.

Như được sử dụng ở đây, “đối tượng” là động vật, như động vật có vú, bao gồm động vật có vú bất kỳ có thể bị nhiễm HBV, ví dụ, linh trưởng (như người, linh trưởng không phải người, ví dụ, khỉ, hoặc tinh tinh), hoặc động vật được xem là mô hình lâm sàng được chấp nhận của sự nhiễm HBV, mô hình chuột HBV-AAV (xem, ví dụ, Yang *et al.* (2014) *Cell và Mol Immunol* 11:71) hoặc mô hình chuột chuyển gen HBV 1.3xfs (Guidotti *et al.* (1995) *J. Virol.* 69:6158). Theo một số phương án, đối tượng này bị nhiễm virus viêm gan B (HBV). Theo một số phương án, đối tượng này vừa bị nhiễm virus viêm gan B (HBV) vừa bị nhiễm virus viêm gan D (HDV). Theo một số phương án, đối tượng này là người, như người bị nhiễm HBV, cụ thể là bị nhiễm virus viêm gan B (HBV) mạn tính.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “điều trị” hoặc “việc điều trị” đề cập đến kết quả mong muốn hoặc có lợi bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sự cải thiện hoặc làm giảm một hoặc nhiều dấu hiệu hoặc triệu chứng liên quan đến sự biểu hiện gen HBV

hoặc sao chép HBV không mong muốn, *ví dụ*, sự có mặt của HBV cccADN trong huyết thanh; sự có mặt của HBV ADN trong huyết thanh; sự có mặt của kháng nguyên HBV trong gan hoặc huyết thanh, *ví dụ*, HBsAg hoặc HBeAg; ALT tăng; AST tăng (khoảng bình thường được xem là khoảng 10 đến 34 U/L); kháng thể kháng HBV không có mặt hoặc ở mức thấp, tổn thương gan; xơ gan; viêm gan delta, viêm gan B cấp tính; viêm gan B bạo phát cấp tính; bệnh viêm gan B mạn tính; xơ hóa gan; bệnh gan giai đoạn cuối; bệnh ung thư biểu mô tế bào gan; hội chứng giống bệnh huyết thanh; chứng biếng ăn; buồn nôn; nôn, cảm lạnh; đau cơ; mệt mỏi; khúu giác và sự nhạy bén vị giác bị rối loạn (không thích thức ăn và thuốc lá); đau thượng vị và phần tư phía trên bên phải bụng (từng cơn, nhẹ đến vừa); bệnh não gan; chứng buồn ngủ; rối loạn giấc ngủ; lú lẫn; hôn mê; cổ trướng; xuất huyết tiêu hóa; rối loạn đông máu; bệnh vàng da; chứng gan to (gan mềm, to nhẹ); lá lách lớn; dấu lòng bàn tay son; dấu sao mạch; mất cơ; dấu sao mạch; bệnh viêm mạch; xuất huyết giãn tĩnh mạch; phù ngoại vi; bệnh vú to ở đàn ông; chứng teo tinh hoàn; các tĩnh mạch bên ở bụng (dấu hiệu cây cọ); mức ALT cao hơn mức AST; các mức gamma-glutamyl transpeptidaza (GGT) (khoảng bình thường thường được xem là khoảng từ 8 đến 65 U/L) và phosphatasa kiềm (ALP) (khoảng bình thường thường được xem là khoảng 44 đến 147 IU/L (đơn vị quốc tế mỗi lít), không quá 3 lần ULN) tăng; các mức albumin hơi thấp; mức nồng độ sắt trong huyết thanh tăng; chứng giảm bạch cầu (*nghĩa là*, chứng giảm bạch cầu hạt); tăng lympho bào; tốc độ lắng hồng cầu tăng (ESR); thời gian sống của hồng cầu ngắn; bệnh tan máu; chứng giảm tiểu cầu; sự kéo dài tỷ lệ chuẩn hóa quốc tế (INR); sự có mặt của HBsAg, HBeAg, kháng thể lõi viêm gan B (anti-HBc) globulin miễn dịch M (IgM) trong huyết thanh hoặc gan; sự có mặt của kháng thể bề mặt viêm gan B (anti-HBs), kháng thể e viêm gan B (anti-HBe), hoặc HBV ADN; các mức bilirubin tăng; chứng tăng globulin huyết; sự có mặt của kháng thể không đặc hiệu mô, như kháng thể kháng cơ trơn (ASMA) hoặc kháng thể kháng nhân (ANAs) (10-20%); sự có mặt của kháng thể đặc hiệu mô, như kháng thể kháng tuyến giáp (10-20%); các mức tăng của yếu tố dạng thấp (RF); số lượng tế bào bạch cầu và tiểu cầu thấp; tiểu thùy, có các thay đổi về thoái hóa và tái tạo tế bào gan, và tình trạng viêm kèm theo; và hoại tử phần lớn trung tâm tiểu thùy gan, dù phát hiện được hoặc chưa phát hiện được. Khả năng phát triển bệnh xơ gan giảm, *ví dụ*, khi cá thể có một hoặc nhiều yếu tố nguy cơ của bệnh xơ gan, *ví dụ*, tình trạng nhiễm virus viêm gan B mạn tính, dù không phát triển bệnh xơ gan hoặc phát triển thành bệnh xơ gan với

mức độ nghiêm trọng thấp hơn so với quần thể có cùng yếu tố nguy cơ và không nhận được điều trị như được mô tả ở đây. Sự không phát triển thành bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng hoặc sự giảm phát triển dấu hiệu hoặc triệu chứng liên quan đến bệnh, rối loạn hoặc tình trạng này (*ví dụ*, bằng lượng thích hợp lâm sàng), hoặc sự biểu hiện các dấu hiệu hoặc triệu chứng chậm lại (*ví dụ*, nhiều ngày, nhiều tuần, nhiều tháng hoặc nhiều năm) được xem là tác dụng phòng bệnh hữu hiệu. “Điều trị” còn có nghĩa là kéo dài sự sống so với thời gian sống dự kiến khi không được điều trị. Tác dụng phòng bệnh có thể đòi hỏi phải sử dụng nhiều hơn một liều.

Trong các phương án được ưu tiên, việc điều trị nhiễm HBV gây ra “tác dụng chữa khỏi về mặt chức năng” bệnh viêm gan B. Như được sử dụng ở đây, việc chữa khỏi về mặt chức năng được hiểu là sự đào thải HBsAg tuần hoàn và tốt hơn là kèm theo sự chuyển đổi sang trạng thái trong đó các kháng thể HBsAg trở nên phát hiện được bằng cách sử dụng thử nghiệm thích hợp về mặt lâm sàng. Ví dụ, các kháng thể phát hiện được có thể bao gồm tín hiệu cao hơn 10 mIU/ml như được đo bằng Thử nghiệm miễn dịch vi hạt hóa phát quang (CMIA) hoặc thử nghiệm miễn dịch bất kỳ khác được gọi là sự chuyển hóa huyết thanh kháng HBs. Tác dụng chữa khỏi về mặt chức năng không đòi hỏi sự đào thải tất cả các dạng sao chép của HBV (*ví dụ*, cccADN từ gan). Sự chuyển hóa huyết thanh kháng HBs xảy ra tự phát ở khoảng 0,2-1% bệnh nhân bị nhiễm mạn tính hàng năm. Tuy nhiên, ngay cả sau chuyển hóa huyết thanh kháng HBs, sự tồn tại dai dẳng của mức HBV thấp vẫn được quan sát thấy trong nhiều thập kỷ chỉ ra rằng chỉ xuất hiện tác dụng chữa khỏi về mặt chức năng mà không phải tác dụng chữa khỏi hoàn toàn. Không bị ràng buộc vào cơ chế, được đề xuất là hệ miễn dịch có thể giữ HBV trong tầm kiểm soát. Tác dụng chữa khỏi về mặt chức năng cho phép gián đoạn việc điều trị bất kỳ đối với tình trạng nhiễm HBV. Tuy nhiên, được hiểu là “tác dụng chữa khỏi về mặt chức năng” đối với tình trạng nhiễm HBV có thể không đủ để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng gây ra bởi sự nhiễm HBV, *ví dụ*, bệnh xơ hóa gan, HCC, chứng xơ gan.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “bệnh do virus viêm gan B” hoặc “bệnh do HBV,” là bệnh hoặc rối loạn bị gây ra bởi, hoặc liên quan đến sự sao chép hoặc nhiễm HBV. Thuật ngữ “bệnh do HBV” bao gồm bệnh, tình trạng hoặc rối loạn mà sẽ có lợi nếu làm giảm sự biểu hiện hoặc sao chép gen HBV. Các ví dụ không giới hạn về bệnh do HBV bao gồm, ví dụ, bệnh nhiễm virus viêm gan D, bệnh viêm gan delta, bệnh viêm

gan B cấp tính; bệnh viêm gan B bùng phát cấp tính; bệnh viêm gan B mạn tính; bệnh xơ gan; bệnh gan giai đoạn cuối; và bệnh ung thư biểu mô tế bào gan.

Theo một số phương án, bệnh do HBV là bệnh nhiễm virus viêm gan D. Virus viêm gan D hoặc virus viêm gan delta (HDV) làm mầm bệnh ở người. Tuy nhiên, virus này bị lỗi và phụ thuộc vào các chức năng trợ giúp bắt buộc được cung cấp bởi virus viêm gan B (HBV) để lây truyền; thật vậy, HDV cần có sự nhiễm HBV đã tồn tại trước đó hoặc kèm theo để trở nên lây nhiễm và phát triển, cụ thể là, màng bọc virus chứa kháng nguyên bề mặt của viêm gan B. HDV có thể dẫn đến các dạng mạn tính và cấp tính trầm trọng của bệnh gan liên quan đến HBV. Sự nhiễm bệnh viêm gan D hoặc bệnh viêm gan delta có khả năng cao phát triển thành dịch địa phương đối với một số nước châu Phi, vùng Amazon, và Trung Đông, trong khi mức độ phổ biến của nó thấp ở các nước công nghiệp, ngoại trừ ở Địa Trung Hải.

Sự lây truyền HDV có thể xảy ra *thông qua* sự nhiễm đồng thời HBV (đồng nhiễm) hoặc chồng lên bệnh viêm gan B mạn tính hoặc trạng thái người mang bệnh viêm gan B (siêu nhiễm). Cả siêu nhiễm và đồng nhiễm HDV đều gây ra các biến chứng nặng hơn so với nhiễm một mình HBV. Các biến chứng này bao gồm khả năng suy gan cao hơn ở tình trạng nhiễm cấp tính và diễn biến nhanh thành bệnh xơ gan, với khả năng phát triển thành ung thư gan tăng ở tình trạng nhiễm mạn tính. Kết hợp với virus viêm gan B, bệnh viêm gan D có tỷ lệ tử vong cao nhất trong số các bệnh viêm gan, là 20%.

Theo một số phương án, bệnh do HBV là bệnh viêm gan B cấp tính. Bệnh viêm gan B cấp tính bao gồm viêm gan kéo dài dưới sáu tháng. Các triệu chứng điển hình của bệnh viêm gan B cấp tính là mệt mỏi, biếng ăn, buồn nôn, và nôn. Các trị số aminotransferaza rất cao ( $>1000$  U/L) và sự tăng bilirubin huyết thường được quan sát thấy. Các ca nghiêm trọng của bệnh viêm gan B cấp tính có thể diễn biến nhanh thành suy gan cấp tính, được đặc trưng bởi chức năng tổng hợp của gan kém. Điều này thường được xác định bằng thời gian prothrombin (PT) là 16 giây hoặc tỷ lệ chuẩn hóa quốc tế (INR) là 1,5 khi không có bệnh gan trước đó. Bệnh viêm gan B cấp tính có thể phát triển thành bệnh viêm gan B mạn tính.

Theo một số phương án, bệnh do HBV là bệnh viêm gan mạn tính. Bệnh viêm gan B mạn tính (CHB) bao gồm tình trạng viêm gan kéo dài hơn sáu tháng. Các đối tượng mắc CHB dương tính với HBsAg và có nồng độ virus huyết cao ( $\geq 10^4$  bản sao HBV-ADN / ml máu) hoặc nồng độ virus huyết thấp ( $< 10^3$  bản sao HBV-ADN / ml

máu). Theo một số phương án, các đối tượng đã bị nhiễm HBV trong ít nhất là năm năm. Theo một số phương án, các đối tượng đã bị nhiễm HBV trong ít nhất là mười năm. Theo một số phương án, các đối tượng bị nhiễm HBV ngay lúc mới sinh. Các đối tượng mắc bệnh viêm gan B mạn tính có thể dung nạp miễn dịch hoặc có sự nhiễm mạn tính không hoạt động mà không có bằng chứng bất kỳ về bệnh hoạt động, và họ cũng không có triệu chứng. Các bệnh nhân mắc bệnh viêm gan hoạt động mạn tính, đặc biệt trong giai đoạn sao chép, có thể có các triệu chứng tương tự với các triệu chứng của bệnh viêm gan cấp tính. Các đối tượng mắc bệnh viêm gan B mạn tính có thể có sự nhiễm mạn tính hoạt động kèm theo bệnh viêm gan hoại tử, có sự quay vòng tế bào gan tăng khi không có mặt sự viêm hoại tử phát hiện được, hoặc có sự nhiễm mạn tính không hoạt động mà không có bằng chứng bất kỳ về bệnh hoạt động, và họ cũng không có triệu chứng. Sự tồn tại dai dẳng của tình trạng nhiễm HBV ở đối tượng CHB là kết quả của cccHBV ADN. Theo một số phương án, đối tượng mắc CHB dương tính với HBeAg. Theo một phương án khác, đối tượng mắc CHB âm tính với HBeAg. Các đối tượng mắc CHB có mức HBV ADN huyết thanh nhỏ hơn  $10^5$  và sự tăng bền vững transaminaza, ví dụ ALT, AST, và gamma-glutamyl transferaza. Đối tượng mắc CHB có thể có điểm sinh thiết gan nhỏ hơn 4 (ví dụ, điểm số về viêm hoại tử).

Theo một số phương án, bệnh do HBV là bệnh viêm gan B bùng phát cấp tính. Đối tượng mắc bệnh viêm gan B bùng phát cấp tính có các triệu chứng của bệnh viêm gan cấp tính và các triệu chứng khác là lú lẫn hoặc hôn mê (do gan mất khả năng khử độc các chất hóa học) và bầm tím hoặc xuất huyết (do thiếu yếu tố đông máu).

Các đối tượng mắc tình trạng nhiễm HBV, ví dụ, CHB, có thể phát triển bệnh xơ hóa gan. Do đó, theo một số phương án, bệnh do HBV là bệnh xơ hóa gan. Bệnh xơ hóa gan, hoặc bệnh xơ gan, được xác định về mặt mô học là quá trình gan lan tỏa đặc trưng bởi sự xơ hóa (mô liên kết xơ hóa quá mức) và sự chuyển hóa cấu trúc gan bình thường thành các u nhỏ bất thường về mặt cấu trúc.

Các đối tượng mắc tình trạng nhiễm HBV, ví dụ, CHB, có thể phát triển thành bệnh gan giai đoạn cuối. Theo đó, trong một số phương án, bệnh do HBV là bệnh gan giai đoạn cuối. Ví dụ, bệnh xơ gan có thể diễn biến đến thời điểm mà cơ thể không còn khả năng bù được cho, ví dụ, chức năng gan suy giảm, do bệnh xơ hóa gan (nghĩa là, gan mất bù), và dẫn đến, ví dụ, các triệu chứng về thần kinh và tâm thần và suy gan.

Các đối tượng mắc tình trạng nhiễm HBV, *ví dụ*, CHB, có thể phát triển thành bệnh ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), còn được gọi là bệnh ung thư gan ác tính. Do đó, trong một số phương án, bệnh do HBV là HCC. HCC thường phát triển ở các đối tượng mắc CHB và có thể là tế bào xơ đét, giả tuyến (phì đại), đa hình (tế bào không lồ), hoặc tế bào sáng.

“Rối loạn liên quan đến HDV” hoặc “rối loạn liên quan đến virus viêm gan D” là bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự biểu hiện của HDV. Các rối loạn liên quan đến HDV điển hình bao gồm tình trạng nhiễm virus viêm gan B, bệnh viêm gan B cấp tính, bệnh viêm gan D cấp tính; bệnh viêm gan D bùng phát cấp tính; bệnh viêm gan mạn tính D; bệnh xơ hóa gan; bệnh gan giai đoạn cuối; và bệnh ung thư biểu mô tế bào gan.

“Lượng hữu hiệu điều trị”, như được sử dụng ở đây, được dự định bao gồm lượng tác nhân dsARN mà, khi được sử dụng cho bệnh nhân để điều trị cho đối tượng mắc tình trạng nhiễm HBV hoặc bệnh do HBV, là đủ để gây ra tác dụng điều trị bệnh này (*ví dụ*, bằng cách làm giảm hoặc duy trì bệnh hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh đang tồn tại). “Lượng hữu hiệu điều trị” có thể thay đổi tùy theo tác nhân dsARN, cách mà tác nhân này được sử dụng, bệnh và mức độ nghiêm trọng của nó, và tiền sử, tuổi, cân nặng, tiền sử gia đình, sự hình thành cấu trúc gen, giai đoạn của quá trình bệnh lý gây ra bởi sự biểu hiện gen HBV, loại phương pháp điều trị đồng thời hoặc trước đó, nếu có, và các đặc điểm riêng khác của bệnh nhân được điều trị. Lượng hữu hiệu điều trị có thể đòi hỏi việc sử dụng nhiều hơn một liều.

“Lượng hữu hiệu điều trị” còn bao gồm lượng tác nhân dsARN gây ra một số tác dụng mong muốn ở tỷ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý có thể áp dụng cho phương pháp điều trị bất kỳ. Tác nhân dsARN được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng với lượng đủ để gây ra tỷ lệ lợi ích/nguy cơ hợp lý có thể áp dụng cho phương pháp điều trị này.

Thuật ngữ “mẫu”, như được sử dụng ở đây, bao gồm tập hợp các dịch, các tế bào, hoặc mô tương tự được phân lập từ đối tượng, cũng như dịch, tế bào hoặc mô có mặt ở đối tượng. Ví dụ về các dịch sinh học bao gồm máu, huyết thanh, và dịch màng huyết thanh, huyết tương, bạch huyết, nước tiểu, nước bọt và tương tự. Các mẫu mô có thể bao gồm các mẫu từ mô, cơ quan hoặc các vùng khu trú. Ví dụ, các mẫu có thể thu được từ các cơ quan cụ thể, các phần của các cơ quan, hoặc dịch hoặc tế bào nằm trong các cơ quan đó. Theo một số phương án, các mẫu có thể thu được từ gan (*ví dụ*, gan nguyên

vện hoặc các mảnh của gan hoặc một số loại tế bào trong gan, như, *ví dụ*, tế bào gan). Trong các phương án được ưu tiên, “mẫu thu được của đối tượng” đề cập đến máu, hoặc huyết tương hoặc huyết thanh thu được từ máu lấy từ đối tượng. Trong các phương án khác, “mẫu thu được của đối tượng” đề cập đến mô gan (hoặc thành phần của nó) hoặc mô máu (hoặc thành phần của nó, *ví dụ*, huyết thanh) thu được từ đối tượng.

## II. Tác nhân dsARN

Sáng chế đề xuất tác nhân dsARN ức chế sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen HBV. Theo một số phương án, tác nhân dsARN bao gồm các phân tử axit ribonucleic chuỗi kép (dsARN) để ức chế sự biểu hiện của gen HBV trong tế bào, như tế bào ở đối tượng, *ví dụ*, động vật có vú, như người mắc bệnh do HBV, *ví dụ*, bệnh viêm gan B mạn tính. Tác nhân dsARN bao gồm chuỗi đối nghĩa có vùng bổ sung mà bổ sung với ít nhất là một phần của mARN được tạo thành trong quá trình biểu hiện gen HBV. Vùng bổ sung này dài khoảng 19-21 nucleotit. Khi tiếp xúc với tế bào biểu hiện gen HBV, tác nhân dsARN ức chế sự biểu hiện của gen HBV ít nhất là 80% như được thử nghiệm bằng, *ví dụ*, PCR hoặc phương pháp dựa trên ADN phân nhánh (bADN), hoặc bằng phương pháp dựa trên protein, như bằng phân tích miễn dịch huỳnh quang, sử dụng, *ví dụ*, kỹ thuật thấm tách western hoặc kỹ thuật đo tế bào theo dòng. Trong các phương án được ưu tiên, tỷ lệ phần trăm ức chế được xác định bằng cách sử dụng phương pháp PCR thời gian thực được cung cấp trong Ví dụ 2 sử dụng dòng tế bào được cung cấp ở đây cùng với tác nhân dsARN được sử dụng ở nồng độ 10 nM trong việc chuyển nhiễm.

dsARN bao gồm hai chuỗi ARN mà bổ sung và lai để tạo ra cấu trúc kép trong các điều kiện trong đó dsARN sẽ được sử dụng. Một chuỗi của dsARN (chuỗi đối nghĩa) bao gồm vùng bổ sung mà gần như bổ sung, và thường là bổ sung hoàn toàn, với trình tự đích. Tuy nhiên, do các thay đổi trình tự giữa các kiểu gen HBV, dsARN có thể bổ sung hoàn toàn với một số, nhưng không phải là tất cả các kiểu gen HBV. Trình tự đích có thể thu được từ trình tự của mARN được tạo ra trong quá trình biểu hiện của gen HBV. Chuỗi còn lại (chuỗi có nghĩa) bao gồm vùng bổ sung với chuỗi đối nghĩa, sao cho hai chuỗi này lai và tạo thành cấu trúc kép khi được kết hợp trong các điều kiện thích hợp. Như được mô tả ở các phần khác và như đã biết trong lĩnh vực này, các trình tự bổ sung của dsARN cũng có thể được bao gồm như các vùng tự bổ sung của một phân tử axit nucleic duy nhất, mà không phải nằm trên các oligonucleotit riêng biệt.

Nói chung, cấu trúc kép này dài 19-21 cặp bazơ, ví dụ, dài 19, 20, hoặc 21 cặp bazơ.

Tương tự, vùng bổ sung với trình tự đích dài 19-23 nucleotit, *ví dụ*, dài 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-23, 20-22, 20-21, 21-22, 19, 20, 21, 22, hoặc 23 nucleotit. Theo một số phương án, vùng bổ sung này dài 21 nucleotit. Như người có hiểu biết trung bình cũng sẽ nhận ra, vùng ARN được gắn đích để cắt thường sẽ là một phần của phân tử ARN lớn hơn, thường là phân tử mARN. Nếu thích hợp, “một phần” của đích mARN là trình tự liên tục của đích mARN có chiều dài đủ để cho phép nó là cơ chất cho sự cắt được điều khiển bởi ARNi (nghĩa là, cắt bằng con đường RISC).

Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ nhận ra vùng kép này là phần chức năng chính của dsARN, ví dụ, vùng kép chứa khoảng 19-21 cặp bazơ, ví dụ, 19-21, 19-20, 20-21, 19, 20, hoặc 21 cặp bazơ. Theo một số phương án, vùng kép này là 19 cặp bazơ.

dsARN như được mô tả ở đây có thể còn bao gồm một hoặc nhiều nucleotit nhô ra chuỗi đơn, *ví dụ*, 1 hoặc 2 nucleotit. Nucleotit nhô ra có thể chứa hoặc gồm chất tương tự nucleotit/nucleosit, bao gồm deoxynucleotit/nucleosit. (Các) trình tự nhô ra có thể nằm trên chuỗi có nghĩa, chuỗi đối nghĩa, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Ngoài ra, (các) nucleotit của trình tự nhô ra có thể nằm trên đầu 5', đầu 3', hoặc cả hai đầu của một hoặc cả hai chuỗi đối nghĩa hoặc có nghĩa của dsARN. Theo một số phương án, dsARN bao gồm 2-nucleotit nhô ra trên đầu 3' của chuỗi đối nghĩa.

dsARN có thể được tổng hợp bằng các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực này như được thảo luận thêm dưới đây, *ví dụ*, bằng cách sử dụng chất tổng hợp ADN tự động, như đã có trên thị trường của, ví dụ, Biosearch, Applied Biosystems™, Inc. Các phương pháp tổng hợp dsARNs để sử dụng trong các dược phẩm cũng đã biết trong lĩnh vực này.

Các hợp chất là tác nhân dsARN theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách sử dụng quy trình hai bước. Trước hết, từng chuỗi của phân tử ARN chuỗi kép được tạo ra riêng biệt. Sau đó, các chuỗi thành phần được bắt cặp. Từng chuỗi của hợp chất là tác nhân dsARN có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp hữu cơ pha dung dịch hoặc pha rắn hoặc cả hai. Phương pháp tổng hợp hữu cơ có ưu điểm là các chuỗi oligonucleotit chứa nucleotit không tự nhiên hoặc biến đổi có thể được tạo ra dễ

dàng. Các oligonucleotit chuỗi đơn theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp hữu cơ pha dung dịch hoặc pha rắn hoặc cả hai.

Theo một số phương án, tác nhân dsARN theo sáng chế bao gồm ít nhất là hai trình tự nucleotit, trình tự chuỗi có nghĩa và trình tự chuỗi đối nghĩa. Chuỗi có nghĩa có thể chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm bất kỳ một trong số các trình tự nucleotit chuỗi có nghĩa của bất kỳ một trong các chuỗi kép trong Bảng 2. Chuỗi đối nghĩa có thể chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm bất kỳ một trong số các trình tự nucleotit chuỗi đối nghĩa của bất kỳ một trong các chuỗi kép trong Bảng 2. Theo một số phương án, tác nhân dsARN không phải là AD-66810.

Theo một số phương án, tác nhân dsARN theo sáng chế chứa, chủ yếu chứa, hoặc bao gồm chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa, như được chỉ ra trong Bảng 2.

### III. Tác nhân dsARN biến đổi

Theo một số phương án, ARN của tác nhân dsARN theo sáng chế không được biến đổi và không chứa, *ví dụ*, các biến đổi hóa học hoặc các liên hợp đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả ở đây. Trong các phương án khác, ARN của tác nhân dsARN theo sáng chế được biến đổi hóa học để làm tăng độ ổn định hoặc các tính chất có lợi khác. Theo một số phương án theo sáng chế, gần như toàn bộ các nucleotit của tác nhân dsARN theo sáng chế được biến đổi. Theo một số phương án theo sáng chế, toàn bộ các nucleotit của tác nhân dsARN hoặc gần như toàn bộ các nucleotit của tác nhân dsARN được biến đổi, *nghĩa là*, không nhiều hơn 5, 4, 3, 2, hoặc 1 nucleotit không biến đổi có mặt trong một chuỗi của tác nhân dsARN.

Các axit nucleic được mô tả trong sáng chế có thể được tổng hợp hoặc biến đổi bằng các phương pháp đã được thiết lập trong lĩnh vực này, như các phương pháp được mô tả trong “Current protocols in nucleic acid chemistry,” Beaucage, S.L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, các phương pháp này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các biến đổi bao gồm, *ví dụ*, các biến đổi ở đầu cùng, *ví dụ*, các biến đổi ở đầu 5' (phosphoryl hóa, liên hợp, các liên kết đảo) hoặc các biến đổi ở đầu 3' (liên hợp, nucleotit ADN, các liên kết đảo, v.v.); các biến đổi bazơ, *ví dụ*, thay thế bằng các bazơ ổn định, các bazơ làm mất ổn định, hoặc các bazơ mà tạo cặp bazơ với danh mục các đối tác mở rộng, loại bỏ bazơ (nucleotit mất bazơ), hoặc các bazơ liên hợp; các biến đổi đường (*ví dụ*, ở vị trí 2' hoặc vị trí 4') hoặc thay thế đường; hoặc các biến đổi khung, bao gồm các biến đổi hoặc thay thế của các liên kết phosphodiester. Các ví dụ cụ

thể về các hợp chất là tác nhân dsARN hữu ích trong phương án được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở các ARN chứa các khung biến đổi hoặc không có các liên kết tự nhiên giữa các nucleosit. Các ARN có khung biến đổi bao gồm, ngoài các phân tử khác, các ARN không có nguyên tử phospho trong khung. Với các mục đích của phần mô tả này, và đôi khi được đề cập trong lĩnh vực này, ARN biến đổi không có nguyên tử phospho trong khung giữa các nucleosit của chúng cũng có thể được xem là các oligonucleosit. Theo một số phương án, tác nhân dsARN biến đổi sẽ có nguyên tử phospho trong khung giữa các nucleosit của nó.

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

Các patent Mỹ điển hình mô tả việc tạo ra các liên kết chứa phospho trên đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Patent Mỹ số 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,195; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,316; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050; 6,028,188; 6,124,445; 6,160,109; 6,169,170; 6,172,209; 6, 239,265; 6,277,603; 6,326,199; 6,346,614; 6,444,423; 6,531,590; 6,534,639; 6,608,035; 6,683,167; 6,858,715; 6,867,294; 6,878,805; 7,015,315; 7,041,816; 7,273,933; 7,321,029; và Patent Mỹ RE39464, mỗi tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến các phần mô tả phù hợp với các phương pháp điều chế này.

Các khung ARN biến đổi mà không bao gồm nguyên tử phospho trong đó có khung được tạo ra bởi các liên kết giữa các nucleosit alkyl hoặc xycloalkyl mạch ngắn, các hỗn hợp nguyên tử khác loại và các liên kết giữa các nucleosit alkyl hoặc xycloalkyl, hoặc một hoặc nhiều liên kết giữa các nucleosit nguyên tử khác loại hoặc dị vòng mạch ngắn. Các khung ARN này bao gồm các phân tử có các liên kết morpholino (được tạo

ra một phần từ phần đường của nucleosit); các khung siloxan; các khung sulfua, sulfoxit và sulfon; các khung formaxetyl và thioformaxetyl; các khung metylen formaxetyl và thioformaxetyl; các khung chứa alken; các khung sulfamat; các khung metylenimino và metylenhydrazino; các khung sulfonat và sulfonamit; các khung amit; và các khung khác có các bộ phận thành phần hỗn hợp N, O, S, và CH<sub>2</sub>.

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

Các phân tử giả ARN thích hợp được tạo khuôn để sử dụng trong tác nhân dsARN được cung cấp ở đây, trong đó cả đường và liên kết giữa các nucleosit, *nghĩa là*, khung, của các đơn vị nucleotit được thay thế bằng các nhóm mới. Các đơn vị bazơ được duy trì để lai với hợp chất đích axit nucleic thích hợp. Một hợp chất oligome này, trong đó phân tử giả ARN đã được chỉ ra là có các đặc điểm lai tốt được gọi là axit nucleic peptit (PNA). Trong các hợp chất PNA, khung đường của ARN được thay thế bằng khung chứa amit, cụ thể là khung aminoethylglyxin. Các nucleobazơ được giữ lại và được gắn trực tiếp hoặc gián tiếp vào nguyên tử nitơ aza của phần amit của khung này. Các patent Mỹ điển hình mà mô tả quy trình điều chế các hợp chất PNA bao gồm, nhưng không giới hạn ở, patent Mỹ số 5,539,082; 5,714,331; và 5,719,262, mỗi tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến các nội dung liên quan đến các phương pháp này. Các hợp chất PNA bổ sung thích hợp để sử dụng trong tác nhân dsARN theo sáng chế được mô tả trong, ví dụ, trong Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Một số phương án được mô tả trong sáng chế bao gồm các ARN có các khung phosphorothioat và các oligonucleosit có khung nguyên tử khác loại, và cụ thể là --CH<sub>2</sub>--NH--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub>--[được biết là khung metylen (metylimino) hoặc MMI], --CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>-- và --N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>--[trong đó khung phosphodiester tự nhiên được biểu diễn là --O--P--O--CH<sub>2</sub>--] của patent Mỹ số 5,489,677 đã viện dẫn trên đây, và các khung amit của patent Mỹ số

5,602,240 đã viện dẫn trên đây. Theo một số phương án, các ARN được mô tả ở đây có cấu trúc khung morpholino của patent Mỹ số 5,034,506 đã viện dẫn trên đây.

Các ARN biến đổi cũng có thể chứa một hoặc nhiều gốc đường được thế. Tác nhân dsARN được mô tả ở đây có thể bao gồm một trong các nhóm 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 là C<sub>1</sub> đến C<sub>10</sub> alkyl hoặc C<sub>2</sub> đến C<sub>10</sub> alkenyl và alkynyl được thế hoặc không được thế. Các biến đổi thích hợp điển hình bao gồm O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, và O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, trong đó n và m là từ 1 đến khoảng 10. Trong các phương án khác, dsARN bao gồm một trong các nhóm sau đây ở vị trí 2': C<sub>1</sub> đến C<sub>10</sub> alkyl thấp, alkyl thấp được thế, alkaryl, aralkyl, O-alkaryl hoặc O-aralkyl, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heteroxycloalkyl, heteroxycloalkaryl, aminoalkylamino, polyalkylamino, silyl được thế, nhóm cắt ARN, nhóm thông báo, nhóm cài xen, nhóm cải thiện các đặc điểm dược động học của tác nhân dsARN, hoặc nhóm cải thiện các đặc điểm dược lực học của tác nhân dsARN, và các nhóm thế khác có các đặc điểm tương tự. Theo một số phương án, các biến đổi này bao gồm 2'-metoxyetoxy (2'-O--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, còn được biết là 2'-O-(2-methoxyetyl) hoặc 2'-MOE) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), *nghĩa là*, nhóm alkoxy-alkoxy. Biến đổi điển hình khác là 2'-dimethylaminooxyetoxy, *nghĩa là*, nhóm O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, còn được biết là 2'-DMAOE, như được mô tả trong các ví dụ dưới đây, và 2'-dimethylaminoetoxyetoxy (còn được biết trong lĩnh vực này là 2'-O-dimethylaminoetoxyetyl hoặc 2'-DMAEOE), *nghĩa là*, 2'-O--CH<sub>2</sub>--O--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>. Các biến đổi điển hình khác bao gồm: 5'-Me-2'-F nucleotit, 5'-Me-2'-OMe nucleotit, 5'-Me-2'-deoxynucleotit, (cả đồng phân R và S trong ba họ này); 2'-alkoxyalkyl; và 2'-NMA (N-metylaxetamit).

Các biến đổi khác bao gồm 2'-metoxy (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-aminopropoxy (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) và 2'-flo (2'-F). Các biến đổi tương tự cũng có thể được tạo ra ở các vị trí khác trên ARN của tác nhân dsARN, cụ thể là vị trí 3' của đường trên nucleotit đầu cùng 3' hoặc trong dsARN được liên kết 2'-5' và vị trí 5' của nucleotit đầu cùng 5'. Tác nhân dsARN cũng có thể có gốc giả đường như gốc xyclobutyl thay cho đường pentofuranosyl. Patent Mỹ điển hình mô tả quy trình điều chế các cấu trúc đường biến đổi này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, patent Mỹ số 4,981,957; 5,118,800;

5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; và 5,700,920; một số tài liệu này được sở hữu chung cùng với đơn này. Các nội dung của các công bố patent trên đây được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến các phần mô tả liên quan đến các phương pháp này.

Tác nhân dsARN cũng có thể bao gồm các biến đổi hoặc thay thế nucleobazo (thường được gọi đơn giản trong lĩnh vực này là “bazo”). Như được sử dụng ở đây, nucleobazo “không biến đổi” hoặc “tự nhiên” bao gồm các bazo purin adenin (A) và guanin (G), và các bazo pyrimidin thymine (T), xytosin (C), và uraxil (U). Các nucleobazo biến đổi bao gồm các nucleobazo tự nhiên và tổng hợp khác như deoxythymine (dT), 5-methylxytosin (5-me-C), 5-hydroxymethyl xytosin, xanthin, hypoxanthin, 2-aminoadenin, 6-methyl và các dẫn xuất alkyl khác của adenin và guanin, 2-propyl và các dẫn xuất alkyl khác của adenin và guanin, 2-thiouraxil, 2-thiothymine và 2-thioxytosin, 5-halouraxil và xytosin, 5-propynyl uraxil và xytosin, 6-azo uraxil, xytosin và thymine, 5-uraxil (pseudouraxil), 4-thiouraxil, 8-halo, 8-amino, 8-thiol, 8-thioalkyl, 8-hydroxyl anal các adenin và guanin được thế ở vị trí 8 khác, 5-halo, cụ thể là 5-bromo, 5-trifloromethyl và các uraxil và xytosin được thế ở vị trí 5 khác, 7-methylguanin và 7-methyladenin, 8-azaguanin và 8-azaadenin, 7-deazaguanin và 7-daazaadenin, và 3-deazaguanin và 3-deazaadenin. Các nucleobazo khác bao gồm các nucleobazo được mô tả trong patent Mỹ số 3,687,808, các nucleobazo được mô tả trong phần Nucleosit biến đổi trong *Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; các nucleobazo được mô tả trong *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science và Engineering*, trang 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990, các nucleobazo này được mô tả trong *Englisch et al.*, *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, 30, 613, và các nucleobazo được mô tả bởi Sanghvi, Y S., Chương 15, *dsARN Research and Applications*, trang 289-302, Crooke, S. T. và Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Một số trong số các nucleobazo này đặc biệt hữu ích để làm tăng ái lực liên kết của các hợp chất oligome được mô tả trong sáng chế. Các nucleobazo này bao gồm pyrimidin được thế ở vị trí 5, 6-azapyrimidin và purin được thế ở N-2, N-6 và 0-6, bao gồm 2-aminopropyladenin, 5-propynyluraxil và 5-propynylxytosin. Các thay thế 5-methylxytosin đã được chỉ ra là làm tăng độ ổn định của chuỗi kép axit nucleic thêm 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. và Lebleu, B., Eds., *dsARN Research và*

Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, trang 276-278) và là các thay thế bazơ điển hình, đặc biệt hơn nữa là khi được kết hợp với các biến đổi đường 2'-O-metoxyletyl.

Các patent Mỹ điển hình mô tả quy trình điều chế một số trong số các nucleobazơ biến đổi được chỉ ra trên đây cũng như các nucleobazơ biến đổi khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các patent Mỹ đã chỉ ra trên đây 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, mỗi tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến các nội dung liên quan đến các phương pháp này.

Theo một số phương án, ARN của tác nhân dsARN cũng có thể được biến đổi để bao gồm một hoặc nhiều gốc đường hai vòng. “Đường hai vòng” là vòng furanosyl được biến đổi bằng cách tạo cầu nối hai nguyên tử. “Nucleosit hai vòng” (“BNA”) là nucleosit có gốc đường chứa cầu nối hai nguyên tử cacbon của vòng đường, nhờ đó tạo ra hệ vòng hai vòng. Theo một số phương án, cầu nối này nối 4'-cacbon và 2'-cacbon của vòng đường. Do đó, theo một số phương án, tác nhân theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic bị khóa (LNA). Axit nucleic bị khóa là nucleotit có gốc riboza biến đổi, trong đó gốc riboza này chứa cầu nối phụ nối cacbon 2' và 4'. Nói cách khác, LNA là nucleotit chứa gốc đường hai vòng chứa cầu nối 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'. Cấu trúc này “khóa” hiệu quả riboza trong cấu hình cấu trúc 3'-endo. Việc bổ sung axit nucleic bị khóa vào tác nhân dsARN đã được chỉ ra là làm tăng độ ổn định của tác nhân dsARN trong huyết thanh, và làm giảm tác dụng xa đích (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Ví dụ về nucleosit hai vòng để sử dụng trong polynucleotit theo sáng chế bao gồm, không giới hạn ở các nucleosit chứa cầu nối giữa các nguyên tử vòng 4' và 2' ribosyl. Theo một số phương án, tác nhân polynucleotit đối nghĩa theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều nucleosit hai vòng chứa cầu nối 4' đến 2'. Các ví dụ về các nucleosit hai vòng được nối 4' đến 2', bao gồm nhưng không giới hạn ở, 4'-(CH<sub>2</sub>)—O-2' (LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)—S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>—O-2' (ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)—O-2' (còn được gọi là “etyl bị ràng buộc” hoặc “cEt”) và 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)—O-2' (và các chất tương tự của chúng; xem, ví dụ, patent Mỹ số

7,399,845); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)—O-2' (và các chất tương tự của chúng; *xem, ví dụ, patent Mỹ số 8,278,283*); 4'-CH<sub>2</sub>—N(OCH<sub>3</sub>)-2' (và các chất tương tự của chúng; *xem, ví dụ, patent Mỹ số 8,278,425*); 4'-CH<sub>2</sub>—O—N(CH<sub>3</sub>)-2' (*xem, ví dụ, công bố patent Mỹ số 2004/0171570*); 4'-CH<sub>2</sub>—N(R)—O-2', trong đó R là H, C1-C12 alkyl, hoặc nhóm bảo vệ (*xem, ví dụ, patent Mỹ số 7,427,672*); 4'-CH<sub>2</sub>—C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (*xem, ví dụ, Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134*); và 4'-CH<sub>2</sub>—C(=CH<sub>2</sub>)-2' (và các chất tương tự của chúng; *xem, ví dụ, patent Mỹ số 8,278,426*). Nội dung của mỗi tài liệu trên đây phù hợp với các axit nucleic biến đổi được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các patent Mỹ và công bố patent Mỹ điển hình khác mô tả quy trình điều chế các nucleotit axit nucleic bị khóa bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các tài liệu sau đây: Patent Mỹ số 6,268,490; 6,525,191; 6,670,461; 6,770,748; 6,794,499; 6,998,484; 7,053,207; 7,034,133; 7,084,125; 7,399,845; 7,427,672; 7,569,686; 7,741,457; 8,022,193; 8,030,467; 8,278,425; 8,278,426; 8,278,283; US 2008/0039618; và US 2009/0012281, các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến các nội dung liên quan đến các phương pháp này.

Bất kỳ trong số các nucleosit hai vòng trên đây có thể được tạo ra có một hoặc nhiều cấu trúc đường hóa lập thể bao gồm, ví dụ,  $\alpha$ -L-ribofuranoza và  $\beta$ -D-ribofuranoza (*xem WO99/14226*).

ARN của tác nhân dsARN cũng có thể được biến đổi để bao gồm một hoặc nhiều nucleotit chứa etyl bị ràng buộc. Như được sử dụng ở đây, “nucleotit chứa etyl bị ràng buộc” hoặc “cEt” là axit nucleic bị khóa chứa gốc đường hai vòng chứa cầu nối 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'. Theo một số phương án, nucleotit chứa etyl bị ràng buộc là thuộc cấu hình S được gọi ở đây là “S-cEt.”

Tác nhân dsARN theo sáng chế cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều “nucleotit bị giới hạn cấu trúc” (“CRN”). CRN là các chất tương tự nucleotit có liên kết nối cacbon C2' và C4' của riboza hoặc cacbon C3 và C5' của riboza. CRN khóa vòng riboza vào cấu trúc ổn định và làm tăng ái lực lai với mARN. Cầu nối này có độ dài đủ để đặt oxy vào vị trí tối ưu cho độ ổn định và ái lực gây ra sự uốn vòng riboza ít hơn.

Các công bố điển hình mô tả quy trình điều chế một số CRN trong các CRN được chỉ ra trên đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, công bố patent Mỹ số 2013/0190383;

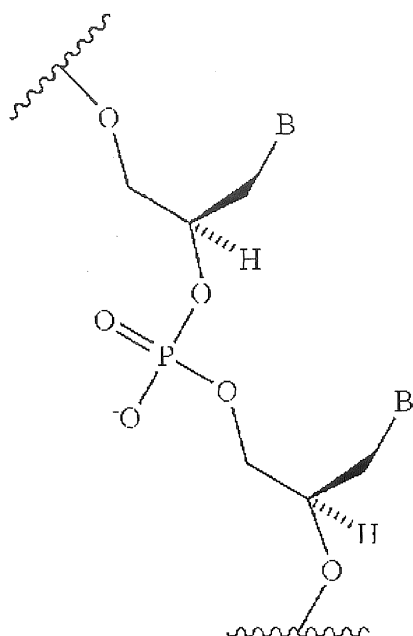
và công bố PCT WO2013/036868, các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến các nội dung liên quan đến các phương pháp này.

Theo một số phương án, tác nhân dsARN theo sáng chế chứa một hoặc nhiều monome là nucleotit UNA (axit nucleic không bị khóa). UNA là axit nucleic không có vòng không bị khóa, trong đó liên kết bất kỳ trong số các liên kết của đường được loại bỏ, tạo ra gốc “đường” không bị khóa. Trong một ví dụ, UNA cũng bao gồm monome có các liên kết giữa C1'-C4' đã được loại bỏ (*nghĩa là*, liên kết cacbon-oxy-cacbon đồng hóa trị giữa cacbon C1' và C4'). Trong một ví dụ khác, liên kết C2'-C3' (*nghĩa là*, liên kết cacbon-cacbon đồng hóa trị giữa cacbon C2' và C3') của đường đã được loại bỏ (*xem Nuc. Acids Symp. Series, 52, 133-134 (2008) và Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039*, các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến các nội dung liên quan đến nucleotit axit nucleic không bị khóa).

Các công bố patent Mỹ điển hình mô tả quy trình điều chế UNA bao gồm, nhưng không giới hạn ở, patent Mỹ số 8,314,227; và công bố patent Mỹ số 2013/0096289; 2013/0011922; và 2011/0313020, các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến các nội dung liên quan đến các phương pháp này.

Các biến đổi có khả năng làm ổn định đối với các đầu cùng của phân tử ARN có thể bao gồm N-(axetylaminocaproyl)-4-hydroxyprolinol (Hyp-C6-NHAc), N-(caproyl-4-hydroxyprolinol (Hyp-C6), N-(axetyl-4-hydroxyprolinol (Hyp-NHAc), thymidin-2'-O-deoxythymidin (ete), N-(aminocaproyl)-4-hydroxyprolinol (Hyp-C6-amino), 2-docosanoyl-uridin-3'-phosphat, dT bazơ đảo (idT) và các biến đổi khác. Phần mô tả về biến đổi này có thể được tìm thấy trong công bố PCT số WO2011/005861.

Theo một số phương án, tác nhân dsARN được biến đổi để bao gồm một hoặc nhiều adenosin-axit glycol nucleic (“GNA”). Thuật ngữ “GNA” đề cập đến axit glycol nucleic mà là polyme tương tự ADN hoặc ARN nhưng khác biệt ở thành phần “khung” của nó ở chỗ được tạo bởi các đơn vị glyxerol lặp lại được liên kết bằng các liên kết phosphodiester:



(R)-GNA

. Phần mô tả adenosin-GNA có thể được tìm thấy, ví dụ, trong Zhang, et al. (JACS 127(12):4174–75 (2005)).

Các biến đổi khác của nucleotit của tác nhân dsARN như được mô tả ở đây bao gồm 5' phosphat hoặc giả 5' phosphat, ví dụ, phosphat đầu cùng 5' hoặc giả phosphat đầu cùng 5' trên chuỗi đối nghĩa của tác nhân dsARN. Các giả phosphat thích hợp được mô tả trong, ví dụ công bố patent Mỹ số 2012/0157511, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến phần mô tả liên quan đến các biến đổi này.

Các tác nhân dsARN biến đổi khác gắn đích HBV được đề xuất, ví dụ, trong WO2016/077321, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến phần mô tả liên quan đến các biến đổi này.

Theo một số phương án, tác nhân dsARN chứa, chủ yếu chứa, hoặc bao gồm chuỗi có nghĩa biến đổi và chuỗi đối nghĩa biến đổi, như được chỉ ra trong Bảng 2.

#### IV. Tác nhân dsARN được liên hợp với phối tử

Tác nhân dsARN theo sáng chế có thể được liên hợp với phối tử. Phối tử có thể làm thay đổi sự phân bố, gắn đích hoặc thời gian sống của tác nhân dsARN mà nó được đưa vào đó. Trong các phương án được ưu tiên, phối tử cung cấp ái lực tăng đối với đích đã chọn, ví dụ, phân tử, tế bào hoặc kiểu tế bào, khoang, ví dụ, khoang tế bào hoặc cơ quan, mô, cơ quan hoặc một vùng của cơ thể, ví dụ, so với dạng không có phối tử này. Các phối tử được ưu tiên hơn sẽ không tham gia vào việc tạo cặp chuỗi kép trong axit nucleic chuỗi kép.

Oligonucleotit liên hợp phôi tử theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng oligonucleotit mang nhóm chức phản ứng treo, như phân tử thu được bằng cách gắn phân tử liên kết lên oligonucleotit (được mô tả dưới đây). Oligonucleotit phản ứng này có thể được cho phản ứng trực tiếp với các phôi tử đã có trên thị trường, các phôi tử được tổng hợp mang bất kỳ trong số nhiều nhóm bảo vệ khác nhau, hoặc các phôi tử có gốc liên kết được gắn vào đó.

Trong oligonucleotit được liên hợp phôi tử và nucleosit liên kết đặc hiệu trình tự mang phân tử-phôi tử theo sáng chế, oligonucleotit và oligonucleosit này có thể được lắp ráp trên máy tổng hợp ADN thích hợp sử dụng tiền chất nucleotit hoặc nucleosit chuẩn, hoặc các tiền chất liên hợp nucleotit hoặc nucleosit mà mang sẵn gốc liên kết, tiền chất liên hợp nucleosit hoặc nucleotit-phôi tử mang sẵn phân tử phôi tử này, hoặc các khối cấu trúc mang phôi tử không nucleosit.

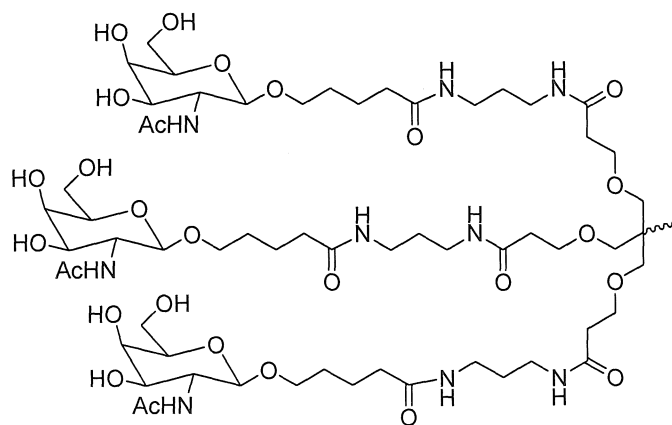
Khi sử dụng tiền chất liên hợp nucleotit mang sẵn gốc liên kết, sự tổng hợp các nucleosit được liên kết đặc hiệu trình tự thường được hoàn thành, và phân tử phôi tử này sau đó được cho phản ứng với gốc liên kết để tạo ra oligonucleotit được liên hợp với phôi tử này. Theo một số phương án, oligonucleotit hoặc nucleosit được liên kết theo sáng chế được tổng hợp bằng máy tổng hợp tự động sử dụng phosphoramidit thu được từ các thể liên hợp phôi tử-nucleosit ngoài các phosphoramidit chuẩn và phosphoramidit không chuẩn mà đã có trên thị trường và được sử dụng thông thường trong tổng hợp oligonucleotit.

Các patent Mỹ điển hình mô tả quy trình điều chế các thể liên hợp ARN bao gồm, nhưng không giới hạn ở, patent Mỹ số 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 và 5,688,941; 6,294,664; 6,320,017; 6,576,752; 6,783,931; 6,900,297; 7,037,646; 8,106,022, các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến các nội dung liên quan đến các phương pháp điều chế này.

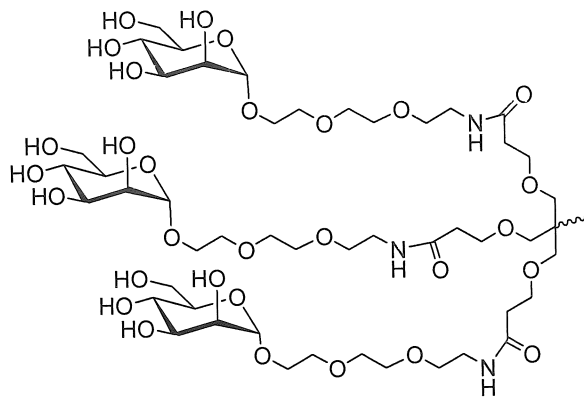
### A. Thể liên hợp hydrat cacbon

Trong các phương án được ưu tiên của các chế phẩm và phương pháp được mô tả ở đây, oligonucleotit tác nhân dsARN còn bao gồm hydrat cacbon. Tác nhân dsARN liên hợp hydrat cacbon là có lợi cho sự phân bố *in vivo* của các axit nucleic, cũng như các chế phẩm thích hợp để sử dụng điều trị *in vivo*, như được mô tả ở đây. Như được sử dụng ở đây, “hydrat cacbon” đề cập đến hợp chất là hydrat cacbon mà chính nó được tạo thành từ một hoặc nhiều đơn vị monosacarit có ít nhất là 6 nguyên tử cacbon (mà có thể thẳng hàng, có nhánh hoặc vòng) với nguyên tử oxy, nitơ hoặc lưu huỳnh được liên kết với mỗi nguyên tử cacbon; hoặc hợp chất có một phần của nó là gốc hydrat cacbon tạo bởi một hoặc nhiều đơn vị monosacarit, mỗi đơn vị này có ít nhất là sáu nguyên tử cacbon (có thể là thẳng hàng, có nhánh hoặc vòng), với nguyên tử oxy, nitơ hoặc lưu huỳnh liên kết với mỗi nguyên tử cacbon này. Các hydrat cacbon điển hình bao gồm các đường (mono-, di-, tri-, và oligosacarit chứa từ khoảng 4, 5, 6, 7, 8, hoặc 9 đơn vị monosacarit), và polysacarit như tinh bột, glycogen, xenluloza, và gồm polysacarit. Các monosacarit cụ thể bao gồm các đường C5 và cao hơn (ví dụ, C5, C6, C7, hoặc C8); di- và trisacarit bao gồm đường có hai hoặc ba đơn vị monosacarit (ví dụ, C5, C6, C7, hoặc C8).

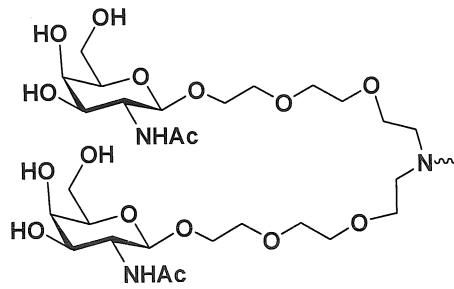
Theo một số phương án, thể liên hợp hydrat cacbon để sử dụng trong các chế phẩm và phương pháp theo sáng chế là monosacarit. Theo một số phương án, thể liên hợp hydrat cacbon để sử dụng trong các chế phẩm và phương pháp theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm:



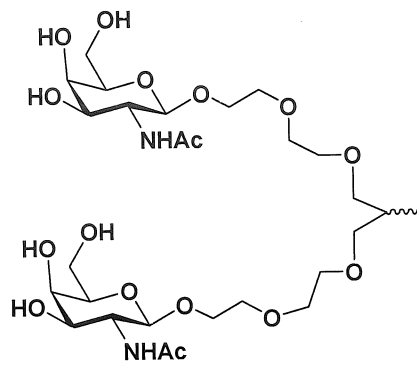
Công thức I,



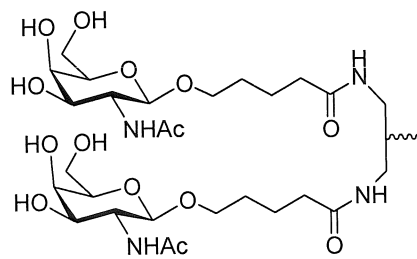
Công thức II,



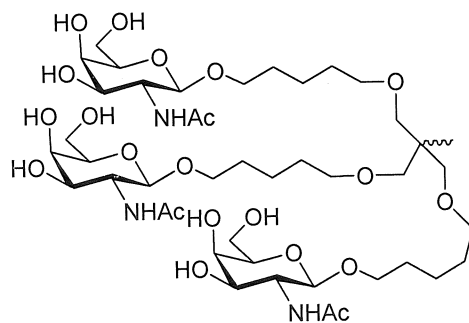
Công thức III,



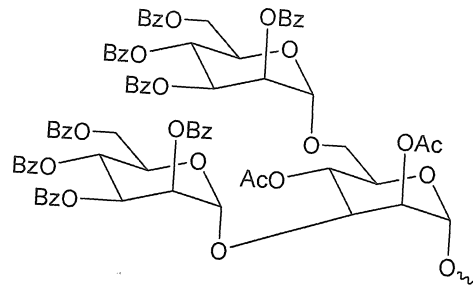
Công thức IV,



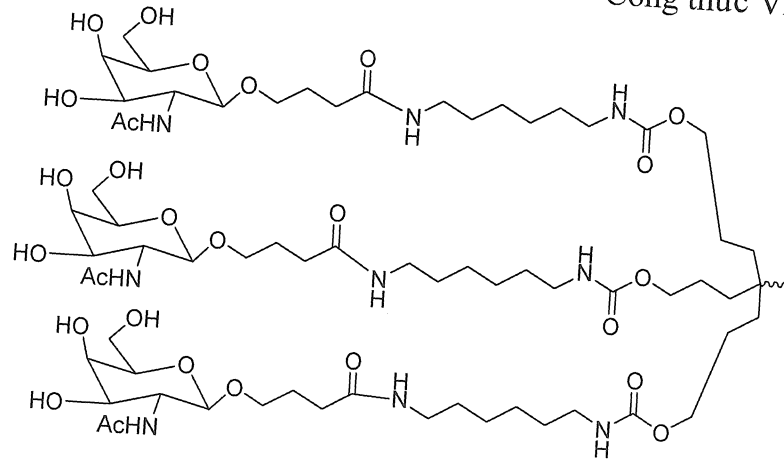
Công thức V,



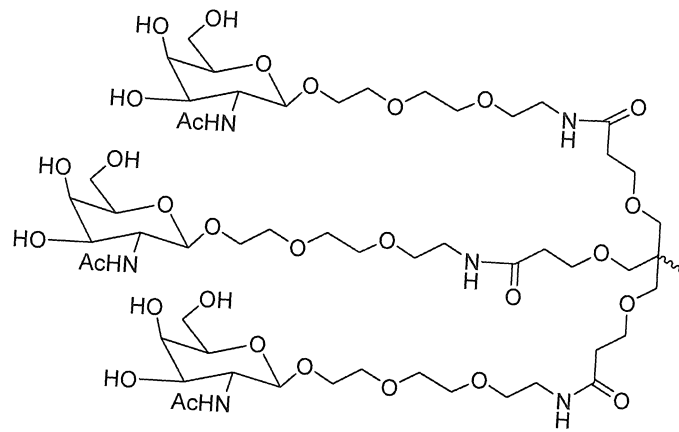
Công thức VI,



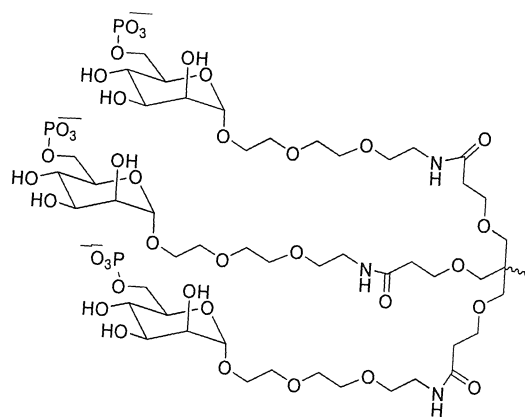
Công thức VII,



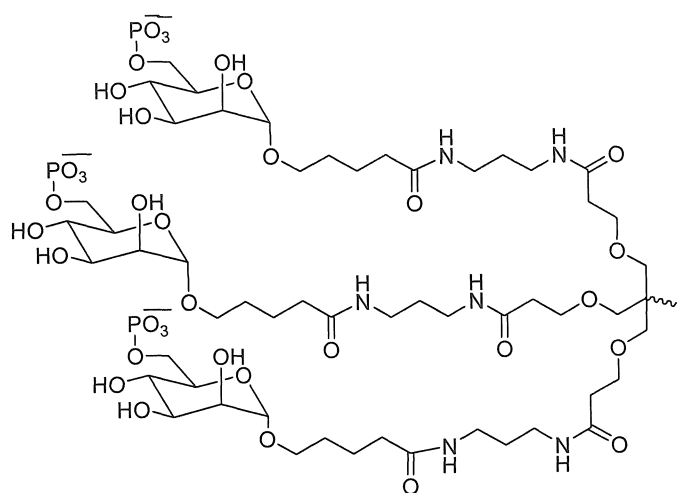
Công thức VIII,



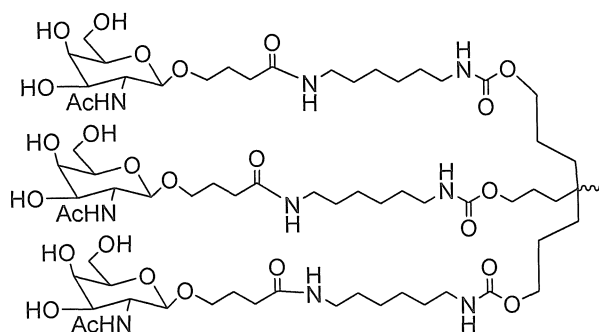
Công thức IX,



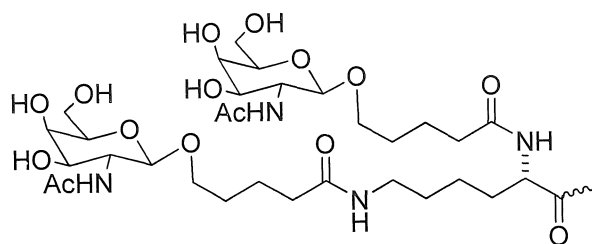
Công thức X,



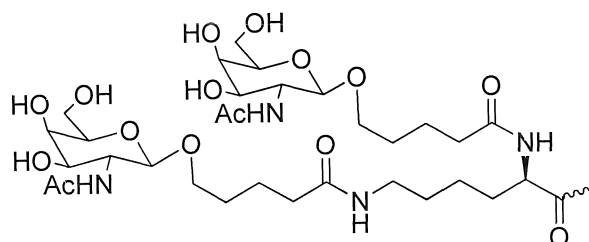
Công thức XI,



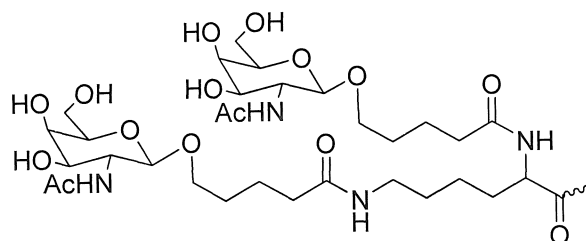
Công thức XII,



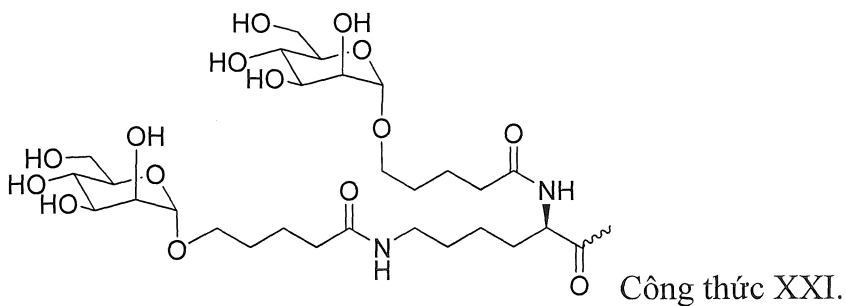
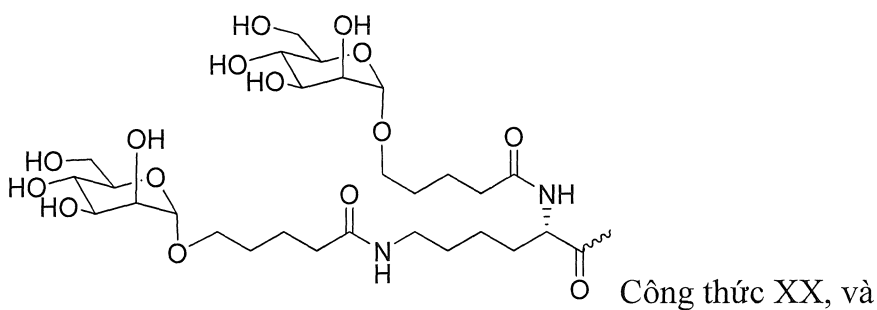
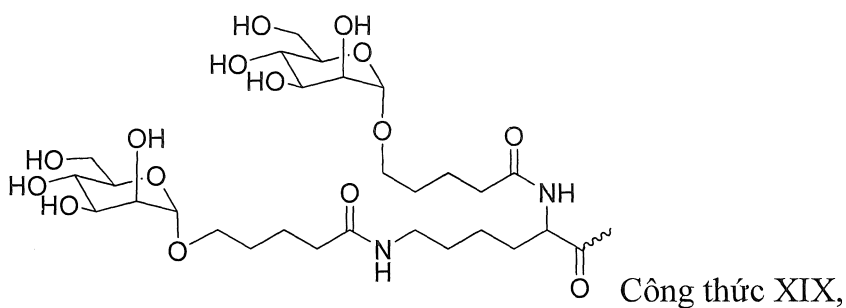
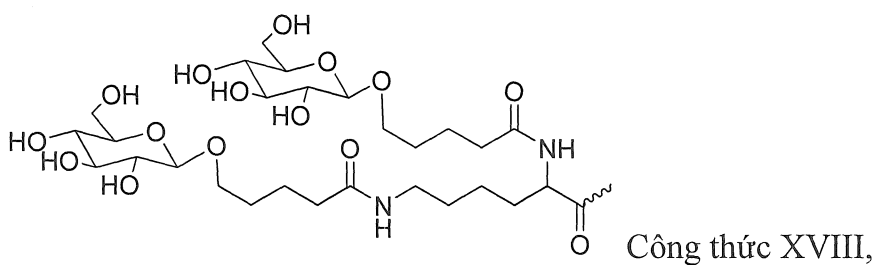
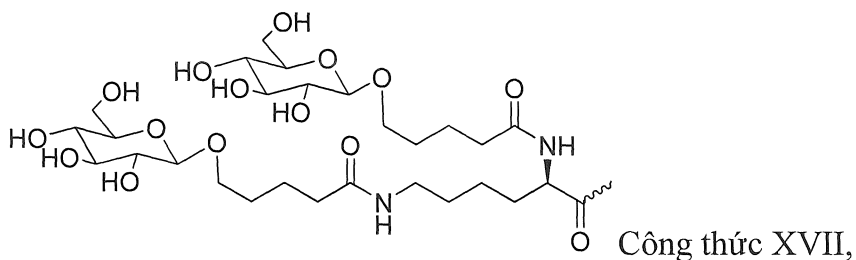
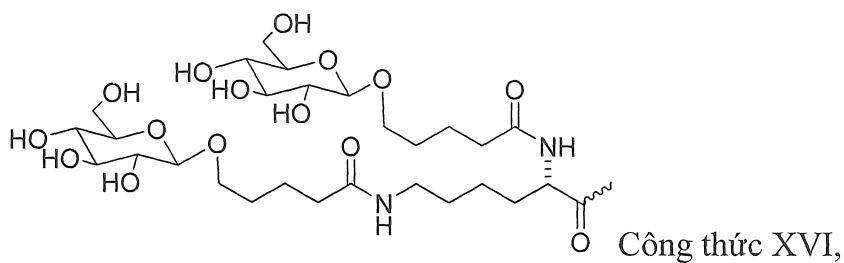
Công thức XIII,



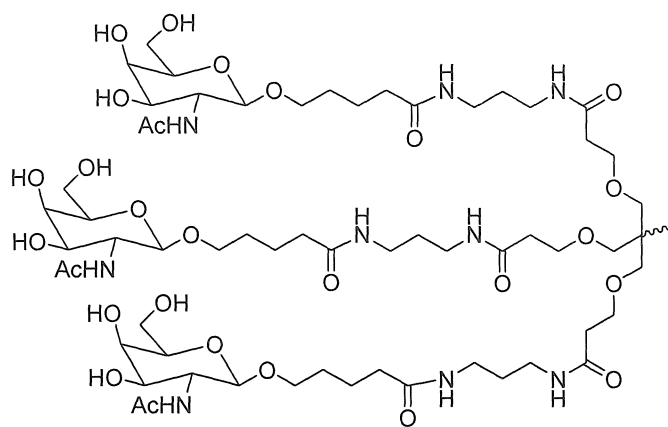
Công thức XIV,



Công thức XV,

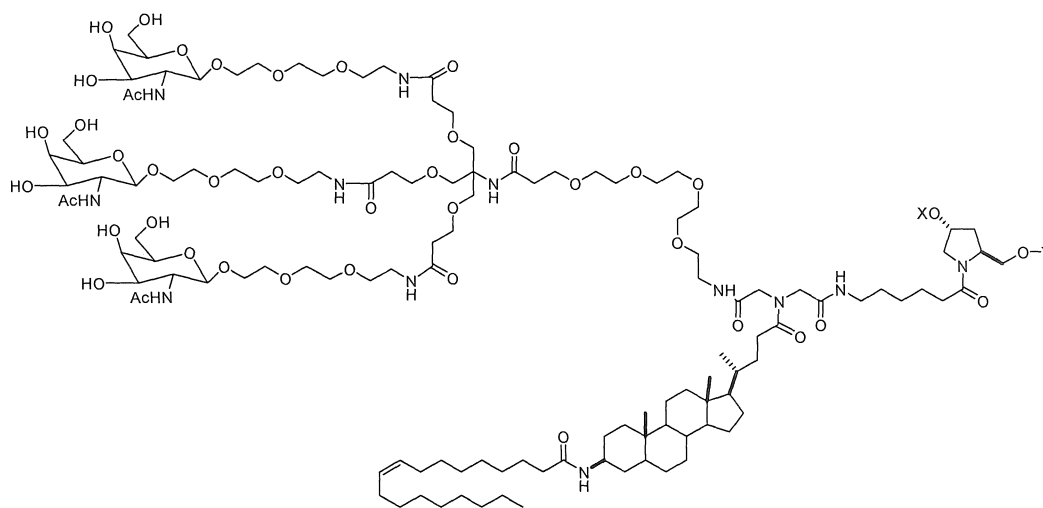


Theo một số phương án, monosacarit là N-axetylgalactosamin (GalNAc). Theo một số phương án, hydrat cacbon này chứa nhiều đơn vị N-axetylgalactosamin, như



Công thức I.

Thể liên hợp hydrat cacbon điển hình khác có thể được sử dụng trong các phương án được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở,



Công thức XXII,

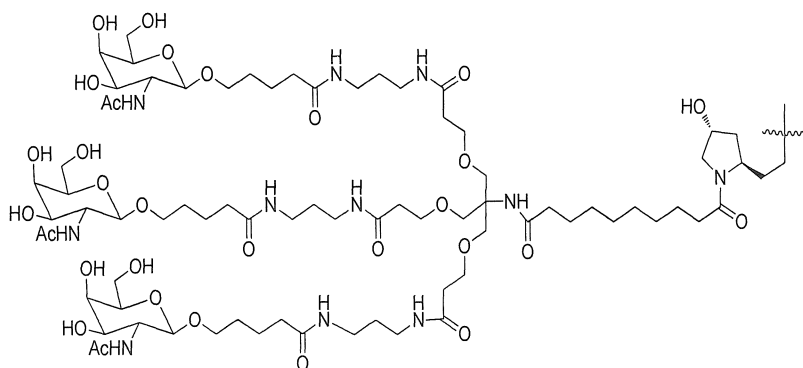
trong đó khi một trong số X hoặc Y là oligonucleotit, nhóm còn lại là hydro.

Theo một số phương án theo sáng chế, GalNAc hoặc dẫn xuất GalNAc được gắn vào tác nhân dsARN theo sáng chế qua nhóm liên kết hóa trị một. Theo một số phương án, GalNAc hoặc dẫn xuất GalNAc được gắn vào tác nhân dsARN theo sáng chế qua nhóm liên kết hóa trị hai. Theo một số phương án theo sáng chế, GalNAc hoặc dẫn xuất GalNAc được gắn vào tác nhân dsARN theo sáng chế qua nhóm liên kết hóa trị ba. Theo một số phương án, phối tử hydrat cacbon chứa ba đơn vị N-acetylgalactosamin được gắn qua nhóm liên kết hóa trị ba (“GalNAc<sub>3</sub>”).

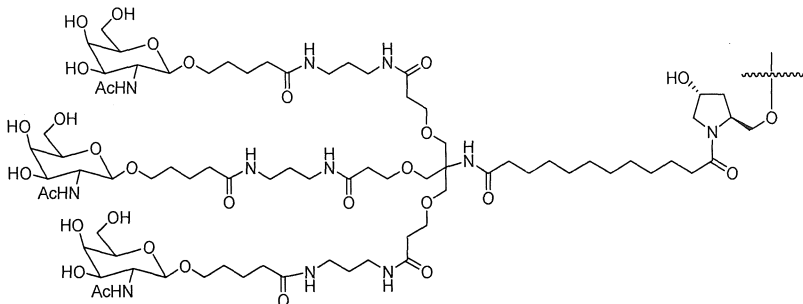
Theo một số phương án, tác nhân dsARN chuỗi kép chứa một GalNAc hoặc dẫn xuất GalNAc được gắn vào tác nhân dsARN. Theo một số phương án, tác nhân dsARN chuỗi kép chứa nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, hoặc 6) GalNAc hoặc dẫn xuất GalNAc, mỗi nhóm này độc lập được gắn vào nhiều nucleotit của tác nhân dsARN chuỗi kép qua nhiều nhóm liên kết hóa trị một.

Các thể liên hợp hydrat cacbon khác thích hợp để sử dụng trong sáng chế bao gồm các thể liên hợp được mô tả trong công bố PCT số WO2014/179620 và WO2014/179627, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến các phần mô tả liên quan đến các thể liên hợp này.

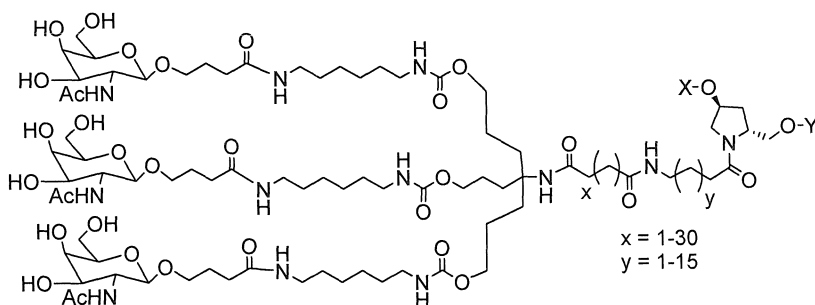
Ví dụ không giới hạn về thể liên hợp tác nhân dsARN hydrat cacbon có các nhóm liên kết mà có thể được sử dụng trong các chế phẩm và phương pháp được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở,



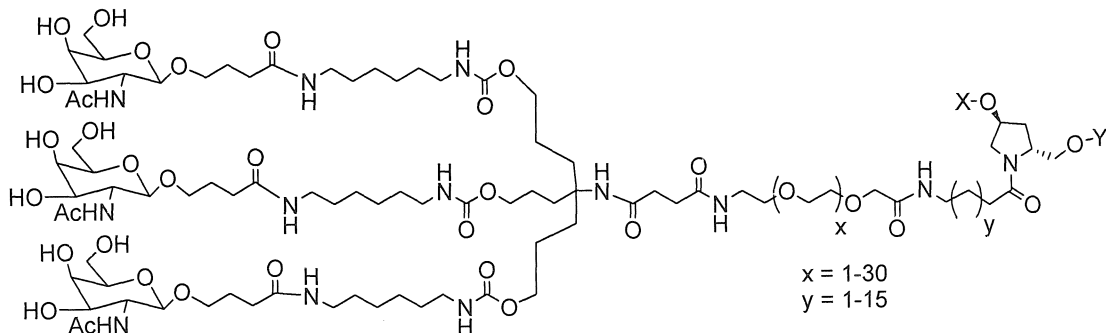
Công thức XXIII,



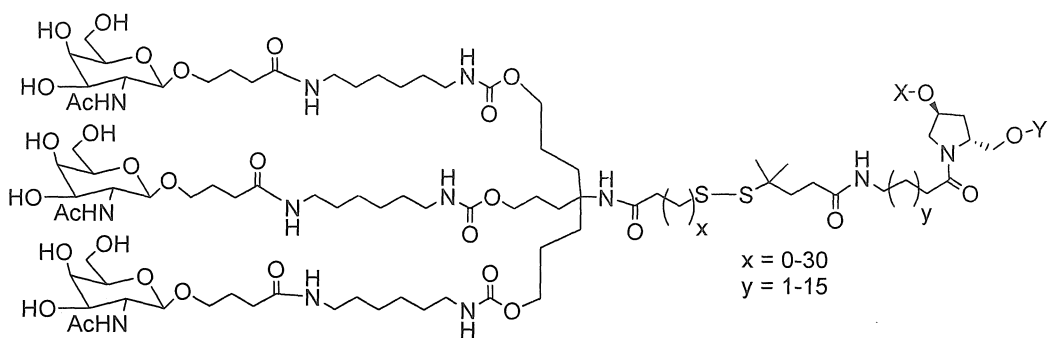
Công thức XXIV,



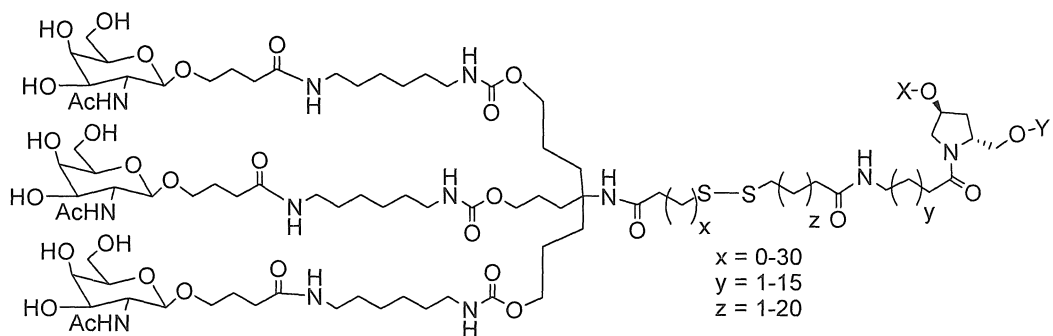
Công thức XXV,



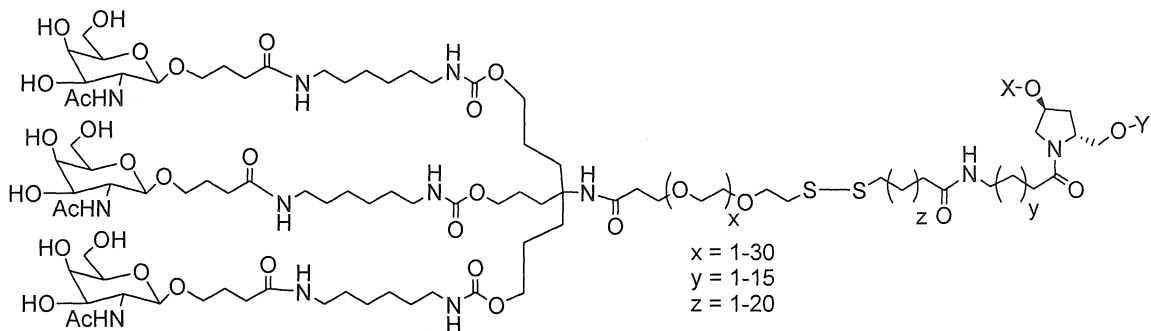
Công thức XXVI,



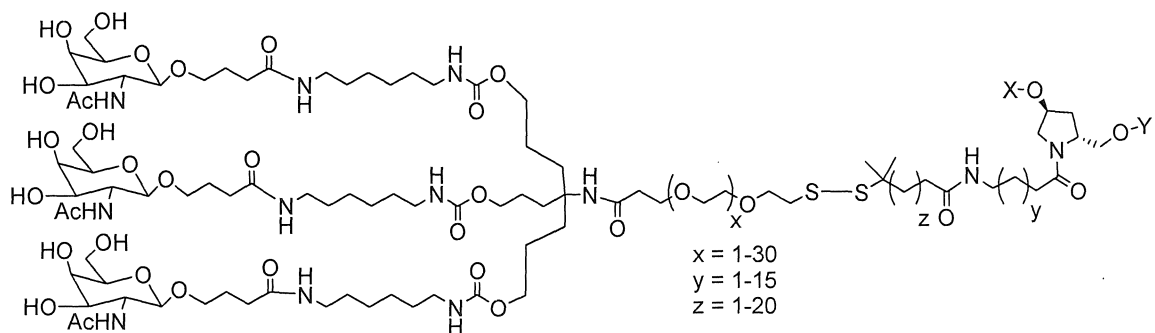
Công thức XXVII,



Công thức XXVIII,



Công thức XXIX, và

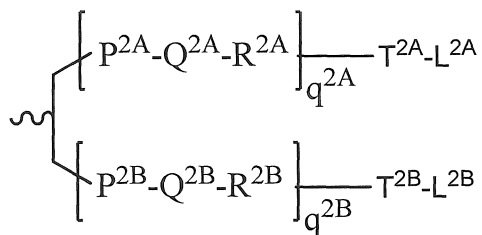


Công thức XXX,

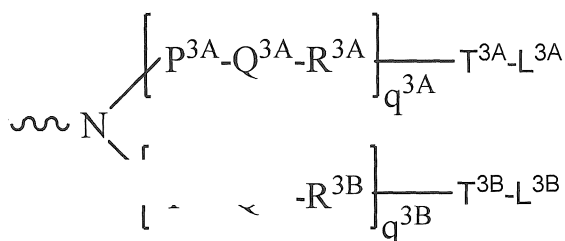
trong đó khi một trong số X hoặc Y là oligonucleotit, nhóm còn lại là hydro.

Theo một số phương án của chế phẩm và phương pháp được mô tả ở đây, phối tử là một hoặc nhiều dẫn xuất “GalNAc” (N-axetyl-galactosamin) được gắn qua nhóm liên kết có nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba.

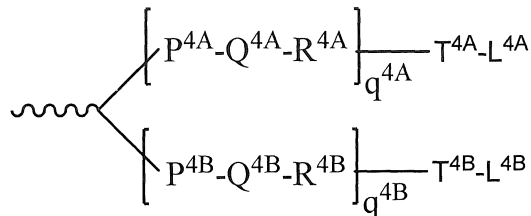
Theo một số phương án, tác nhân dsARN như được mô tả ở đây được liên hợp với nhóm liên kết có nhánh hóa trị hai hoặc hóa trị ba được chọn từ nhóm bao gồm các cấu trúc được thể hiện trong công thức bất kỳ trong các công thức (XXXI) – (XXXIV):



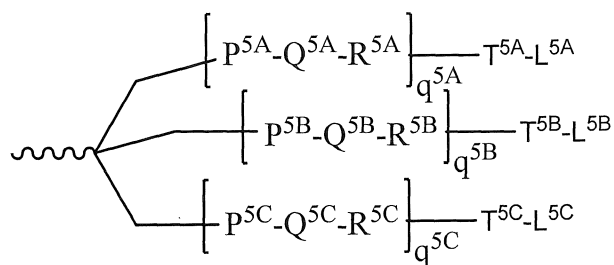
Công thức XXXI,



Công thức XXXII,



Công thức XXXIII, hoặc



Công thức XXXIV;

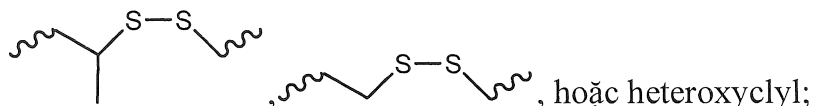
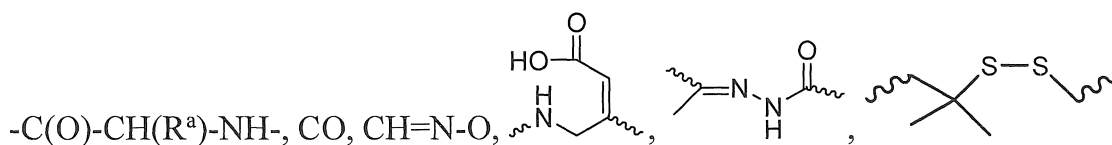
trong đó:

$q^{2\text{A}}$ ,  $q^{2\text{B}}$ ,  $q^{3\text{A}}$ ,  $q^{3\text{B}}$ ,  $q^{4\text{A}}$ ,  $q^{4\text{B}}$ ,  $q^{5\text{A}}$ ,  $q^{5\text{B}}$  và  $q^{5\text{C}}$  độc lập là, trong mỗi trường hợp, 0-20 và trong đó đơn vị lặp lại có thể là giống hoặc khác nhau;

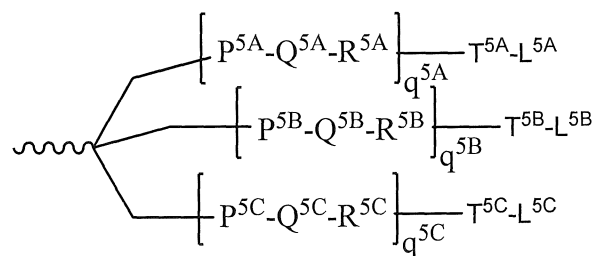
$P^{2A}, P^{2B}, P^{3A}, P^{3B}, P^{4A}, P^{4B}, P^{5A}, P^{5B}, P^{5C}, T^{2A}, T^{2B}, T^{3A}, T^{3B}, T^{4A}, T^{4B}, T^{5A}, T^{5B}, T^{5C}$  mỗi nhóm này độc lập trong mỗi trường hợp là vắng mặt, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH hoặc CH<sub>2</sub>O;

$Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C}$  độc lập trong mỗi trường hợp là vắng mặt, alkylen, alkylen được thế trong đó một hoặc nhiều metylen có thể bị gián đoạn hoặc được kết thúc bằng một hoặc nhiều trong số O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sup>N</sup>), 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 trong mỗi trường hợp là vắng mặt, NH, O, S, CH<sub>2</sub>, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R<sup>a</sup>)C(O),



$L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B}$  và  $L^{5C}$  là phối tử; *nghĩa là*, mỗi nhóm độc lập trong mỗi trường hợp là monosacarit (như GalNAc), disacarit, trisacarit, tetrasacarit, oligosacarit, hoặc polysacarit; và  $R^a$  là H hoặc chuỗi bên axit amin. Các dẫn xuất GalNAc liên hợp hóa trị ba là đặc biệt hữu ích để sử dụng với tác nhân dsARN để ức chế sự biểu hiện của gen đích, như các dẫn xuất có công thức (XXXIV):



Công thức XXXIV,

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

Ví dụ về các nhóm liên kết có nhánh hóa trị hai và hóa trị ba thích hợp liên hợp với dẫn xuất GalNAc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các cấu trúc được trích dẫn trên đây như công thức I, VI, X, IX, và XII.

### B. Nhóm liên kết

Theo một số phương án, thể liên hợp hoặc phối tử được mô tả ở đây có thể được gắn vào oligonucleotit tác nhân dsARN với các nhóm liên kết khác nhau mà có thể cắt được hoặc không cắt được.

Thuật ngữ “nhóm liên kết” hoặc “liên kết” có nghĩa là gốc hữu cơ nối hai phần của hợp chất, ví dụ, gắn đồng hóa trị hai phần của hợp chất. Các nhóm liên kết thường bao gồm liên kết trực tiếp hoặc nguyên tử như oxy hoặc lưu huỳnh, đơn vị như NR<sub>8</sub>, C(O), C(O)NH, SO, SO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>NH hoặc chuỗi nguyên tử, như, nhưng không giới hạn ở, alkyl được thế hoặc không được thế, alkenyl được thế hoặc không được thế, alkynyl được thế hoặc không được thế, arylalkyl, arylalkenyl, arylalkynyl, heteroarylalkyl, heteroarylalkenyl, heteroarylalkynyl, heteroxycylalkyl, heteroxycylalkenyl, heteroxycylalkynyl, aryl, heteroaryl, heteroxycyl, xycloalkyl, xycloalkenyl, alkylarylalkyl, alkylarylalkenyl, alkylarylalkynyl, alkenylarylalkyl, alkenylarylalkenyl, alkenylarylalkynyl, alkynylarylalkyl, alkynylarylalkenyl, alkynylarylalkynyl, alkylheteroarylalkyl, alkylheteroarylalkenyl, alkylheteroarylalkynyl, alkenylheteroarylalkyl, alkenylheteroarylalkenyl, alkenylheteroarylalkynyl, alkynylheteroarylalkyl, alkynylheteroarylalkenyl, alkynylheteroarylalkynyl, alkylheteroxycylalkyl, alkylheteroxycylalkenyl, alkylheteroxycylalkynyl, alkenylheteroxycylalkyl, alkenylheteroxycylalkenyl, alkenylheteroxycylalkynyl, alkynylheteroxycylalkyl, alkynylheteroxycylalkenyl, alkynylheteroxycylalkynyl, alkylaryl, alkenylaryl, alkynylaryl, alkylheteroaryl, alkenylheteroaryl, alkynylheteroaryl, mà một hoặc nhiều metylen có thể bị gián đoạn hoặc được kết thúc bằng O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sub>8</sub>), C(O), aryl được thế hoặc không được thế, heteroaryl được thế hoặc không được thế, dị vòng được thế hoặc không được thế; trong đó R<sub>8</sub> là hydro, axyl, béo hoặc béo được thế. Theo một số phương án, nhóm liên kết có khoảng 1-24, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16, hoặc 8-16 nguyên tử.

Nhóm liên kết cắt được là nhóm đủ ổn định bên ngoài tế bào, nhưng khi đi vào tế bào đích bị cắt để giải phóng hai phần mà nhóm liên kết đang được giữ với nhau. Theo một số phương án, nhóm liên kết cắt được được cắt nhanh hơn ít nhất là khoảng 10 lần, 20 lần, 30 lần, 40 lần, 50 lần, 60 lần, 70 lần, 80 lần, 90 lần, hoặc nhiều hơn, hoặc ít nhất là khoảng 100 lần trong tế bào đích hoặc trong điều kiện tham khảo thứ nhất (mà

có thể, *ví dụ*, được chọn để mô phỏng hoặc giống các điều kiện trong tế bào) so với trong máu của đối tượng, hoặc trong điều kiện tham khảo thứ hai (mà có thể, *ví dụ*, được chọn để mô phỏng hoặc giống các điều kiện được thấy trong máu hoặc huyết thanh).

Nhóm liên kết cắt được nhạy với các tác nhân cắt, *ví dụ*, pH, thế oxy hóa khử, hoặc sự có mặt của các phân tử thoái biến. Nói chung, tác nhân cắt là phổ biến hơn hoặc được phát hiện ra ở mức độ cao hơn hoặc hoạt tính cao hơn trong tế bào so với trong huyết thanh hoặc máu. Ví dụ về các chất thoái biến này bao gồm: chất oxy hóa khử, được chọn cho các cơ chất cụ thể hoặc không có tính đặc hiệu cơ chất, bao gồm, *ví dụ*, enzym oxy hóa hoặc khử hoặc chất khử như mercaptan, có mặt trong tế bào, mà có thể gây thoái biến nhóm liên kết cắt được bằng phản ứng oxy hóa khử bằng phản ứng khử; esteraza; endosom hoặc các chất có thể tạo ra môi trường axit, *ví dụ*, các chất tạo ra pH bằng năm hoặc thấp hơn; và các enzym mà có thể thủy phân hoặc làm thoái biến nhóm liên kết cắt được bằng axit bằng cách tác dụng như axit thông thường, peptidaza (mà có thể đặc hiệu cơ chất), và phosphataza.

Nhóm liên kết cắt được, như liên kết disulfua có thể nhạy với độ pH. Độ pH của huyết thanh người là 7,4, trong khi độ pH trong tế bào trung bình thấp hơn một chút, trong khoảng từ 7,1-7,3. Các endosom có độ pH axit hơn, trong khoảng từ 5,5-6,0, và các lysosom có độ pH axit còn mạnh hơn ở khoảng 5,0. Một số nhóm liên kết sẽ có nhóm liên kết cắt được mà được cắt ở độ pH ưu tiên hơn, nhờ đó giải phóng lipit cation khỏi phối tử này trong tế bào, hoặc vào trong khoang mong muốn của tế bào.

Nhóm cầu nối có thể bao gồm nhóm liên kết cắt được mà được cắt bằng enzym cụ thể. Loại nhóm liên kết cắt được được đưa vào nhóm liên kết có thể phụ thuộc vào tế bào được gắn đích. Ví dụ, phối tử gắn đích gan có thể được liên kết với lipit cation qua nhóm liên kết bao gồm nhóm este. Các tế bào gan giàu esteraza, và do đó nhóm liên kết này sẽ được cắt hiệu quả hơn trong tế bào gan so với trong các loại tế bào không giàu esteraza. Các loại tế bào khác giàu esteraza bao gồm các tế bào của phổi, vỏ thận, và tinh hoàn.

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

Nói chung, độ thích hợp của nhóm liên kết cắt được ứng viên có thể được đánh giá bằng cách kiểm tra khả năng của chất (hoặc điều kiện) thoái biến để cắt nhóm liên kết ứng viên này. Cũng mong muốn kiểm tra nhóm liên kết cắt được ứng viên về khả

năng chống lại tác dụng cắt trong máu hoặc khi tiếp xúc với mô không phải đích khác. Do đó, một người có thể xác định độ nhạy tương đối với tác dụng cắt giữa điều kiện thứ nhất và thứ hai, trong đó điều kiện thứ nhất được chọn để thể hiện sự cắt trong tế bào đích và điều kiện thứ hai được chọn để thể hiện sự cắt trong các mô khác hoặc dịch sinh học, ví dụ, máu hoặc huyết thanh. Các đánh giá có thể được thực hiện trong hệ không chứa tế bào, trong tế bào, trong môi trường nuôi cấy tế bào, trong cơ quan hoặc môi trường nuôi cấy mô, hoặc trong động vật nguyên vẹn. Có thể hữu ích nếu thực hiện các đánh giá ban đầu trong các điều kiện nuôi cấy hoặc điều kiện không có tế bào và để xác nhận bằng các đánh giá thêm trong ở động vật nguyên vẹn. Trong các phương án được ưu tiên, các hợp chất ứng viên hữu ích được cắt nhanh hơn ít nhất là khoảng 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, hoặc 100 lần trong tế bào (hoặc trong các điều kiện *in vitro* được chọn để mô phỏng các điều kiện trong tế bào) so với máu hoặc huyết thanh (hoặc trong các điều kiện *in vitro* được chọn để mô phỏng các điều kiện ngoại bào).

i. Nhóm liên kết cắt được bằng phản ứng oxy hóa khử

Theo một số phương án, nhóm liên kết cắt được là nhóm liên kết cắt được bằng phản ứng oxy hóa khử mà được cắt khi khử hoặc oxy hóa. Ví dụ về nhóm liên kết cắt được bằng cách khử là nhóm liên kết disulphua (-S-S-). Để xác định nhóm liên kết cắt được ứng viên có phải là “nhóm liên kết cắt được bằng cách khử” thích hợp hay không, hoặc ví dụ, có thích hợp để sử dụng với gốc tác nhân dsARN cụ thể và tác nhân gắn đích cụ thể hay không, có thể xem xét các phương pháp được mô tả ở đây. Ví dụ, ứng viên có thể được đánh giá bằng cách ủ với dithiothreitol (DTT), hoặc chất khử khác bằng cách sử dụng các chất phản ứng đã biết trong lĩnh vực này, mà mô phỏng tốc độ cắt sẽ được quan sát thấy trong tế bào, ví dụ, tế bào đích. Các ứng viên cũng có thể được đánh giá trong các điều kiện được chọn để mô phỏng các điều kiện máu hoặc huyết thanh. Theo một số phương án, các hợp chất ứng viên được cắt nhiều nhất là khoảng 10% trong máu. Trong một số phương án, các hợp chất ứng viên hữu ích được gây thoái biến nhanh hơn ít nhất là khoảng 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, hoặc khoảng 100 lần trong tế bào (hoặc trong các điều kiện *in vitro* được chọn để mô phỏng các điều kiện trong tế bào) so với máu hoặc huyết thanh (hoặc trong các điều kiện *in vitro* được chọn để mô phỏng các điều kiện ngoại bào). Tốc độ cắt của các hợp chất ứng viên có thể được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm động học enzym chuẩn trong các điều kiện được

chọn để mô phỏng môi trường trong tế bào và được so sánh với các điều kiện được chọn để mô phỏng môi trường ngoại bào.

ii. Các nhóm liên kết cắt được dựa trên phosphat

Theo một số phương án, nhóm liên kết cắt được bao gồm nhóm liên kết cắt được dựa trên phosphat. Nhóm liên kết cắt được dựa trên phosphat được cắt bằng các chất gây thoái biến hoặc thủy phân nhóm phosphat. Ví dụ về chất cắt nhóm phosphat trong tế bào là các enzym như phosphatase trong tế bào. Ví dụ về các nhóm liên kết dựa trên phosphat là -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Theo một số phương án, nhóm liên kết dựa trên phosphat là -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, hoặc -O-P(S)(H)-S-. Theo một số phương án, nhóm liên kết dựa trên phosphat là -O-P(O)(OH)-O-. Các ứng viên này có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp tương tự với các phương pháp được mô tả trên đây.

iii. Nhóm liên kết cắt được bằng axit

Theo một số phương án, nhóm liên kết cắt được bao gồm nhóm liên kết cắt được bằng axit. Nhóm liên kết cắt được bằng axit là nhóm liên kết được cắt trong các điều kiện axit. Theo một số phương án, nhóm liên kết cắt được bằng axit được cắt trong môi trường axit với độ pH là khoảng 6,5 hoặc thấp hơn (ví dụ, khoảng 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0, hoặc thấp hơn), hoặc bằng các chất như enzym mà có thể có tác dụng làm axit nói chung. Trong tế bào, các cơ quan bào có độ pH thấp đặc trưng, như endosom và lysosom có thể tạo ra môi trường cắt cho nhóm liên kết cắt được bằng axit. Ví dụ về nhóm liên kết cắt được bằng axit bao gồm nhưng không giới hạn ở hydrazon, este, và este của axit amin. Các nhóm cắt được bằng axit có thể có công thức chung -C=NN-, C(O)O, hoặc -OC(O). Theo một số phương án, cacbon được gắn vào oxy của este (nhóm alkoxy) là nhóm aryl, nhóm alkyl được thế, hoặc nhóm alkyl bậc ba như dimetyl pentyl hoặc t-butyl. Các ứng viên này có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp tương tự với các phương pháp được mô tả trên đây.

#### iv. Nhóm liên kết dựa trên este

Theo một số phương án, nhóm liên kết cắt được bao gồm nhóm liên kết cắt được dựa trên este. Nhóm liên kết cắt được dựa trên este được cắt bằng các enzym như esteraza và amidaza trong tế bào. Ví dụ về nhóm liên kết cắt được dựa trên este bao gồm nhưng không giới hạn ở este của các nhóm alkylen, alkenylen, và alkynylen. Nhóm liên kết cắt được este có công thức chung  $-C(O)O-$ , hoặc  $-OC(O)-$ . Các ứng viên này có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp tương tự với các phương pháp được mô tả trên đây.

#### v. Nhóm cắt được dựa trên peptit

Theo một số phương án, nhóm liên kết cắt được bao gồm nhóm liên kết cắt được dựa trên peptit. Nhóm liên kết cắt được dựa trên peptit được cắt bằng các enzym như peptidaza và proteaza trong tế bào. Nhóm liên kết cắt được dựa trên peptit là các liên kết peptit được tạo ra giữa các axit amin để tạo ra các oligopeptit (ví dụ, dipeptit, tripeptit, v.v.) và polypeptit. Nhóm cắt được dựa trên peptit không bao gồm nhóm amit ( $-C(O)NH-$ ). Nhóm amit có thể được tạo ra giữa alkylen, alkenylen, hoặc alkynelen bất kỳ. Liên kết peptit là loại liên kết amit đặc biệt được tạo ra giữa các axit amin để tạo thành peptit và protein. Nhóm cắt được dựa trên peptit thường được giới hạn ở liên kết peptit (nghĩa là, liên kết amit) được tạo ra giữa các axit amin tạo thành peptit và protein và không bao gồm toàn bộ nhóm chức amit. Nhóm liên kết cắt được dựa trên peptit có công thức chung  $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$ , trong đó RA và RB là các nhóm R của hai axit amin liền kề. Các ứng viên này có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp tương tự với các phương pháp được mô tả trên đây.

#### V. Phân phối tác nhân dsARN

Việc phân phối tác nhân dsARN theo sáng chế cho tế bào, ví dụ, tế bào ở đối tượng, như người, có thể đạt được theo nhiều cách khác nhau. Ví dụ, việc phân phối có thể được thực hiện bằng cách cho tế bào tiếp xúc với tác nhân dsARN theo sáng chế trên *in vitro* hoặc *in vivo*. Việc phân phối *in vivo* cũng có thể được thực hiện trực tiếp bằng cách sử dụng chế phẩm chứa tác nhân dsARN cho đối tượng. Theo cách khác, việc phân phối *in vivo* có thể được thực hiện gián tiếp bằng cách sử dụng một hoặc nhiều vectơ mã hóa và điều khiển sự biểu hiện của tác nhân dsARN. Các phương án khác được thảo luận thêm dưới đây.

Nói chung, phương pháp phân phối phân tử axit nucleic bất kỳ (*in vitro* hoặc *in vivo*) có thể được làm cho thích hợp để sử dụng cùng với tác nhân dsARN theo sáng chế (xem, ví dụ, Akhtar S. và Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 và WO94/02595, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến các phần mô tả liên quan đến các phương pháp phân phối này). Đối với việc phân phối *in vivo*, các yếu tố cần xem xét để phân phối phân tử tác nhân dsARN bao gồm, ví dụ, độ ổn định sinh học của phân tử được phân phối, ngăn ngừa các tác dụng không đặc hiệu, và tích lũy phân tử được phân phối trong mô đích.

Để sử dụng tác nhân dsARN toàn thân để điều trị bệnh, ARN có thể được biến đổi hoặc theo cách khác là được phân phối bằng cách sử dụng hệ phân phối dược chất; cả hai phương pháp đều có tác dụng ngăn ngừa sự thoái biến nhanh của dsARN bởi endo- và exo-nucleaza *in vivo*. Sự biến đổi ARN hoặc chất mang hoặc tá dược được dùng cũng có thể cho phép gắn đích chế phẩm chứa tác nhân dsARN vào mô đích và tránh được các tác dụng xa đích không mong muốn. Các phân tử tác nhân dsARN có thể được biến đổi bằng cách liên hợp hóa học, ví dụ, thể liên hợp hydrat cacbon như được mô tả trên đây.

#### VI. Dược phẩm

Sáng chế cũng bao gồm dược phẩm và các chế phẩm chứa tác nhân dsARN theo sáng chế. Theo một số phương án, được đề xuất ở đây là dược phẩm chứa tác nhân dsARN, như được mô tả ở đây, và chất mang dược dụng. Các dược phẩm chứa tác nhân dsARN là hữu ích để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự biểu hiện hoặc hoạt tính của gen HBV. Các dược phẩm này được bào chế theo cách thức phân phối. Một ví dụ là các chế phẩm được bào chế để sử dụng toàn thân bằng cách phân phối ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, bằng cách phân phối dưới da (SC), trong cơ (IM), hoặc trong tĩnh mạch (IV). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các chế phẩm được bào chế để tiêm đặc hiệu cơ quan (ví dụ, gan) trong động mạch, trong khối u, trong da, trong thủy tinh thể, khu trú trong mắt, cho mắt (thuốc nhỏ mắt), khí dung, khu trú trong mắt hoặc các đường khu trú khác, thuốc đạn, hoặc sử dụng bằng đường miệng. Trong các phương án được ưu tiên, các chế phẩm được sử dụng dưới da.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng với các liều đủ để ức chế sự biểu hiện của gen HBV. Theo một số phương án, tác nhân dsARN sẽ được sử dụng ở liều là khoảng 0,5 mg/kg đến 50 mg/kg, hoặc 0,3 mg/kg đến 20 mg/kg, hoặc 3 mg/kg

đến 10 mg/kg mỗi liều, hoặc tốt hơn là 3 mg/kg đến 10 mg/kg mỗi liều. Ví dụ, dsARN có thể được sử dụng ở khoảng 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, hoặc 50 mg/kg mỗi liều đơn. Theo một số phương án, tác nhân dsARN được sử dụng ở liều là từ 50 mg đến 900 mg.

Các chế phẩm cũng có thể được bào chế và được đóng gói cho liều cố định cho đối tượng độc lập với cân nặng. Các mức liều điển hình có thể được tính bằng cách nhân liều cho mỗi kilogam thể trọng với khối lượng cơ thể cho đối tượng trung bình. Ví dụ, người trưởng thành trung bình thường được xem là khoảng 70 kg.

Phác đồ liều lặp lại có thể bao gồm việc sử dụng lượng điều trị của tác nhân dsARN trên cơ sở thường xuyên, như một lần mỗi tháng, một lần mỗi hai tháng, hoặc một lần mỗi ba tháng. Trong các phương án được ưu tiên, tác nhân dsARN được sử dụng không nhiều hơn một lần mỗi tháng. Sau phác đồ điều trị ban đầu, các phương pháp điều trị có thể được sử dụng trên cơ sở ít thường xuyên hơn.

Dược phẩm có thể được sử dụng trong khoảng thời gian không xác định, *ví dụ*, ở đối tượng có một hoặc nhiều dấu hiệu hoặc triệu chứng của tình trạng nhiễm HBV, *ví dụ*, kháng nguyên HBV phát hiện được hoặc HBV ADN bao gồm HBV cccADN. Theo một số phương án, việc điều trị bằng tác nhân dsARN được thực hiện trong khoảng thời gian xác định hoặc gián đoạn và tạo ra tác dụng chữa khỏi về mặt chức năng.

Người có hiểu biết trung bình hiểu rằng các yếu tố nhất định có thể ảnh hưởng đến liều và thời gian cần thiết để điều trị hiệu quả cho đối tượng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc rối loạn, các phương pháp điều trị trước đó, tình trạng sức khỏe chung hoặc độ tuổi của đối tượng, và các bệnh khác hiện có. Ngoài ra, việc điều trị cho đối tượng bằng lượng hữu hiệu điều trị của chế phẩm có thể bao gồm một lần điều trị duy nhất hoặc nhiều lần điều trị. Việc tính toán liều hữu hiệu và thời gian bán thải *in vivo* cho từng tác nhân dsARN được bao gồm bởi sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các hệ phương pháp thông thường hoặc trên cơ sở thử nghiệm *in vivo* sử dụng mô hình động vật thích hợp, như được mô tả ở đây.

#### A. Tá dược

“Chất mang dược dụng” hoặc “tá dược dụng” là dung môi, chất tạo huyền phù dược dụng, hoặc tá dược lỏng trợ dược dụng khác bất kỳ để phân phối một hoặc nhiều axit nucleic cho đối tượng. Các chất này đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

### B. Các thành phần khác

Các chế phẩm theo sáng chế có thể chứa thêm các thành phần phụ trợ khác thường được tìm thấy trong các dược phẩm, ở mức nồng độ sử dụng đã được thiết lập trong lĩnh vực này của chúng. Do đó, ví dụ, các chế phẩm này có thể chứa thêm, các nguyên liệu có tác dụng dược lý, tương thích như, ví dụ, chất chống ngứa, chất làm se, chất gây tê cục bộ, hoặc chất chống viêm, hoặc có thể chứa các nguyên liệu bổ sung hữu ích trong việc bào chế bằng phương pháp vật lý nhiều dạng liều khác nhau của các chế phẩm theo sáng chế, như chất bảo quản, chất chống oxy hóa và chất ổn định. Tuy nhiên, các nguyên liệu này, khi được bổ sung, không nên cản trở quá mức các tác dụng sinh học của các thành phần của các chế phẩm theo sáng chế. Các chế phẩm này có thể được tiệt trùng và, nếu muốn, được trộn với các chất phụ trợ, ví dụ, chất bảo quản, chất ổn định, chất làm ướt, chất nhũ hóa, muối tác động đến áp suất thẩm thấu, hoặc chất đệm và các chất tương tự, mà không tương tác bất lợi với (các) axit nucleic của chế phẩm.

Theo một số phương án, dược phẩm được mô tả trong sáng chế bao gồm (a) một hoặc nhiều hợp chất tác nhân dsARN và (b) một hoặc nhiều chất mà thực hiện chức năng bằng cơ chế không qua ARNi và là hữu ích trong việc điều trị rối loạn do HBV. Ví dụ về các chất này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất chống viêm, chất chống nhiễm mỡ, chất chống virut, và chất chống xơ hóa.

Ngoài ra, các chất khác thường được sử dụng để bảo vệ gan, như silymarin, cũng có thể được sử dụng kết hợp với tác nhân dsARN được mô tả ở đây. Các chất khác hữu ích để điều trị bệnh gan bao gồm telbivudine, entecavir, và các chất ức chế proteaza như telaprevir và các chất khác được mô tả, ví dụ, trong US2005/0148548, US2004/0167116, US2003/0144217, và US2004/0127488.

Các tác dụng gây độc và tác dụng điều trị của các hợp chất này có thể được xác định bằng các quy trình được chuẩn trong môi trường nuôi cấy tế bào hoặc các động vật thử nghiệm, ví dụ, để xác định LD50 (liều gây tử vong 50% quần thể) và ED50 (liều có tác dụng điều trị cho 50% quần thể). Tỷ lệ liều giữa tác dụng gây độc và tác dụng điều trị là chỉ số điều trị và có thể được biểu diễn bằng tỷ lệ LD50/ED50. Theo một số phương án, các hợp chất thể hiện chỉ số điều trị cao được ưu tiên hơn.

Số liệu thu được từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu trên động vật có thể được sử dụng để bào chế khoảng liều để sử dụng trên người. Liều của các chế phẩm được mô tả ở đây trong sáng chế này thường nằm trong khoảng các nồng độ tuần

hoàn mà bao hàm ED50 kèm theo không có hoặc có rất ít tác dụng gây độc. Liều có thể thay đổi trong khoảng này tùy thuộc vào dạng liệu được sử dụng và đường dùng được sử dụng. Đối với hợp chất bất kỳ được sử dụng trong các phương pháp được mô tả trong sáng chế, liều hữu hiệu điều trị có thể được ước tính ban đầu từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Liều có thể được bào chế trong mô hình động vật để đạt được khoảng nồng độ huyết tương tuần hoàn của hợp chất này hoặc, nếu thích hợp, của sản phẩm polypeptit của trình tự đích (*ví dụ*, đạt được nồng độ giảm của polypeptit này) mà bao hàm IC50 (*nghĩa là*, nồng độ của hợp chất thử nghiệm mà đạt được một nửa tác dụng ức chế tối đa các triệu chứng) như được xác định trong môi trường nuôi cấy tế bào. Thông tin này có thể được sử dụng để xác định chính xác hơn các liều hữu ích ở người. Các mức nồng độ trong huyết tương có thể được đo, *ví dụ*, bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Ngoài việc sử dụng của chúng, như được thảo luận trên đây, tác nhân dsARN được mô tả ở đây có thể được sử dụng kết hợp với các chất đã biết khác hữu hiệu để điều trị tình trạng nhiễm HBV. Trong trường hợp bất kỳ, bác sỹ sử dụng có thể điều chỉnh lượng và thời gian sử dụng tác nhân dsARN dựa trên các kết quả quan sát được bằng cách sử dụng các phương pháp đo tác dụng chuẩn đã biết trong lĩnh vực này hoặc được mô tả ở đây.

## VII. Phương pháp

Sáng chế còn mô tả các phương pháp ức chế sự biểu hiện của HBV trong tế bào. Các phương pháp này bao gồm cho tế bào tiếp xúc với tác nhân dsARN, *ví dụ*, tác nhân dsARN chuỗi kép, với lượng hữu hiệu để ức chế sự biểu hiện của HBV trong tế bào, nhờ đó ức chế sự biểu hiện của HBV trong tế bào.

Việc cho tế bào tiếp xúc với tác nhân dsARN, *ví dụ*, tác nhân dsARN chuỗi kép, có thể được thực hiện *in vitro* hoặc *in vivo*. Việc cho tế bào tiếp xúc *in vivo* với tác nhân dsARN bao gồm bước cho tế bào hoặc nhóm tế bào ở đối tượng, *ví dụ*, đối tượng người, tiếp xúc với tác nhân dsARN. Việc kết hợp các phương pháp *in vitro* và *in vivo* để cho tế bào tiếp xúc cũng là khả thi. Việc cho tế bào tiếp xúc có thể là trực tiếp hoặc gián tiếp, như được thảo luận trên đây. Ngoài ra, việc cho tế bào tiếp xúc có thể được thực hiện qua phổi tử gấn đích, bao gồm phổi tử bất kỳ được mô tả ở đây hoặc đã biết trong lĩnh vực này. Trong các phương án được ưu tiên, phổi tử gấn đích là gốc hydrat cacbon, *ví dụ*, phổi tử GalNAc<sub>3</sub>, hoặc phổi tử bất kỳ khác điều khiển tác nhân dsARN đến vị trí quan tâm.

Theo một số phương án của các phương pháp theo sáng chế, tác nhân dsARN được sử dụng cho đối tượng sao cho tác nhân dsARN được phân phối đến vị trí cụ thể bên trong đối tượng này. Tác dụng ức chế sự biểu hiện của gen HBV có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp đo mức nồng độ hoặc sự thay đổi mức nồng độ của HBV mRNA hoặc protein HBV trong mẫu thu được từ dịch hoặc mô từ vị trí cụ thể trong đối tượng này. Trong các phương án được ưu tiên, vị trí này được chọn từ gan và máu. Vị trí này cũng có thể là tiểu phần hoặc phân nhóm các tế bào hoặc dịch được tạo ra từ bất kỳ một trong các vị trí được đề cập trên đây.

Theo một số phương án, các phương pháp được mô tả ở đây là hữu ích để điều trị cho đối tượng mắc tình trạng nhiễm HBV, *ví dụ*, đối tượng được hưởng lợi từ việc làm giảm sự biểu hiện gen HBV hoặc sự sao chép HBV. Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả các phương pháp làm giảm mức nồng độ của cccADN của virus viêm gan B ở đối tượng bị nhiễm HBV. Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả các phương pháp làm giảm mức nồng độ kháng nguyên HBV, *ví dụ*, HBsAg hoặc HBeAg, ở đối tượng bị nhiễm HBV. Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả các phương pháp làm giảm tải lượng virus HBV ở đối tượng bị nhiễm HBV. Sáng chế còn mô tả phương pháp làm giảm mức nồng độ alanin aminotransferaza (ALT) hoặc aspartat aminotransferaza (AST) ở đối tượng bị nhiễm HBV (mặc dù sự tăng tạm thời ALT hoặc AST có thể liên quan đến sự đào thải virus). Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp làm tăng mức nồng độ kháng thể kháng HBV ở đối tượng bị nhiễm HBV. Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho đối tượng mắc tình trạng nhiễm HBV. Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho đối tượng mắc bệnh do HBV, *ví dụ*, nhiễm virus viêm gan D, viêm gan delta, bệnh viêm gan B cấp tính; bệnh viêm gan B bùng phát cấp tính; bệnh viêm gan B mạn tính; bệnh xơ gan; bệnh gan giai đoạn cuối; hoặc bệnh ung thư biểu mô tế bào gan. Ngoài ra, do sự nhiễm HDV phụ thuộc vào các chức năng trợ giúp bắt buộc được tạo ra bởi HBV để lây truyền, và các đối tượng có tình trạng nhiễm HBV cũng có thể bị nhiễm HDV, theo một số phương án các phương pháp điều trị được mô tả ở đây cũng là hữu ích để điều trị cho đối tượng nhiễm HDV hoặc mắc rối loạn liên quan đến HDV, như tình trạng nhiễm virus viêm gan B, tình trạng nhiễm virus viêm gan B mạn tính (CHB), tình trạng nhiễm virus viêm gan B mạn tính (CHB), bệnh xơ gan, bệnh suy gan, và bệnh ung thư biểu mô tế bào gan (HCC). Theo một số phương án, phương pháp điều trị (và sử dụng) theo sáng chế bao gồm bước sử

dụng cho đối tượng, *ví dụ*, người, lượng hữu hiệu điều trị của tác nhân dsARN theo sáng chế gắn đích gen HBV hoặc được phẩm chứa tác nhân dsARN theo sáng chế gắn đích gen HBV.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa ít nhất là một triệu chứng ở đối tượng có tình trạng nhiễm HBV, *ví dụ*, sự có mặt của HBV cccADN huyết thanh hoặc gan; sự có mặt của HBV ADN huyết thanh; sự có mặt của kháng nguyên HBV huyết thanh hoặc gan, *ví dụ*, HBsAg hoặc HBeAg; ALT tăng; AST tăng; sự không có mặt hoặc mức nồng độ thấp của kháng thể kháng HBV; tổn thương gan; bệnh xơ gan; viêm gan delta, bệnh viêm gan B cấp tính; bệnh viêm gan B bùng phát cấp tính; bệnh viêm gan B mạn tính; bệnh xơ gan; bệnh gan giai đoạn cuối; bệnh ung thư biểu mô tế bào gan; hội chứng giống bệnh huyết thanh; chứng biếng ăn; buồn nôn; nôn, cảm lạnh; đau cơ; mệt mỏi; khúu giác và sự nhạy bén vị giác bị rối loạn (không thích thức ăn và thuốc lá); đau thượng vị và phần tư phía trên bên phải bụng (tùng con, nhẹ đến vừa); bệnh não gan; chứng buồn ngủ; rối loạn giấc ngủ; lú lẫn; hôn mê; cổ trướng; xuất huyết tiêu hóa; rối loạn đông máu; bệnh vàng da; chứng gan to (gan mềm, to nhẹ); lá lách lớn; dấu lòng bàn tay son; dấu sao mạch; mất cơ; dấu sao mạch; bệnh viêm mạch; xuất huyết giãn tĩnh mạch; phù ngoại vi; bệnh vú to ở đàn ông; chứng teo tinh hoàn; các tĩnh mạch bên ở bụng (dấu hiệu cây cọ); mức ALT cao hơn mức AST; mức gamma-glutamyl transpeptidaza (GGT) và phosphatasa kiềm (ALP) tăng, không quá 3 lần ULN); các mức albumin hơi thấp; mức nồng độ sắt trong huyết thanh tăng; chứng giảm bạch cầu (*nghĩa là*, chứng giảm bạch cầu hạt); tăng lympho bào; tốc độ lắng hồng cầu tăng (ESR); thời gian sống của hồng cầu ngắn; bệnh tan máu; chứng giảm tiểu cầu; sự kéo dài tỷ lệ chuẩn hóa quốc tế (INR); sự có mặt của HBsAg, HBeAg, kháng thể lõi viêm gan B (anti-HBc) globulin miễn dịch M (IgM) trong huyết thanh hoặc gan; kháng nguyên bề mặt viêm gan B (anti-HBs), hoặc kháng thể e viêm gan B (anti-HBe), hoặc HBV ADN; các mức bilirubin tăng; chứng tăng globulin huyết; sự có mặt của kháng thể không đặc hiệu mô, như kháng thể kháng cơ trơn (ASMA) hoặc kháng thể kháng nhân (ANA) (10-20%); sự có mặt của kháng thể đặc hiệu mô, như kháng thể kháng tuyến giáp (10-20%); các mức tăng của yếu tố dạng thấp (RF); số lượng tế bào bạch cầu và tiểu cầu thấp; tiểu thùy, có các thay đổi về thoái hóa và tái tạo tế bào gan, và tình trạng viêm kèm theo; hoặc hoại tử phần lớn trung tâm tiểu thùy gan, dù phát hiện được hoặc chưa phát hiện được. Các phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu điều

trị của tác nhân dsARN, *ví dụ*, dsARN, hoặc được phẩm chứa tác nhân dsARN, nhờ đó ngăn ngừa ít nhất là một triệu chứng ở đối tượng mắc rối loạn mà sẽ có lợi nếu làm giảm sự biểu hiện gen HBV, như đối tượng có tình trạng nhiễm HBV hoặc đối tượng nhiễm cả HBV và HDV.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng lượng hữu hiệu điều trị của tác nhân dsARN theo sáng chế để điều trị cho đối tượng, *ví dụ*, đối tượng mà sẽ có lợi từ việc làm giảm hoặc ức chế sự biểu hiện gen HBV, như đối tượng có tình trạng nhiễm HBV hoặc đối tượng nhiễm cả HBV và HDV.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng tác nhân dsARN, *ví dụ*, dsARN, theo sáng chế gắn đích gen HBV hoặc được phẩm chứa tác nhân dsARN gắn đích gen HBV để sản xuất thuốc để điều trị cho đối tượng, *ví dụ*, đối tượng mà sẽ có lợi từ việc làm giảm sự biểu hiện gen HBV hoặc sự sao chép HBV, như đối tượng có tình trạng nhiễm HBV hoặc đối tượng nhiễm cả HBV và HDV, và đối tượng mắc rối loạn mà sẽ có lợi từ việc làm giảm sự biểu hiện gen HBV, *ví dụ*, bệnh do HBV.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng tác nhân dsARN như được mô tả ở đây, để ngăn ngừa ít nhất là một triệu chứng ở đối tượng mắc rối loạn mà sẽ có lợi từ việc làm giảm hoặc ức chế sự biểu hiện gen HBV hoặc sao chép HBV.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng tác nhân dsARN như được mô tả ở đây để sản xuất thuốc để ngăn ngừa ít nhất là một triệu chứng ở đối tượng mắc rối loạn mà sẽ có lợi từ việc làm giảm hoặc ức chế sự biểu hiện gen HBV hoặc sao chép HBV, như bệnh do HBV.

Theo một số phương án, tác nhân dsARN gắn đích HBV được sử dụng cho đối tượng có tình trạng nhiễm HBV hoặc nhiễm cả HBV và HDV, hoặc bệnh do HBV sao cho sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen HBV, các mức nồng độ HBV ccc ADN, các mức nồng độ kháng nguyên HBV, các mức tải lượng virus HBV, ALT, hoặc AST, *ví dụ*, trong tế bào, mô, máu hoặc mô hoặc dịch khác của đối tượng này được giảm xuống, hoặc được bình thường hóa, ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 98% hoặc nhiều hơn về mức bình thường khi tác nhân dsARN được sử dụng cho đối tượng.

Các phương pháp và việc sử dụng theo sáng chế bao gồm, theo một số phương án, việc sử dụng chế phẩm được mô tả ở đây sao cho sự biểu hiện của gen HBV đích được giảm xuống, như trong khoảng 1 tháng. Theo một số phương án, sự biểu hiện của gen HBV đích được giảm xuống trong khoảng thời gian kéo dài, *ví dụ*, ít nhất là hai

tháng, ba tháng, hoặc lâu hơn. Theo một số phương án, phương pháp và việc sử dụng theo sáng chế bao gồm bước sử dụng chế phẩm được mô tả ở đây để gây ra tác dụng chữa khỏi về mặt chức năng.

Việc sử dụng dsARN theo các phương pháp và việc sử dụng được mô tả ở đây có thể gây ra tác dụng làm giảm sự nghiêm trọng, dấu hiệu, triệu chứng hoặc các dấu ấn của bệnh hoặc rối loạn này ở bệnh nhân có tình trạng nhiễm HBV hoặc nhiễm cả HBV và HDV, hoặc bệnh do HBV. Thuật ngữ “tác dụng làm giảm” trong ngữ cảnh này có nghĩa là sự giảm có ý nghĩa lâm sàng đối với mức này. Tác dụng làm giảm có thể là, ví dụ, ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 98%, hoặc đến thấp hơn mức phát hiện được.

Theo một số phương án, hiệu quả của các phương pháp theo sáng chế có thể được theo dõi bằng cách phát hiện hoặc theo dõi sự giảm triệu chứng của bệnh do HBV. Các triệu chứng này có thể được đánh giá *in vitro* hoặc *in vivo* bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Hiệu quả điều trị bệnh có thể được đánh giá, ví dụ, bằng cách đo diễn biến bệnh, sự thuyên giảm của bệnh, mức độ nghiêm trọng của triệu chứng, sự giảm đau, chất lượng sống, liều thuốc cần thiết để duy trì tác dụng điều trị, mức nồng độ dấu ấn của bệnh, hoặc tham số đo được bất kỳ khác thích hợp đối với bệnh đang được điều trị. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có khả năng theo dõi hiệu quả điều trị bằng cách đo bất kỳ một trong các tham số này, hoặc tổ hợp bất kỳ của các tham số này. Ví dụ, tác dụng điều trị CHB có thể được đánh giá, ví dụ, bằng cách theo dõi định kỳ tải lượng virus và các mức nồng độ transaminaza. Việc so sánh các kết quả đọc sau đó với các kết quả đọc ban đầu cung cấp cho bác sĩ chỉ dẫn là việc điều trị có hữu hiệu hay không. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có khả năng theo dõi hiệu quả điều trị bằng cách đo bất kỳ một trong các tham số này, hoặc tổ hợp bất kỳ của các tham số này. Liên quan đến việc sử dụng tác nhân dsARN gắn đích HBV hoặc được phẩm chứa nó, “có tác dụng kháng lại” bệnh do HBV chỉ ra rằng việc sử dụng theo cách thích hợp về mặt lâm sàng gây ra tác dụng có lợi cho ít nhất là một tỷ lệ có ý nghĩa thống kê của bệnh nhân, như cải thiện các triệu chứng, chữa khỏi, làm giảm bệnh, kéo dài sự sống, cải thiện chất lượng sống, hoặc tác dụng khác mà thường được công nhận là tích cực bởi bác sĩ thường xuyên điều trị tình trạng nhiễm HBV hoặc bệnh do HBV và các nguyên nhân kèm theo.

Tác dụng điều trị là rõ ràng khi có sự cải thiện có ý nghĩa lâm sàng ở một hoặc nhiều tham số của tình trạng bệnh, hoặc khi các triệu chứng không trầm trọng hơn hoặc không phát triển mà nếu theo cách khác, các triệu chứng này được dự đoán. Ví dụ là, sự thay đổi có lợi ít nhất là 50% của tham số đo được của bệnh, và tốt hơn là ít nhất là 70% hoặc nhiều hơn có thể chỉ ra là việc điều trị là hữu hiệu. Hiệu quả đối với dược chất là tác nhân dsARN này hoặc chế phẩm chứa dược chất này cũng có thể được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình động vật thử nghiệm cho bệnh này như đã biết trong lĩnh vực này. Khi sử dụng mô hình động vật thử nghiệm, hiệu quả điều trị được chứng minh khi tác dụng làm giảm có ý nghĩa thống kê đối với dấu hiệu hoặc triệu chứng được quan sát thấy.

Việc sử dụng tác nhân dsARN có thể làm giảm sự có mặt của HBV cccADN trong gan hoặc huyết thanh, sự có mặt của kháng nguyên HBV trong gan hoặc huyết thanh, *ví dụ*, HBsAg hoặc HBeAg; hoặc bình thường hóa mức nồng độ ALT, hoặc mức nồng độ AST, *ví dụ*, trong tế bào, mô, máu, nước tiểu, hoặc bộ phận khác của bệnh nhân ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95%, hoặc đến thấp hơn mức phát hiện được của thử nghiệm, hướng đến hoặc đến mức bình thường cao đối với trị số thí nghiệm.

Việc sử dụng tác nhân dsARN có thể làm cho sự có mặt của kháng thể kháng HBV trong gan hoặc huyết thanh có thể phát hiện được hoặc tăng lên, *ví dụ*, kháng thể kháng HBsAg, *ví dụ*, trong tế bào, mô, máu, hoặc bộ phận khác của bệnh nhân tăng lên ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc nhiều hơn; hoặc làm cho các kháng thể trở nên phát hiện được khi không thể phát hiện được trước khi điều trị.

Do tác dụng ức chế đối với sự biểu hiện HBV, theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế hoặc dược phẩm được bào chế từ chúng có thể làm tăng chất lượng sống.

Các đối tượng mà sẽ có lợi từ việc làm giảm hoặc ức chế sự biểu hiện gen HBV là các đối tượng có tình trạng nhiễm HBV hoặc bệnh hoặc rối loạn do HBV như được mô tả ở đây.

Việc điều trị cho đối tượng mà sẽ được lợi từ việc làm giảm hoặc ức chế sự biểu hiện gen HBV bao gồm điều trị chữa bệnh và điều trị phòng ngừa.

Sáng chế còn mô tả phương pháp và việc sử dụng tác nhân dsARN hoặc dược phẩm chứa chúng để điều trị cho đối tượng mà sẽ được lợi từ việc làm giảm hoặc ức chế sự biểu hiện gen HBV, *ví dụ*, đối tượng mắc bệnh do HBV, kết hợp với dược phẩm hoặc phương pháp điều trị khác, *ví dụ*, với các dược phẩm hoặc phương pháp đã biết, như, *ví*

dự, các dược phẩm hoặc phương pháp hiện đang được sử dụng để điều trị cho các rối loạn này.

Ví dụ, theo một số phương án, tác nhân dsARN gắn đích một hoặc nhiều gen HBV được sử dụng kết hợp với, *ví dụ*, chất hữu ích để điều trị bệnh do HBV như được mô tả ở đây. Ví dụ, dược phẩm và phương pháp điều trị bổ sung thích hợp để điều trị cho đối tượng mà sẽ được lợi từ việc làm giảm sự biểu hiện HBV, *ví dụ*, đối tượng mắc bệnh do HBV, bao gồm tác nhân dsARN gắn đích phần khác của bộ gen HBV, chất chống virus, chất tương tự nucleotit, chất tương tự nucleosit, chất ức chế transcriptaza đảo (*ví dụ*, Tenofovir disoproxil fumarat (TDF), Tenofovir alafenamit, Lamivudine, Adefovir dipivoxil, Entecavir (ETV), Telbivudine, AGX-1009, emtricitabine, clevudine, ritonavir, dipivoxil, lobucavir, famvir, FTC, N-acetyl-Cysteine (NAC), PC1323, theradigm-HBV, thymosin-alpha, và ganciclovir), chất kích thích miễn dịch (*ví dụ*, interferon alfa được peg hóa 2a (PEG-IFN- $\alpha$ 2a), Interferon alfa-2b, interleukin-7 người tái tổ hợp, và chất chủ vận thụ thể giống Toll 7 (TLR7)), vacxin điều trị (*ví dụ*, GS-4774, DV-601, và TG1050), chất ức chế sự xâm nhập của virus (*ví dụ*, Myrcludex), oligonucleotit ức chế sự tiết hoặc giải phóng HbsAg (*ví dụ*, REP 9AC), chất ức chế capsit (*ví dụ*, Bay41-4109 và NVR-1221), chất ức chế cccADN (*ví dụ*, IHVR-25), hoặc dược chất khác hoặc quy trình khác, *ví dụ*, phương pháp ghép gan hoặc hóa trị liệu, để điều trị bệnh do HBV, hoặc sự kết hợp bất kỳ trong các chất trên đây.

Đối tượng được sử dụng tác nhân dsARN theo sáng chế có thể được sử dụng thêm một hoặc nhiều dược chất khác mà gây tác dụng bằng cơ chế không qua ARNi và là hữu ích để điều trị tình trạng nhiễm HBV. Các dược chất điển hình có thể được sử dụng trong liệu pháp kết hợp theo sáng chế bao gồm chất điều hòa miễn dịch, mà kích thích hệ miễn dịch bằng cách, *ví dụ*, làm tăng hoạt tính trợ giúp tế bào T, thành thực tế bào lympho B, ức chế chất ngăn chặn tế bào T, và làm tăng sự biểu hiện HLA typ I. Các chất điều hòa miễn dịch thích hợp bao gồm interferon, mà có nhiều đặc điểm khác nhau bao gồm tác dụng chống virus, điều hòa miễn dịch, và chống tăng sinh.

Ví dụ, phương pháp điều trị hiện nay cho bệnh viêm gan B mạn tính là liệu pháp interferon, mà được sử dụng cho đối tượng có tình trạng nhiễm HBV đã được lập hồ sơ trong ít nhất là sáu tháng, có enzym gan tăng (AST và ALT), và virus phân chia chủ động trong máu của họ (xét nghiệm dương tính HBeAg, hoặc HBV ADN). Liệu pháp interferon- $\alpha$  gây ra sự thuyên giảm ổn định, trong thời gian kéo dài của bệnh ở khoảng

35% bệnh nhân mắc bệnh viêm gan B mạn tính, với sự bình thường hóa enzym gan và mất ba dấu ấn đối với sự nhiễm chủ động (HBeAg, HBV ADN, và HBsAg). Các đối tượng có tình trạng nhiễm HBV cấp tính, bệnh xơ gan giai đoạn cuối, hoặc các vấn đề y tế nghiêm trọng khác thường không được điều trị bằng interferon.

Ngoài ra, liệu pháp interferon cho bệnh nhân mắc bệnh xơ gan liên quan đến HBV làm giảm đáng kể tốc độ của bệnh ung thư biểu mô tế bào gan (HCC), đặc biệt là ở bệnh nhân có lượng HBV ADN huyết thanh lớn hơn. Ở bệnh nhân có bệnh xơ gan mất bù dương tính với HBeAg, sự thuyên giảm virus và hóa sinh sau liệu pháp interferon liên quan đến khả năng sống sót được cải thiện. Ở bệnh nhân có tình trạng nhiễm HBV mạn tính, sự đào thải HBeAg sau khi điều trị bằng interferon- $\alpha$  liên quan đến các kết quả lâm sàng được cải thiện. Thời gian điều trị tiêu chuẩn của liệu pháp được xem là 16 tuần. Bệnh nhân có mức sao chép virus thấp khi kết thúc phác đồ chuẩn được lợi nhiều nhất từ phương pháp điều trị kéo dài.

Theo một số phương án, các phương pháp theo sáng chế bao gồm bước sử dụng cho đối tượng có tình trạng nhiễm HBV hoặc bệnh do HBV chất ức chế transcriptaza đảo. Theo một số phương án, các phương pháp theo sáng chế bao gồm bước sử dụng cho đối tượng có tình trạng nhiễm HBV hoặc bệnh do HBV chất ức chế transcriptaza đảo và chất kích thích miễn dịch.

Tác nhân dsARN và dược chất bổ sung hoặc phương pháp điều trị bổ sung có thể được sử dụng đồng thời hoặc trong cùng một kết hợp, *ví dụ*, ngoài đường tiêu hóa, hoặc dược chất bổ sung có thể được sử dụng như một phần của chế phẩm riêng hoặc ở các thời điểm riêng biệt hoặc bằng phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này hoặc được mô tả ở đây.

Sáng chế còn mô tả phương pháp sử dụng tác nhân dsARN hoặc chế phẩm chứa tác nhân dsARN như được mô tả ở đây để làm giảm hoặc ức chế sự biểu hiện HBV trong tế bào. Theo các khía cạnh khác, việc sử dụng tác nhân dsARN hoặc chế phẩm chứa tác nhân dsARN như được mô tả ở đây để sản xuất thuốc để làm giảm hoặc ức chế sự biểu hiện gen HBV trong tế bào được mô tả. Vẫn theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tác nhân dsARN hoặc chế phẩm chứa tác nhân dsARN được mô tả ở đây để sử dụng trong việc làm giảm hoặc ức chế sự sao chép HBV trong tế bào. Theo các khía cạnh khác, việc sử dụng tác nhân dsARN hoặc chế phẩm chứa tác nhân dsARN được mô tả ở đây để sản xuất thuốc để làm giảm hoặc ức chế sự sao chép HBV trong tế bào được

mô tả. Phương pháp và ứng dụng này bao gồm bước cho tế bào tiếp xúc với tác nhân dsARN, như được mô tả ở đây và nuôi tế bào này trong khoảng thời gian đủ để thu được sự thoái biến sản phẩm phiên mã mARN của gen HBV, nhờ đó ức chế sự biểu hiện của gen HBV hoặc ức chế sự sao chép HBV trong tế bào.

Trong các phương pháp và ứng dụng được đề cập trên đây, tế bào này có thể được cho tiếp xúc *in vitro* hoặc *in vivo*, *nghĩa là*, tế bào này có thể nằm trong đối tượng.

Tế bào thích hợp cho việc điều trị bằng cách sử dụng phương pháp như được mô tả ở đây có thể là tế bào bất kỳ biểu hiện gen HBV, *ví dụ*, tế bào nhiễm HBV, tế bào chứa vectơ biểu hiện chứa bộ gen HBV hoặc một phần của gen HBV, hoặc chuột chuyển gen biểu hiện gen HBV. Tế bào thích hợp để sử dụng trong phương pháp và ứng dụng như được mô tả ở đây có thể là tế bào động vật có vú, *ví dụ*, tế bào linh trưởng (như tế bào người hoặc tế bào linh trưởng không phải người, *ví dụ*, tế bào khỉ hoặc tế bào tinh tinh) hoặc tế bào không phải linh trưởng (như tế bào chuột, tế bào chuột cống, hoặc tế bào động vật có vú khác). Theo một số phương án, tế bào này là tế bào có thể bị nhiễm HBV. Theo một số phương án, tế bào này là tế bào người, *ví dụ*, tế bào gan người.

Sự biểu hiện gen HBV có thể bị ức chế trong tế bào ít nhất là 80%, 85%, 90%, hoặc 95%, hoặc nhiều hơn, *ví dụ*, đến thấp hơn mức phát hiện được của thử nghiệm.

Sự sao chép HBV có thể bị ức chế trong tế bào ít nhất là 80%, 85%, 90%, hoặc 95%, hoặc nhiều hơn, *ví dụ*, đến thấp hơn mức phát hiện được của thử nghiệm.

Các phương pháp *in vivo* và các ứng dụng như được mô tả ở đây có thể bao gồm việc sử dụng cho đối tượng chế phẩm chứa tác nhân dsARN, trong đó tác nhân dsARN bao gồm trình tự nucleotit bổ sung với ít nhất là một phần của sản phẩm phiên mã ARN của gen HBV của động vật có vú cần được điều trị. Khi sinh vật cần được điều trị là người, chế phẩm này có thể được sử dụng bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không giới hạn ở sử dụng dưới da, trong tĩnh mạch hoặc trong cơ. Theo một số phương án, các chế phẩm này được sử dụng bằng cách tiêm dưới da. Theo một số phương án, tác nhân dsARN được bào chế để sử dụng toàn bộ liều bằng một lần tiêm duy nhất. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các chế phẩm được bào chế để tiêm đặc hiệu cơ quan (*ví dụ*, gan) trong động mạch, trong khối u, trong da, trong thủy tinh thể, khu trú trong mắt, cho mắt (thuốc nhỏ mắt), khí dung, khu trú trong mắt hoặc các đường khu trú khác, thuốc đạn, hoặc sử dụng bằng đường miệng.

Theo một khía cạnh, sáng chế còn mô tả phương pháp ức chế sự biểu hiện của gen HBV ở động vật có vú, *ví dụ*, người. Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa tác nhân dsARN gắn đích gen HBV trong tế bào của động vật có vú để sử dụng trong việc ức chế sự biểu hiện của gen HBV ở động vật có vú. Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng tác nhân dsARN gắn đích gen HBV trong tế bào của động vật có vú để sản xuất thuốc để ức chế sự biểu hiện của gen HBV ở động vật có vú.

Phương pháp và ứng dụng này bao gồm bước sử dụng cho động vật có vú, *ví dụ*, người, chế phẩm chứa tác nhân dsARN gắn đích gen HBV trong tế bào của động vật có vú và nuôi động vật có vú này trong thời gian đủ để đạt được sự thoái biến của sản phẩm phiên mã mRNA của gen HBV, nhờ đó ức chế sự biểu hiện của gen HBV ở động vật có vú.

Theo một số phương án, sự giảm biểu hiện gen có thể được đánh giá trong mẫu máu ngoại vi của đối tượng đã được sử dụng tác nhân dsARN bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, *ví dụ*, qRT-PCR, được mô tả ở đây. Sự giảm sản sinh protein có thể được đánh giá bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này và bằng phương pháp, *ví dụ*, ELISA hoặc thẩm tách western, được mô tả ở đây. Các phương pháp được chấp thuận về mặt lâm sàng để xác định các mức biểu hiện gen và protein được sử dụng nếu cần. Theo một số phương án, mẫu sinh thiết chọc gan đóng vai trò là vật liệu mô để theo dõi sự giảm biểu hiện gen HBV hoặc protein. Trong một số phương án khác, mẫu máu đóng vai trò là vật liệu mô để theo dõi sự giảm biểu hiện gen hoặc protein HBV.

Theo một số phương án, việc kiểm tra tác dụng cắt gây ra bởi RISC đối với đích *in vivo* sau khi sử dụng tác nhân dsARN được thực hiện bằng cách tiến hành 5'-RACE hoặc các biến đổi của quy trình này như đã biết trong lĩnh vực này (Lasham A *et al.*, (2010) *Nucleic Acid Res.*, 38 (3) p-e19) (Zimmermann *et al.* (2006) *Nature* 441: 111-4).

Sáng chế được minh họa thêm bằng các ví dụ sau đây, các ví dụ này không được hiểu là làm giới hạn sáng chế.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

#### **Ví dụ 1**

#### **Tổng hợp tác nhân dsARN**

### Nguồn chất phản ứng

Khi nguồn chất phản ứng không được đưa ra cụ thể ở đây, chất phản ứng này có thể thu được từ nhà cung cấp chất phản ứng sinh học phân tử bất kỳ ở tiêu chuẩn chất lượng/độ tinh khiết để áp dụng trong sinh học phân tử.

### Thiết kế tác nhân dsARN

Như được mô tả trong WO/2016/077321, việc lựa chọn thiết kế dsARN gắn đích HBV được quyết định bởi hai yếu tố chính: a) hiệu lực, và b) mong muốn sử dụng các tác nhân có các bắt cặp gần như hoàn hảo và có tỷ lệ bao trùm lớn hơn 90% số lượng lớn các trình tự HBV công khai thuộc tất cả các kiểu gen đã biết (A đến H). Các chỉ số phối trí để lựa chọn tác nhân ARN được xác định so với trình tự bộ gen tham chiếu NCBI HBV NC\_003977.1 (số truy cập GenBank GI:21326584 (SEQ ID NO:1)). Tập hợp thứ nhất của các tác nhân ARN chứa các biến đổi cấu trúc-hoạt tính, bao gồm nhiều mẫu thể 2'-O-metyl và 2'-floro khác nhau, tập trung vào hai vùng liền kề của bộ gen HBV mã hóa kháng nguyên bề mặt (HbSAg) và HBV polymeraza, được thiết kế, tổng hợp, và sàng lọc *in vitro*. Tập hợp thứ hai của các tác nhân gắn đích các vùng bổ sung trong bộ gen HBV, cụ thể là các vị trí 1581-1599 của SEQ ID NO:1, vùng mã hóa HbSAg, polymeraza, và gen X, cũng được thiết kế, tổng hợp và sàng lọc *in vitro*. Các trình tự đã chọn được biến đổi hóa học và kiểm tra thêm. Các thiết kế chuỗi kép này được cung cấp trong WO2016/077321 (toàn bộ nội dung của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn); danh sách chi tiết các trình tự nucleotit chuỗi có nghĩa và đối nghĩa HBV chưa biến đổi được cung cấp trong Bảng 3, 6, 12, 22, và 25 trong WO2016/077321, và danh sách chi tiết các trình tự nucleotit chuỗi có nghĩa và đối nghĩa HBV biến đổi được cung cấp trong Bảng 4, 7, 13, 23, và 26 trong WO2016/077321. Các kết quả từ các thử nghiệm sàng lọc được thực hiện với các tác nhân này cũng được cung cấp trong đó.

Các nghiên cứu này nhận diện chuỗi kép AD-66810 có chuỗi đối nghĩa với trình tự nucleotit biến đổi 5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:13) và chuỗi có nghĩa với trình tự nucleotit biến đổi 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29) trong đó a, c, g, và u lần lượt là 2'-O-metyladenosin-3'-phosphat, 2'-O-metylxytidin-3'-phosphat, 2'-O-metylguanosin-3'-phosphat, và 2'-O-metyluridin-3'-phosphat; Af, Cf, Gf, và Uf lần lượt là 2'-floadenosin-3'-phosphat, 2'-floxtydin-3'-phosphat, 2'-floguanosin-3'-phosphat, và 2'-flouridin-3'-phosphat; và s là nhóm liên kết

phosphorothioat; và trong đó gốc N-axetylgalactosamin N-[tris(GalNAc-alkyl)-amidodecanoyl]-4-hydroxyprolinol (còn được biết là (Hyp-(GalNAc-alkyl)<sub>3</sub>) hoặc được gọi ở đây là L96) được liên kết đồng hóa trị với đầu 3' của chuỗi có nghĩa.

Nghiên cứu xa hơn được đưa ra ở đây được thực hiện để xác định các phân tử tác nhân dsARN đặc hiệu và có hiệu lực dựa trên trình tự đã nhận diện trước đó AD-66810, gắn đích sản phẩm phiên mã X của virus viêm gan B người (HBV; U95551). Để đạt được mục đích này, một loạt tác nhân dsARN được biến đổi hóa học được thiết kế, tổng hợp và thử nghiệm về hoạt tính *in vitro* bằng cách sử dụng thử nghiệm dựa trên gen thông báo Dual-Luc và dòng tế bào HepG2.2.15. Tất cả các hợp chất được liên hợp với phối tử N-axetylgalactosamin (GalNAc) có ba râu (L96) được liên kết đồng hóa trị với đầu 3' của chuỗi có nghĩa.

#### Tổng hợp tác nhân dsARN

Các trình tự chuỗi có nghĩa và đối nghĩa HBV được tổng hợp ở thang 1  $\mu\text{mol}$  trên máy tổng hợp Mermade 192 (BioAutomation) sử dụng hóa học phosphoramidit qua trung gian nền rắn. Nền rắn là thủy tinh xốp (controlled pore glass: 500 Å) được nạp bằng phối tử GalNAc đặt theo yêu cầu hoặc nền rắn thông dụng (hóa sinh AM). Chất phản ứng tổng hợp phụ trợ, 2'-F và 2'-O-Metyl ARN, và deoxy phosphoramidit thu được từ Thermo-Fisher<sup>TM</sup> (Milwaukee, WI) và Hongene (Trung Quốc). 2'-F 2'-O-Metyl, GNA (axit glycol nucleic), 5'-phosphat, và các biến đổi làm mất bazơ được đưa vào bằng cách sử dụng các phosphoramidit tương ứng. Quy trình tổng hợp các chuỗi đơn được liên hợp 3' GalNAc được thực hiện trên nền CPG được biến đổi bằng GalNAc. Nền rắn thông dụng CPG đặt theo yêu cầu được sử dụng để tổng hợp các chuỗi đơn đối nghĩa. Thời gian tạo cặp cho tất cả phosphoramidit (100 mM trong axetonitril) là 5 phút sử dụng 5-ethylthio-1H-tetrazol (ETT) làm chất hoạt hóa (0,6 M trong axetonitril). Các nhóm liên kết phosphorothioat được tạo ra bằng cách sử dụng dung dịch 50 mM của 3-((dimethylamino-metyliden) amino)-3H-1,2,4-dithiazol-3-thion (DDTT, thu được từ Chemgenes (Wilmington, MA, USA)) trong axetonitril khan/pyridin (1:1 v/v). Thời gian oxy hóa là 3 phút. Tất cả các trình tự được tổng hợp với sự loại bỏ nhóm DMT sau cùng (“mất DMT”).

Khi hoàn thành quá trình tổng hợp pha rắn, oligoribonucleotit được cắt khỏi nền rắn và được khử bảo vệ trong các đĩa 96 giếng sâu được bịt kín sử dụng 200  $\mu\text{L}$  chất phản ứng metylamin nước ở 60°C trong 20 phút. Khi kết thúc bước cắt và khử bảo vệ,

đĩa tổng hợp được để đến nhiệt độ phòng và được kết tủa bằng cách bổ sung 1 mL hỗn hợp axetontil:etanol (9:1). Các đĩa được để nguội ở  $-80^{\circ}\text{C}$  trong 2 giờ, dịch nổi được gạn cẩn thận với sự hỗ trợ của pipet đa kênh. Pelet oligonucleotit được tạo huyền phù lại trong đệm 20mM NaOAc và được khử muối bằng cách sử dụng cột loại cỡ 5 mL HiTrap<sup>TM</sup> (GE Healthcare<sup>TM</sup>) trên Hệ thống tinh chế AKTA được lắp với máy lấy mẫu tự động A905 và máy hứng phân đoạn Frac 950. Các mẫu đã khử muối được lấy vào các đĩa 96 giếng. Các mẫu từ mỗi trình tự được phân tích bằng LC-MS để xác nhận tính đồng nhất, UV (260 nm) để định lượng, và tập hợp mẫu đã chọn bằng sắc ký IEX để xác định độ tinh khiết.

Sự gắn mỗi các chuỗi đơn HBV được thực hiện trên robot xử lý chất lỏng Tecan. Hỗn hợp đẳng mol của các chuỗi có nghĩa và đối nghĩa được kết hợp và được bắt cặp trong các đĩa 96 giếng. Sau khi kết hợp các chuỗi đơn bổ sung, đĩa 96 giếng này được bịt kín và được gia nhiệt trong lò ở  $100^{\circ}\text{C}$  trong 10 phút và được để nguội từ từ đến nhiệt độ phòng trong thời gian 2-3 giờ. Nồng độ của mỗi chuỗi kép được chuẩn hóa đến  $10\mu\text{M}$  trong 1X PBS.

Các từ viết tắt cho monome nucleotit biến đổi được mô tả ở đây được thể hiện trong Bảng 1. Bảng 2 thể hiện AD-66810 và tác nhân dsARN HBV được tổng hợp bằng cách sử dụng các phương pháp trên đây.

Bảng 1. Từ viết tắt của các monome nucleotit được sử dụng để thể hiện trình tự axit nucleic biến đổi.

Sẽ được hiểu là, trừ khi có quy định khác, các monome này, khi có mặt trong oligonucleotit, được liên kết với nhau bằng các liên kết 5'-3'-phosphodiester.

| Từ viết tắt | (Các) nucleotit                     |
|-------------|-------------------------------------|
| A           | adenosin-3'-phosphat                |
| Af          | 2'-floadenosin-3'-phosphat          |
| Afs         | 2'-floroadenosin-3'-phosphorothioat |
| As          | adenosin-3'-phosphorothioat         |
| C           | xytidin-3'-phosphat                 |
| Cf          | 2'-floxtydin-3'-phosphat            |
| Cfs         | 2'-floroxtydin-3'-phosphorothioat   |
| Cs          | xytidin-3'-phosphorothioat          |

| Từ viết tắt | (Các) nucleotit                                                                     |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| G           | guanosin-3'-phosphat                                                                |
| Gf          | 2'-floguanosin-3'-phosphat                                                          |
| Gfs         | 2'-floguanosin-3'-phosphorothioat                                                   |
| Gs          | guanosin-3'-phosphorothioat                                                         |
| T           | 5'-metyluridin-3'-phosphat                                                          |
| Tf          | 2'-flo-5-metyluridin-3'-phosphat                                                    |
| Tfs         | 2'-flo-5-metyluridin-3'-phosphorothioat                                             |
| Ts          | 5-metyluridin-3'-phosphorothioat                                                    |
| U           | uridin-3'-phosphat                                                                  |
| Uf          | 2'-flouridin-3'-phosphat                                                            |
| Ufs         | 2'-flouridin-3'-phosphorothioat                                                     |
| Us          | uridin-3'-phosphorothioat                                                           |
| a           | 2'-O-metyladenosin-3'-phosphat                                                      |
| as          | 2'-O-metyladenosin-3'-phosphorothioat                                               |
| c           | 2'-O-metylxytidin-3'-phosphat                                                       |
| cs          | 2'-O-metylxytidin-3'-phosphorothioat                                                |
| g           | 2'-O-metylguanosin-3'-phosphat                                                      |
| gs          | 2'-O-metylguanosin-3'-phosphorothioat                                               |
| t           | 2'-O-metyl-5-metyluridin-3'-phosphat                                                |
| ts          | 2'-O-metyl-5-metyluridin-3'-phosphorothioat                                         |
| u           | 2'-O-metyluridin-3'-phosphat                                                        |
| us          | 2'-O-metyluridin-3'-phosphorothioat                                                 |
| s           | nhóm liên kết phosphorothioat                                                       |
| L96         | N-[tris(GalNAc-alkyl)-amidodecanoyl]-4-hydroxyprolinol (hoặc "Hyp-(GalNAc-alkyl)3") |
| (Agn)       | adenosin-axit glycol nucleic (GNA)                                                  |
| (Asn)       | adenosin-serinol-axit nucleic (SNA)                                                 |
| (Gsn)       | guanosin-serinol-axit nucleic (SNA)                                                 |
| dA          | 2'-deoxyadenosin-3'-phosphat                                                        |
| dAs         | 2'-deoxyadenosin-3'-phosphorothioat                                                 |

| Từ viết tắt | (Các) nucleotit                     |
|-------------|-------------------------------------|
| dC          | 2'-deoxyxytidin-3'-phosphat         |
| dCs         | 2'-deoxyxytidin-3'-phosphorothioat  |
| dG          | 2'-deoxyguanosin-3'-phosphat        |
| dGs         | 2'-deoxyguanosin-3'-phosphorothioat |
| dT          | 2'-deoxythymidin-3'-phosphat        |
| dTs         | 2'-deoxythymidin-3'-phosphorothioat |
| dU          | 2'-deoxyuridin                      |
| dUs         | 2'-deoxyuridin-3'-phosphorothioat   |

Bảng 2. Các trình tự nucleotit biến đổi của tác nhân dsARN HBV liên hợp GalNAc

| ID chuỗi kép | Trình tự có nghĩa (5' đến 3') | SEQ ID | Trình tự đối nghĩa (5' đến 3')      | SEQ ID |
|--------------|-------------------------------|--------|-------------------------------------|--------|
| AD-66810     | gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96  | 10     | usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu     | 13     |
| AD-192282    | gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96  | 10     | usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfdCacsusu | 14     |
| AD-192289    | gsusgugcdAcdTucgcuucacaL96    | 11     | usdGsuga(Asn)gcgaadGudGcacacsusu    | 15     |
| AD-81890     | gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96  | 10     | usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu  | 16     |
| AD-81892     | gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96  | 10     | usGfsuga(Agn)gcgaaguGfcAfcacsusu    | 17     |
| AD-192290    | gsusgugcadCdTucgcuucacaL96    | 12     | usdGsuga(Asn)gcgaadGudGcacacsusu    | 15     |
| AD-192283    | gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96  | 10     | usGfsuga(Agn)gcgaaguGfdCAfcacsusu   | 18     |
| AD-192291    | gsusgugcdAcdTucgcuucacaL96    | 11     | usdGsugaa(Gsn)cgaadGudGcacacsusu    | 19     |
| AD-192277    | gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96  | 10     | usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu | 20     |
| AD-192284    | gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96  | 10     | usGfsuga(Agn)gcgaaguGfcAfdCacsusu   | 21     |
| AD-192292    | gsusgugcadCdTucgcuucacaL96    | 12     | usdGsugaa(Gsn)cgaadGudGcacacsusu    | 19     |
| AD-192285    | gsusgugcdAcdTucgcuucacaL96    | 11     | usdGsuga(Agn)gcgaadGudGcacacsusu    | 22     |
| AD-192293    | gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96  | 10     | usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu    | 23     |
| AD-192279    | gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96  | 10     | usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu | 24     |
| AD-192286    | gsusgugcadCdTucgcuucacaL96    | 12     | usdGsuga(Agn)gcgaadGudGcacacsusu    | 22     |
| AD-192294    | gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96  | 10     | usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu   | 25     |
| AD-192280    | gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96  | 10     | usGfsuga(Agn)gdCGfaaguGfcAfcacsusu  | 26     |
| AD-192287    | gsusgugcdAcdTucgcuucacaL96    | 11     | usdGsuga(Agn)gcgaadGudGcdAcacsusu   | 27     |
| AD-192281    | gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96  | 10     | usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu | 28     |
| AD-192288    | gsusgugcadCdTucgcuucacaL96    | 12     | usdGsuga(Agn)gcgaadGudGcdAcacsusu   | 27     |

## Ví dụ 2

Sàng lọc in vitro các chuỗi kép tác nhân dsARN

### Thử nghiệm Dual-Glo® Luciferaza:

Các tế bào Cos7 (ATCC®, Manassas, VA) được nuôi đến gần hợp dòng ở 37°C trong khí quyển 5% CO<sub>2</sub> trong DMEM (ATCC) được bổ sung 10% FBS, trước khi được giải phóng từ đĩa bằng cách tripsin hóa. Sự chuyển nhiễm các tế bào Cos7 với tác nhân

tạo chuỗi kép và psiCHECK2-HBV (vector biểu hiện chứa trình tự nucleotit mã hóa một phần của trình tự HBV kiểu hoang liên ứng; SEQ ID NO:5), hoặc tác nhân tạo chuỗi kép và các vector psiCHECK2 biểu hiện trình tự nucleotit của HBV kiểu gen A, C, E, hoặc F (lần lượt là SEQ ID NO:6, 7, 8, hoặc 9), được thực hiện bằng cách bổ sung 5µl chuỗi kép ARN và 5µl plasmid psiCHECK2-HBV (hoặc psiCHECK2-HBV kiểu gen A, C, E, hoặc F) mỗi giếng cùng với 5µl Opti-MEM® cộng 0,1µl Lipofectamin™ RNAiMax mỗi giếng (Invitrogen™, Carlsbad CA. cat # 13778-150) và sau đó ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Sau đó hỗn hợp này được bổ sung vào các tế bào, mà được tạo huyền phù lại trong 35µl môi trường hoàn chỉnh mới. Các tế bào đã chuyển nhiễm được ủ ở 37°C trong khí quyển 5% CO<sub>2</sub>.

Bốn mươi tám giờ sau khi tác nhân dsARN và plasmid psiCHECK2 được chuyển nhiễm; luciferaza Firefly (đối chứng chuyển nhiễm) và Renilla (được dung hợp với trình tự đích HBV) được đo. Đầu tiên, môi trường được loại bỏ khỏi các tế bào. Sau đó hoạt tính luciferaza Firefly được đo bằng cách bổ sung 20ul chất phản ứng luciferaza Dual-Glo® bằng thể tích môi trường nuôi cấy vào mỗi giếng và trộn. Hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trước khi sự phát quang (500nm) được đo trên Spectramax® (Molecular Devices) để phát hiện tín hiệu luciferaza Firefly. Hoạt tính luciferaza Renilla được đo bằng cách bổ sung ở nhiệt độ phòng 20µl chất phản ứng Dual-Glo® Stop & Glo® vào mỗi giếng và các đĩa được ủ trong 10-15 phút trước khi sự phát quang được đo lại để xác định tín hiệu luciferaza Renilla. Chất phản ứng Dual-Glo® Stop & Glo® dập tắt tín hiệu luciferaza firefly và sự phát quang được duy trì đối với phản ứng Renilla luciferaza. Hoạt tính của tác nhân dsARN được xác định bằng cách chuẩn hóa tín hiệu Renilla (HBV) đến tín hiệu Firefly (đối chứng) trong mỗi giếng. Cường độ hoạt tính của tác nhân dsARN sau đó được đánh giá so với các tế bào được chuyển nhiễm bằng cùng một vector nhưng không được xử lý bằng tác nhân dsARN hoặc được xử lý bằng tác nhân dsARN không gắn đích. Tất cả các lần chuyển nhiễm được thực hiện với n=2 hoặc lớn hơn.

Các kết quả của các thử nghiệm này sử dụng các chất được liệt kê trong Bảng 2 được cung cấp trong Bảng 3.

#### Sàng lọc HepG2.2.15 và PLC *in vitro*:

Các tế bào HepG2.2.15 và PLC (các tế bào ung thư gan người; ATCC® CRL-8024) được nuôi đến gần hợp dòng ở 37°C trong khí quyển 5% CO<sub>2</sub> lần lượt trong môi

trường DMEM hoặc EMEM (ATCC) được bổ sung 10% FBS (ATCC) trước khi được giải phóng từ đĩa bằng phản ứng trypsin hóa. Chuyển nhiễm đảo được thực hiện bằng cách bổ sung 5µl các chuỗi kép tác nhân dsARN mỗi giếng vào đĩa 96 giếng cùng với 14,8µl Opti-MEM® cộng 0,2µl Lipofectamin™ RNAiMax mỗi giếng (Invitrogen™, Carlsbad CA, cat # 13778-150) và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Tám mươi micro lit môi trường sinh trưởng đầy đủ không có kháng sinh chứa  $2 \times 10^4$  tế bào HepG2.2.15 hoặc PLC sau đó được bổ sung vào. Các tế bào được ủ trong 24, 48, và 72 giờ trước khi tinh chế ARN.

Các kết quả của các thử nghiệm này sử dụng các chất được liệt kê trong Bảng 2 được cung cấp trong Bảng 4.

Tách ARN toàn phần bằng cách sử dụng kit tách chiết ARN toàn phần MagMAX-96 (Applied Biosystem, Foster City CA, part #: AM1830):

Các tế bào được thu hoạch và được dung giải trong 140µl dung dịch dung giải/liên kết sau đó được trộn trong 1 phút ở 850 vòng/phút sử dụng máy trộn nhiệt Eppendorf™ (tốc độ trộn là giống nhau trong toàn bộ quá trình). Hai mươi microlit hạt từ và hỗn hợp chất tăng cường dung giải/liên kết được bổ sung vào dịch dung giải tế bào và được trộn trong 5 phút. Các hạt từ được bắt giữ bằng cách sử dụng đế từ và dịch nổi được lấy ra mà không làm xáo trộn các hạt. Sau khi loại bỏ dịch nổi, các hạt từ được rửa với dung dịch rửa 1 (isopropanol được bổ sung vào) và được trộn trong 1 phút. Các hạt lại được bắt giữ và dịch nổi được loại bỏ. Sau đó các hạt được rửa với 150µl dung dịch rửa 2 (etanol được bổ sung vào), được bắt giữ và dịch nổi được loại bỏ. Năm mươi µl hỗn hợp DNaza (đệm MagMax turbo DNaza và Turbo DNaza) sau đó được bổ sung vào các hạt và chúng được trộn trong 10 đến 15 phút. Sau khi trộn, 100µl dung dịch liên kết lại ARN được bổ sung vào và được trộn trong 3 phút. Dịch nổi được loại bỏ và các hạt từ được rửa lại bằng 150µl dung dịch rửa 2 và được trộn trong 1 phút và dịch nổi được loại bỏ hoàn toàn. Các hạt từ được trộn trong 2 phút đến khô trước khi ARN được rửa giải bằng 50µl nước.

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

Hỗn hợp gốc của 2µl đệm 10X, 0,8µl 25X dNTP, 2µl đoạn mồi Random, 1µl Transcriptaza đảo, 1µl chất ức chế RNaza và 3,2µl H<sub>2</sub>O cho mỗi phản ứng được bổ sung vào 10µl ARN toàn phần. cADN được tạo ra bằng cách sử dụng Bio-Rad® C-1000 hoặc

máy luân nhiệt S-1000 (Hercules, CA) qua các bước sau đây: 25°C 10 phút, 37°C 120 phút, 85°C 5 giây, giữ ở 4°C.

PCR thời gian thực:

Hai  $\mu$ l cADN được bổ sung vào hỗn hợp gốc chứa 0,5  $\mu$ l đoạn dò GAPDH người TaqMan (Applied Biosystems Cat # 4319413E), 1  $\mu$ l đoạn dò TaqMan® đặc hiệu SORF2 và 5  $\mu$ l hỗn hợp gốc đoạn dò Lightcycler 480 (Roche Cat # 04887301001) mỗi giếng trong các đĩa 384 giếng (Roche cat # 04887301001). PCR thời gian thực được thực hiện trong hệ thống PCR thời gian thực LightCycler480 (Roche) sử dụng thử nghiệm DDCT(RQ). Để tính số lần thay đổi tương đối, số liệu thời gian thực được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp DDCT và được chuẩn hóa đến các thử nghiệm được thực hiện với các tế bào được chuyển nhiễm với AD-1955, hoặc các tế bào đã chuyển nhiễm giả.

Để tính số lần thay đổi tương đối, số liệu thời gian thực được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp DDCT và được chuẩn hóa đến các thử nghiệm được thực hiện với các tế bào được chuyển nhiễm với tác nhân dsARN đối chứng không gắn đích.

Ví dụ 3

Chuyển nhiễm tác nhân dsARN gắn đích HBV liên hợp GALNAc trong hệ  
DUAL-LUC

Kỹ thuật tắt gen HBV mRNA sau khi chuyển nhiễm với mỗi tác nhân dsARN liên hợp được thể hiện trong Bảng 3. Mỗi tác nhân dsARN được thử nghiệm bằng cách chuyển nhiễm trong các tế bào Cos7 ở nồng độ tác nhân dsARN là 50nM, 10nM, và 0,1nM. Dựa vào các kết quả sàng lọc, 7 trong số 20 tác nhân dsARN chứng minh hiệu quả tương đương với phân tử gốc AD-66810.

Bảng 3. Kết quả sàng lọc sử dụng thử nghiệm Dual-Luc của tác nhân dsARN HBV liên hợp được chuyển nhiễm ở 50nM, 10nM, hoặc 1nM

| ID chuỗi kép | (%) <sup>a</sup> Thông tin còn lại của tác nhân dsARN HBV Trung bình $\pm$ SD |                   |                    |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|
|              | 50 nM                                                                         | 10 nM             | 0,1 nM             |
| AD-66810     | 43,18 $\pm$ 5,33                                                              | 43,83 $\pm$ 3,07  | 108,98 $\pm$ 13,64 |
| AD-192282    | 51,82 $\pm$ 2,45                                                              | 58,09 $\pm$ 12,10 | 121,63 $\pm$ 7,49  |
| AD-192289    | 71,82 $\pm$ 12,28                                                             | 84,84 $\pm$ 6,00  | 115,35 $\pm$ 16,01 |
| AD-81890     | 47,09 $\pm$ 3,36                                                              | 53,70 $\pm$ 7,58  | 112,10 $\pm$ 15,95 |
| AD-81892     | 62,70 $\pm$ 1,42                                                              | 55,04 $\pm$ 6,21  | 107,79 $\pm$ 14,23 |
| AD-192290    | 78,23 $\pm$ 5,63                                                              | 77,77 $\pm$ 6,00  | 98,24 $\pm$ 4,13   |
| AD-192283    | 54,62 $\pm$ 3,97                                                              | 46,70 $\pm$ 9,86  | 113,80 $\pm$ 21,17 |

| ID chuỗi kép | (%) <sup>a</sup> Thông tin còn lại của tác nhân dsARN HBV Trung bình $\pm$ SD |                   |                    |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|
|              | 50 nM                                                                         | 10 nM             | 0,1 nM             |
| AD-192291    | 73,97 $\pm$ 6,80                                                              | 64,32 $\pm$ 5,52  | 111,71 $\pm$ 10,18 |
| AD-192277    | 43,08 $\pm$ 1,58                                                              | 34,82 $\pm$ 4,23  | 103,32 $\pm$ 12,95 |
| AD-192284    | 70,20 $\pm$ 5,87                                                              | 54,10 $\pm$ 3,08  | 119,01 $\pm$ 12,73 |
| AD-192292    | 70,91 $\pm$ 13,89                                                             | 65,99 $\pm$ 3,57  | 102,58 $\pm$ 8,12  |
| AD-192285    | 86,15 $\pm$ 7,45                                                              | 91,39 $\pm$ 8,92  | 116,62 $\pm$ 8,93  |
| AD-192293    | 48,05 $\pm$ 0,45                                                              | 46,38 $\pm$ 6,26  | 120,84 $\pm$ 10,62 |
| AD-192279    | 51,29 $\pm$ 6,93                                                              | 38,35 $\pm$ 2,50  | 114,22 $\pm$ 10,41 |
| AD-192286    | 89,16 $\pm$ 12,87                                                             | 88,74 $\pm$ 4,44  | 118,16 $\pm$ 12,97 |
| AD-192294    | 54,36 $\pm$ 5,03                                                              | 41,89 $\pm$ 5,61  | 114,19 $\pm$ 11,55 |
| AD-192280    | 49,20 $\pm$ 7,13                                                              | 57,22 $\pm$ 14,47 | 116,35 $\pm$ 6,87  |
| AD-192287    | 81,73 $\pm$ 14,38                                                             | 84,10 $\pm$ 10,24 | 127,11 $\pm$ 12,61 |
| AD-192281    | 38,74 $\pm$ 4,01                                                              | 38,45 $\pm$ 4,54  | 120,99 $\pm$ 7,00  |
| AD-192288    | 85,37 $\pm$ 9,30                                                              | 86,14 $\pm$ 5,32  | 118,09 $\pm$ 9,30  |

Từ viết tắt: ID=định danh; SD=độ lệch chuẩn

<sup>a</sup> Tỷ lệ biểu hiện HBV tương đối còn lại (so với tế bào được chuyển nhiễm đối chứng) 48 giờ sau khi chuyển nhiễm của quá trình sàng lọc tập hợp tác nhân dsARN HBV.

#### Ví dụ 4

Chuyển nhiễm tác nhân dsARN gắn đích HBV liên hợp GALNAc trong tế bào HEPG2.2.15

Kỹ thuật làm tắt gen HBV mRNA (PORF1 và SORF2 mRNA như được xác định bằng cách sử dụng đoạn môi xuôi và ngược và đoạn dò TaqMan) trong các tế bào HepG2.2.15 sau khi chuyển nhiễm với mỗi tác nhân dsARN đã liên hợp được thể hiện trong Bảng 4. Nói chung, sự tắt mạnh hơn của các sản phẩm phiên mã virus PORF1 và SORF2 được quan sát thấy trong các tế bào HepG2.2.15 so với sự tắt được quan sát thấy trong hệ biểu hiện quá mức Dual-Luc, với 10 tác nhân dsARN có hiệu lực tương đương với phân tử gốc AD-66810 gốc. Hoạt tính tác nhân dsARN tương tự được quan sát thấy đối với PORF1 và SORF2 mRNA, điều này được dự kiến vì vị trí đích của tác nhân dsARN có mặt trong cả hai sản phẩm phiên mã.

Bảng 4. Kết quả sàng lọc bằng cách sử dụng HepG2.2.15 chứa tác nhân dsARN HBV liên hợp được chuyển nhiễm ở 50nM, 10nM, hoặc 1nM

| ID chuỗi kép | % PORF1 còn lại (10nM) <sup>a</sup> | SD   | % PORF1 còn lại (0,1nM) <sup>a</sup> | SD   | % SORF2 còn lại (10nM) <sup>a</sup> | SD   | % SORF2 còn lại (0,1nM) <sup>a</sup> | SD   |
|--------------|-------------------------------------|------|--------------------------------------|------|-------------------------------------|------|--------------------------------------|------|
| AD-66810     | 22,9                                | 0,2  | 114,3                                | 22,4 | 22,2                                | 0,3  | 110,0                                | 19,3 |
| AD-192282    | 29,7                                | 2,2  | 84,9                                 | 1,2  | 28,5                                | 1,3  | 79,9                                 | 1,6  |
| AD-192289    | 71,1                                | 13,7 | 83,8                                 | 9,9  | 72,7                                | 16,2 | 92,1                                 | 10,8 |
| AD-81890     | 34,2                                | 7,1  | 85,5                                 | 19,6 | 33,7                                | 9,1  | 93,4                                 | 26,6 |
| AD-81892     | 32,9                                | 0,1  | 82,2                                 | 8,5  | 28,1                                | 2,6  | 79,9                                 | 9,0  |
| AD-192290    | 72,9                                | 19,3 | 86,0                                 | 7,6  | 63,3                                | 9,2  | 92,9                                 | 12,7 |
| AD-192283    | 38,7                                | 18,5 | 82,0                                 | 18,7 | 31,0                                | 14,5 | 80,2                                 | 12,9 |
| AD-192291    | 62,9                                | 16,1 | 80,2                                 | 17,6 | 54,0                                | 13,3 | 86,2                                 | 20,1 |
| AD-192277    | 33,9                                | 15,4 | 74,2                                 | 17,4 | 29,0                                | 11,9 | 76,9                                 | 15,7 |
| AD-192284    | 33,4                                | 8,5  | 82,4                                 | 6,5  | 25,9                                | 8,2  | 78,6                                 | 2,7  |
| AD-192292    | 52,2                                | 5,3  | 80,1                                 | 0,9  | 47,1                                | 6,2  | 84,4                                 | 7,8  |
| AD-192285    | 85,5                                | 1,0  | 85,8                                 | 10,6 | 73,1                                | 8,5  | 84,8                                 | 2,9  |
| AD-192293    | 26,9                                | 1,8  | 79,1                                 | 21,9 | 24,0                                | 1,7  | 79,7                                 | 16,3 |
| AD-192279    | 27,2                                | 4,5  | 81,0                                 | 11,1 | 22,7                                | 4,7  | 77,8                                 | 13,7 |
| AD-192286    | 91,6                                | 2,5  | 92,4                                 | 5,8  | 80,3                                | 4,7  | 93,1                                 | 4,6  |
| AD-192294    | 25,7                                | 2,1  | 78,2                                 | 4,3  | 23,1                                | 1,5  | 78,6                                 | 10,8 |
| AD-192280    | 39,7                                | 11,8 | 83,9                                 | 20,8 | 30,1                                | 8,6  | 83,0                                 | 8,9  |
| AD-192287    | 66,1                                | 1,2  | 81,1                                 | 7,5  | 59,3                                | 6,3  | 80,9                                 | 7,5  |
| AD-192281    | 28,1                                | 8,0  | 79,6                                 | 11,3 | 23,2                                | 5,2  | 78,9                                 | 4,6  |
| AD-192288    | 73,1                                | 0,2  | 95,4                                 | 14,5 | 62,5                                | 7,6  | 104,4                                | 13,3 |

Từ viết tắt: SD=độ lệch chuẩn

<sup>a</sup> Tỷ lệ biểu hiện HBV tương đối còn lại (so với tế bào được chuyển nhiễm đối chứng)

24 giờ sau khi chuyển nhiễm của quá trình sàng lọc tập hợp tác nhân dsARN HBV.

Dựa vào các nghiên cứu trên đây, AD-81890 chuỗi kép được chọn để phân tích thêm.

#### Ví dụ 5

Đánh giá tác dụng dược lý của AD-81890 trong mô hình chuột HBV liên hợp adeno sau khi tiêm dưới da một lần

Tác dụng dược lý của AD-81890 được thử nghiệm trong mô hình chuột HBV liên hợp adeno (HBV-AAV). AAV8-HBV (SignaGen Laboratories) được pha loãng trong  $1 \times \text{PBS}$  đến nồng độ cuối cùng là  $2 \times 10^{12} \text{ GC/mL}$ . Chuột đực C57BL/6 6-8 tuần tuổi được tiêm trong tĩnh mạch *qua* tĩnh mạch đuôi bên với  $2 \times 10^{11} \text{ Gc/chuột}$  trong thể tích cố định là  $100 \mu\text{L}$ .

AD-81890 được pha loãng với  $1 \times \text{PBS}$  vô khuẩn và được sử dụng với thể tích thay đổi chứa  $10 \mu\text{L/g}$ . Động vật nhận được một liều SC duy nhất của AD-81890 ở 0,3,

1, hoặc 3 mg/kg, và máu được lấy vào ngày 24, 2, 0, 14, 21, 33, 47, 59, và 74 sau khi sử dụng liều *qua* xoang sau ổ mắt như được mô tả trong Bảng 5.

**Bảng 5. Thiết kế nghiên cứu AAV-HBV liều đơn của AD-81890**

| Nhóm | Hợp chất | Liều vào ngày 0 (mg/kg) | Số lượng động vật | Thời điểm lấy huyết thanh             |
|------|----------|-------------------------|-------------------|---------------------------------------|
| 1    | PBS      | 0                       | 9                 | ngày 24, 2, 0, 14, 21, 33, 47, 59, 74 |
| 2    | AD-81890 | 0,3                     | 9 <sup>a</sup>    |                                       |
| 3    |          | 1                       | 9                 |                                       |
| 4    |          | 3                       | 9                 |                                       |

Từ viết tắt: No.=số; PBS=nước muối đệm phosphat

<sup>a</sup> n=8 động vật vào ngày 47; n=6 vào ngày 59; n=5 vào ngày 72, các động vật bị gây chết không đau do vết thương nhiễm trùng

Sau khi lấy, máu được để đông trong 30 phút và sau đó được quay trong máy vi ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 13.000 vòng/phút và 4°C. Huyết thanh được hút ra và được bảo quản ở -20°C.

Các mức protein kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B được đánh giá bằng ELISA (BioTang, Waltham, MA). Protein HBsAg US Biologics (Memphis, TN) được sử dụng để tạo ra đường cong chuẩn. Các mẫu huyết thanh được pha loãng ở 1× PBS (Gibco, Gaithersburg, MD) ở 1:2000 hoặc 1:500 và được đánh giá bằng cách sử dụng quy trình ELISA với các biến đổi nhỏ. Nói ngắn gọn, 50 µL/giếng huyết thanh pha loãng hoặc chất chuẩn được nạp vào đĩa và được ủ trong 1 h ở 37°C. Sau khi ủ, 50 µL/giếng thể liên hợp enzyme được bổ sung vào mỗi giếng, và đĩa này được ủ ở 37°C trong 30 phút. Đĩa này được rửa với 3 lần 300 µL/giếng 1× đệm rửa, sau đó được thấm tách đến khi tất cả chất lỏng được loại bỏ khỏi giếng, 100 µL/giếng cơ chất được bổ sung vào, và các đĩa được ủ ở 37°C trong 30 phút. Cuối cùng, 100 µL/giếng dung dịch dừng được bổ sung vào và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 450 nm. Trong trường hợp bất kỳ trong đó mức nồng độ HBsAg tính được hạ xuống dưới giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của thử nghiệm, các trị số được ghi lại là LLOQ (*nghĩa là*, 313 ng/mL).

Nồng độ HBsAg huyết thanh trung bình ± SD ở chuột HBV-AAV sau liều dưới da (SC) duy nhất của AD-81890 được thể hiện trong Fig.2A. Các mức HBsAg huyết thanh trung bình ± SD ở chuột HBV-AAV so với đường cơ sở được thể hiện trong Fig.2B. Một lần tiêm SC duy nhất của AD-81890 ở 0,3, 1, hoặc 3 mg/kg gây ra sự giảm hiệu quả và kéo dài của nồng độ HBsAg huyết thanh ở chuột HBV-AAV, với sự giảm

tối đa là 92% quan sát được vào ngày 7 ở nhóm liều AD-81890 cao nhất (3mg/kg). Mức giảm tối đa được duy trì trong nhóm liều cao nhất qua ngày 33 sau đó các mức HBsAg bắt đầu quay về đường cơ sở (Fig.2B). Mức giảm trung bình của nồng độ HBsAg huyết thanh được quan sát thấy trong các nhóm liều 0,3mg/kg và 1mg/kg AD081890 với tác dụng giảm tối đa vào ngày 7 lần lượt là 23% và 72%. Các mức HBsAg ở cả hai nhóm liều 0,3mg/kg và 1mg/kg AD-81890 đều quay về mức đường cơ sở trước khi hoàn thành nghiên cứu (ngày 74).

#### Ví dụ 6

Đánh giá tác dụng dược lý của AD-81890 trong mô hình chuột HBV liên hợp adeno sau nhiều lần tiêm dưới da

Tác dụng dược lý của AD-81890 được thử nghiệm trong mô hình chuột HBV liên hợp adeno (HBV-AAV). AAV8-HBV (SignaGen Laboratories) được pha loãng trong  $1 \times \text{PBS}$  đến nồng độ cuối cùng là  $2 \times 10^{12} \text{ GC/mL}$ . Chuột đực C57BL/6 6-8 tuần tuổi được tiêm trong tĩnh mạch *qua* tĩnh mạch đuôi bên với  $2 \times 10^{11} \text{ Gc/chuột}$  trong thể tích cố định là  $100 \mu\text{L}$ .

Mỗi AD-66810 và AD-81890 được pha loãng với  $1\text{X DPBS}$  vô khuẩn và được sử dụng với thể tích thay đổi của  $10 \mu\text{L/g}$ . Các động vật nhận được AD-66810 ở  $1 \text{ mg/kg}$  Q2Wx6 đã cho, hoặc một liều duy nhất của AD-81890 ở  $9 \text{ mg/kg}$ , hoặc nhiều liều của AD-81890 ở  $1$  hoặc  $3 \text{ mg/kg}$  Q2Wx6 hoặc Qmx3 đã cho. Huyết thanh được lấy từ các động vật ở nhiều thời điểm như được mô tả trong bảng 6. Máu được lấy qua xoang sau ổ mắt như được mô tả trong Bảng 6.

**Bảng 6. Thiết kế nghiên cứu AAV-HBV nhiều liều của AD-81890**

| Nhóm | Hợp chất | Liều vào ngày 0 (mg/kg) | Phác đồ | N= | Số lần lấy huyết thanh                                   |
|------|----------|-------------------------|---------|----|----------------------------------------------------------|
| 1    | PBS      | 0                       | Q2Wx6   | 6  | Ngày 55, 27, 13, 0, 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98, 111, 126 |
| 2    | AD-66810 | 1                       | Q2Wx6   | 6  |                                                          |
| 3    | AD-81890 | 1                       | Q2Wx6   | 6  |                                                          |
| 4    |          |                         | QMx3    | 6  |                                                          |
| 5    |          | 3                       | Q2Wx6   | 6  |                                                          |
| 6    |          |                         | QMx3    | 6  |                                                          |
| 7    |          | 9                       | QMx1    | 6  |                                                          |

Các mẫu máu được xử lý và các thử nghiệm ELISA được thực hiện như được mô tả trong ví dụ trước. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây. Các kết quả với độ lệch chuẩn được thể hiện trong Fig.3.

Bảng 7. Các kết quả AAV-HBV nhiều liều của AD-81890 được biểu diễn bằng số lần log thay đổi trung bình

|          |       |       |         | Ngày  |       |       |      |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tác nhân | dsARN | mg/kg | Phác đồ | 55    | 27    | 13    | 0    | 14    | 28    | 42    | 56    | 70    | 84    | 98    | 111   | 125   | 140   |
| PBS      |       | -     | Q2Wx6   | -0,04 | -0,09 | -0,05 | 0,00 | 0,06  | -0,01 | -0,11 | -0,03 | 0,03  | 0,00  | -0,03 | -0,01 | 0,04  | 0,00  |
| AD-66810 |       | 1     | Q2Wx6   | 0,02  | -0,05 | 0,00  | 0,00 | -0,74 | -0,77 | -1,41 | -1,84 | -1,91 | -2,12 | -1,78 | -1,29 | -0,97 | -0,81 |
| AD-81890 |       | 1     | Q2Wx6   | 0,02  | -0,04 | 0,06  | 0,00 | -0,59 | -0,76 | -0,89 | -1,02 | -1,13 | -1,23 | -0,95 | -0,95 | -0,39 | -0,13 |
|          |       | 1     | QMx3    | 0,06  | 0,01  | 0,06  | 0,00 | -0,51 | -0,32 | -0,73 | -0,51 | -0,79 | -0,63 | -0,45 | -0,20 | -0,11 | 0,09  |
|          |       | 3     | Q2Wx6   | 0,03  | -0,04 | 0,02  | 0,00 | -1,30 | -1,73 | -2,49 | -2,57 | -2,61 | -2,77 | -2,03 | -1,59 | -1,16 | -0,53 |
|          |       | 3     | QMx3    | -0,02 | 0,00  | 0,03  | 0,00 | -1,30 | -1,06 | -1,56 | -1,32 | -1,75 | -1,53 | -1,15 | -0,75 | -0,38 | -0,30 |
|          |       | 9     | QMx1    | 0,06  | -0,03 | 0,00  | 0,00 | -2,71 | -2,60 | -2,03 | -1,16 | -0,81 | -0,45 | -0,29 | -0,07 | -0,04 | -0,01 |

Mức HBsAg trong huyết thanh đáp ứng liều được quan sát trong mô hình chuột AAV8-HBV sau khi sử dụng AD-81890. Tác dụng làm giảm HBsAg tối đa khoảng 2,7 log 10 được quan sát thấy sau một liều 9mg/kg hoặc 3mg/kg q2w x 6 của AD-81890. Các động vật nhận được 3mg/kg q2w x 6 có sự giảm HBsAg kéo dài lớn hơn 2 log10 trong tổng số gần 8 tuần.

Các nghiên cứu *in vivo* này chứng minh là AD-81890 là hữu hiệu trong việc làm giảm HBsAg trong huyết thanh trong mô hình chuột HBV-AAV.

### Ví dụ 7

#### Phân tích ngoài đích đặc hiệu của ad-81890

Sự kết hợp phương pháp tin sinh học *in silico* và các phương pháp *in vitro* được sử dụng để đánh giá tác dụng ngoài đích tiềm năng của chuỗi đối nghĩa của AD-81890.

#### Tin sinh học

Tập hợp các tác nhân dsARN gắn đích gen ‘X’ của virus viêm gan B (HBV) typ phụ ayw (GenBank nucleotit ID U95551; NCBI GeneID: 7276; SEQ ID NO:49) được thiết kế bằng cách sử dụng bản gốc R và Python được đặt theo yêu cầu. Bộ gen HBV U95551 vòng có độ dài 3182 bazơ và vùng CDS gen ‘X’ được mã hóa trong bản ghi NCBI ở các vị trí 1376-1840. Chi tiết về thiết kế tác nhân dsARN và phương pháp sàng lọc được cung cấp trên đây và trong WO2016/077321.

#### Sàng lọc chuyển nhiễm các tác nhân dsARN liên hợp GalNAc để phát hiện ngoài đích trong các tế bào HepG2.2.15

Để đo tác dụng ức chế ngoài đích, đáp ứng của các sản phẩm phiên mã được biểu hiện nội sinh bởi qPCR được thử nghiệm trong dòng tế bào gan HepG2.2.15. Các tế bào được chuyển nhiễm trong đĩa 96 giếng (2 x 10<sup>4</sup> tế bào mỗi giếng) với AD-81890 ở khoảng nồng độ từ 50nM đến 5 fM sử dụng Lipofectamin RNAiMax (ThermoFisher). Sau 24 giờ, ARN được chiết từ tế bào bằng cách sử dụng kit chiết tách ARN toàn phần MagMAX™-96 (ThermoFisher); và cADN được tạo ra bằng cách sử dụng kit chuyển nhiễm ngược cADN dung lượng cao ABI (ThermoFisher). Các mẫu được thử nghiệm về tác dụng ức chế HBV mRNA và khả năng làm tắt gen ngoài đích. Để định lượng bằng qPCR, sự biểu hiện HBV được đánh giá bằng cách sử dụng hai thử nghiệm TaqMan thiết kế theo yêu cầu khác nhau, PORF-1 và SORF-2, các thử nghiệm này nhận biết các vùng khác nhau của sản phẩm phiên mã virus HBV.

Để đánh giá tác dụng làm tắt gen ngoài đích, các đoạn dò TaqMan đặc hiệu với mỗi khả năng ngoài đích (Bảng 8) được sử dụng để định lượng. qPCR được thực hiện với máy PCR thời gian thực LightCycler 480 (Roche).

**Bảng 8. Các trình tự ngoài đích tiềm năng của AD-81890**

| ID ngoài đích    | Điểm số ngoài đích | Vị trí bắt cặp nhằm <sup>a</sup> | Truy cập <sup>b</sup> | Gen đích |
|------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------------|----------|
| AD-81890 (Off-1) | 3                  | 19, 16, 13                       | NM_001040455.1        | SIDT2    |
| AD-81890 (Off-2) | 3,4                | 14,11,10                         | NM_020861.1           | ZBTB2    |

<sup>a</sup> Vị trí bắt cặp nhằm được xác định đối với chuỗi đối nghĩa theo hướng 5'-3', do đó, vị trí 1 tương ứng với bazơ bổ sung với nucleotit ngoài cùng 5' của chuỗi đối nghĩa của AD-81890

<sup>b</sup> Trong trường hợp mà nhiều RefSeq ID được đi kèm theo cùng một gen đích và hồ sơ ngoài đích, cả hai ID đều được liệt kê.

Để xác định mức độ ức chế gen trên đích (HBV) và ngoài đích tiềm tàng, các mức ARN tương đối được xác định bằng cách chuẩn hóa đến sự biểu hiện ARN GAPDH người từ cùng một mẫu. Các kết quả được so sánh với các đối chứng tác nhân dsARN không đặc hiệu đã chuyển nhiễm và lỗi được thể hiện bằng độ lệch chuẩn. IC50 của AD-81890 là 0,803 nM kháng đích là sản phẩm phiên mã PORF1 và 0,766 nM kháng đích là sản phẩm phiên mã SORF2. Không có tác dụng bất hoạt đích đáng kể nào được quan sát thấy đối với sản phẩm phiên mã SIDT2 và ZBTB2 ngay cả ở nồng độ cao nhất của AD-81890.

Mức độ ức chế ngoài đích bởi AD-81890 được đánh giá trong các lần sàng lọc đáp ứng liều đối với 2 khả năng ngoài đích từ các sản phẩm phiên mã được biểu hiện nội sinh trong HepG2.2.15. AD-81890 không ức chế sự biểu hiện đối với SIDT2 hoặc ZBTB2 ở bất kỳ trong số các liều được thử nghiệm, trong khi tác dụng ức chế HBV là đáp ứng liều. Việc so khớp số liệu đáp ứng liều sử dụng mô hình khớp bốn tham số (XLfit) tạo ra IC50 là 803 pM và 766 pM lần lượt đối với PORF-1 hoặc SORF-2.

#### Ví dụ 8

Phân tích in vitro về tính đặc hiệu AD-81890 sử dụng RNA-SEQ trong tế bào HEPG2.2.15

Tác động của biến đổi hóa học tác nhân dsARN bằng cách so sánh AD-66810 và AD-81890 trong dòng tế bào HepG2.2.15 biểu hiện HBV được đo bằng cách sử dụng các thay đổi rộng của hệ phiên mã về mức biểu hiện với RNA-Seq. Các phân tử AD-

66810 và AD-81890 có cùng trình tự nucleotit nhưng khác nhau bởi sự thay thế một axit glycol nucleic (GNA) ở vị trí 6 từ đầu 5' của phân tử của chuỗi đối nghĩa (xem Bảng 2).

Các tế bào HepG2.2.15, dòng tế bào thu được từ HepG2 được chuyển nhiễm ổn định với HBV bộ gen đầy đủ, được pha loãng với môi trường nuôi cấy đến nồng độ cuối cùng là 187.500 tế bào/mL, và 80  $\mu$ L được hút bằng pipet vào các đĩa 96 giếng được phủ collagen (BD Biocoat, Cat#356407) để tạo ra nồng độ cuối cùng là 15.000 tế bào/giếng.

Các dung dịch gốc tác nhân dsARN được pha loãng trong 1X DPBS đến các nồng độ sau đây: 1.000 nM hoặc 100 nM. RNAiMAX (ThermoFisher, Cat#13778150) được pha loãng với Opti-MEM (ThermoFisher Cat#31985062) ở nồng độ là 0,3  $\mu$ L RNAiMAX/10  $\mu$ L Opti-MEM và được ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi ủ, 10  $\mu$ L/giếng được bổ sung vào mỗi giếng của các đĩa 96 giếng được phủ collagen (BD Biocoat, Cat#356407), cùng với 10  $\mu$ L/giếng dịch pha loãng của tác nhân dsARN thích hợp, trộn nhẹ nhàng và ủ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. 80  $\mu$ L huyền phù tế bào đã điều chế được bổ sung vào mỗi giếng để tạo ra mật độ tế bào cuối cùng là 15.000 tế bào/giếng và các nồng độ tác nhân dsARN cuối cùng là 100 nM và 10 nM. Các tế bào được ủ trong máy ủ 37°C với 5% CO<sub>2</sub> trong 16-22 giờ. Các tế bào được đưa vào đĩa sao cho mỗi điều kiện thử nghiệm có 16 giếng và thử nghiệm được thực hiện hai lần.

Kit chiết tách ARN toàn phần ThermoFisher RNAqueous-96 được sử dụng để chiết tách ARN theo quy trình. Nói ngắn gọn, sau 16-22 giờ, dịch nổi được hút từ mỗi giếng, 100  $\mu$ L/giếng 1X DPBS được bổ sung vào để rửa trôi môi trường còn lại, sau đó được hút ra. 200  $\mu$ L dung dịch dung giải/liên kết được bổ sung vào mỗi giếng trong hàng 1 và hàng 5 của mỗi đĩa, được chuyển bằng pipet lên và xuống vài lần, và được chuyển vào hàng tiếp theo sao cho 4 giếng/điều kiện được gộp lại để đảm bảo thu hồi đủ ARN. Bước này tạo ra bốn bản sao cho mỗi điều kiện. 100  $\mu$ L etanol 100% được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa nuôi cấy chứa dịch dung giải, trộn vài lần và chuyển vào các giếng của đĩa lọc. Qua một loạt bước ly tâm (1.900xg, 1 phút) các mẫu được rửa bằng dung dịch rửa đã cung cấp, được xử lý bằng chất phản ứng DNaza, và được rửa giải trong 100  $\mu$ L nước không chứa nucleaza. Nồng độ ARN được xác định với máy đo quang phổ NanoDrop 8000 (ThermoFisher).

ARN được xử lý thêm bằng TURBO DNaza (Ambion). Mỗi mẫu ARN ( $\leq 10$   $\mu$ g ARN/mẫu) được trộn với 2  $\mu$ L DNaza, 10  $\mu$ L 10X đệm, và nước không chứa nucleaza

đến tổng thể tích là 100  $\mu$ L, sau đó ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau khi xử lý bằng DNaza, ARN được tinh chế thêm bằng kit RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen) theo quy trình. ARN được pha loãng trong 30  $\mu$ L nước không chứa nucleaza, và nồng độ ARN được xác định với máy đo quang phổ NanoDrop 8000. ARN được bảo quản ở -80°C. ARN này được sử dụng tiếp cho việc tạo ra thư viện cADN với kit tạo thư viện ARN toàn phần TruSeq Stranded Total RNA Library Prep (Illumina) và được giải trình tự trên máy giải trình tự dạng máy tính để bàn NextSeq500 (Illumina), tất cả đều theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hai lần lặp lại thử nghiệm được thực hiện.

Các tế bào HepG2.2.15 được chuyển nhiễm bốn lần bằng 10 hoặc 100 nM AD-66810 hoặc AD-81890 và được nuôi cấy cùng với đối chứng chưa được xử lý trong 24 giờ. ARN đã chiết với kit Purelink RNA (ThermoFisher) được sử dụng để tạo thư viện cADN với kit tạo thư viện ARN toàn phần TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit với Ribo-Zero người/chuột nhất/chuột cống để làm tiêu rARN (Illumina) và giải trình tự trên máy giải trình tự dạng máy tính để bàn NextSeq500 (Illumina), tất cả đều theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Toàn bộ 40 mẫu được gom lại cho mỗi tế bào dòng NextSeq 500/550 High Output v2 (75 chu kỳ) (Illumina). Hai lần lặp lại thử nghiệm được thực hiện.

Kết quả đọc RNA-Seq thô được lọc với điểm số chất lượng trung bình nhỏ nhất là 25 và độ dài còn lại tối thiểu là 36, sử dụng fastq-mcf. Các kết quả đọc đã lọc được căn chỉnh đồng thời với bộ gen người (hg19/GRCh37) và HBV (GenBank nucleotit ID U95551; NCBI GeneID: 7276) sử dụng STAR (phiên bản 2.4.2a). Do cấu trúc vòng của bộ gen HBV, 46 cặp bazơ được lặp lại ở cuối cùng của phiên bản được làm cho thẳng hàng của trình tự HBV để cho phép các kết quả đọc lập bản đồ ở điểm gãy. Các kết quả đọc đã căn chỉnh đơn nhất lập bản đồ đến các exon được đếm bằng featureCounts (phiên bản 1.5.0). Tất cả các mẫu đều có >5M kết quả đọc đã lập bản đồ. Phân tích sự biểu hiện gen khác biệt được thực hiện ở R (phiên bản 3.4.1) bằng cách sử dụng gói DESeq2 (phiên bản 1.16.1). Việc hiệu chỉnh nhiều thử nghiệm để thu được các giá trị p đã điều chỉnh được thực hiện bằng DESeq2 sử dụng phương pháp Benjamini & Hochberg, 1995.

Các biểu đồ MA được sử dụng để quan sát cả sự bất hoạt HBV tại đích và các tác dụng ngoài đích. Phân tích về hóa học GNA trong việc làm giảm các tác dụng ngoài đích nói chung được giới hạn ở các gen bị điều hòa giảm ( $\log_2$  số lần thay đổi < 0). Các gen được điều hòa tăng ( $\log_2$  số lần thay đổi > 0) được xem là tác dụng thứ cấp. Việc

đánh giá tác dụng ngoài đích được giới hạn ở liều thấp nhất (10 nM) do đạt được sự bất hoạt HBV gần như tối đa. Để so sánh độ nhiều của tập hợp các sản phẩm phiên mã, các gen được điều hòa giảm đáng kể (giá trị p được điều chỉnh  $< 0,05$ ) được xác định trong AD-66810 và/hoặc AD-81890. Mức độ điều hòa giảm được quan sát bằng biểu đồ hộp của  $\log_2$  số lần thay đổi (Fig.4), với các khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa AD-66810 và AD-81890 được đánh giá bằng cách sử dụng kiểm thử test-t hai mẫu, hai bên của Welch (Bảng 9).

**Bảng 9. Thử nghiệm thống kê về các gen được điều hòa giảm đáng kể**

| exp | Liều  | AD-66810.IFC trung bình | AD-81890.IFC trung bình | t.thống kê | Giá trị p | d.o.f. | N   |
|-----|-------|-------------------------|-------------------------|------------|-----------|--------|-----|
| 1   | 10nM  | -0,353                  | -0,171                  | -16,1      | 3,14E-52  | 1003   | 523 |
| 1   | 100nM | -0,350                  | -0,102                  | -25,6      | 7,35E-123 | 1743   | 908 |
| 2   | 10nM  | -0,334                  | -0,154                  | -13,4      | 5,28E-37  | 757    | 391 |
| 2   | 100nM | -0,314                  | -0,179                  | -13,1      | 1,35E-37  | 1693   | 858 |

exp: thử nghiệm lặp lại; AD-66810.IFC trung bình:  $\log_2$  số lần thay đổi trung bình của các gen được điều hòa giảm đáng kể ở AD-66810 và/hoặc AD-81890; AD-81890.IFC trung bình:  $\log_2$  số lần thay đổi của các gen được điều hòa giảm đáng kể trong AD-81890 và/hoặc AD-66810; t.thống kê: t-thống kê từ kiểm thử t hai mẫu, hai bên của Welch; trị số p.: trị số p từ kiểm thử t hai mẫu, hai bên của Welch; d.o.f.: mức độ tự do; N: Số lượng gen bị điều hòa giảm đáng kể ( $p < 0,05$ ) trong AD-66810 và/hoặc AD-81890

Sự giảm hằng định tác dụng ngoài đích với AD-81890 so với AD-66810 được quan sát thấy qua cả hai lần lặp lại thử nghiệm (Fig.4, Bảng 9). Ở 10nM, AD-81890 thể hiện sự giảm 52% (lặp lại lần 1) hoặc sự giảm 54% (lặp lại lần 2) về  $\log_2$  số lần thay đổi trung bình của các gen được điều hòa giảm đáng kể so với AD-66810 (Bảng 9). Ở 100nM, AD-81890 thể hiện sự giảm 71% (lặp lại lần 1) hoặc sự giảm 43% (lặp lại lần 2) về  $\log_2$  số lần thay đổi trung bình so với AD-66810 (Bảng 9). Trong tất cả các trường hợp, sự giảm quan sát được về  $\log_2$  số lần thay đổi có ý nghĩa thống kê cao. Do đó, AD-81890 có các mức nhiều tập hợp sản phẩm phiên mã ARN thấp hơn đáng kể.

## Ví dụ 9

Đánh giá tác dụng gây độc tế bào gan đặc hiệu người ở PXB-chuột nhắt

Chuột nhắt PXB là chuột khảm với gan được làm tương thích với người mà được phục hồi quần thể cao bởi tế bào gan của người (PhoenixBio). Chuột nhắt là chuột có chất hoạt hóa plasminogen kiểu urokinaza (uPA)/khiếm khuyết miễn dịch kết hợp nghiêm trọng (SCID) được cấy tế bào gan người (chuột uPA gan được làm tương thích với người/SCID) (Mercer *et al.*, Nat. Med. 7:927-933, 2001). Chuột uPA gan được làm tương thích với người/SCID đã báo cáo có chỉ số thay thế (RI), tỷ lệ phần trăm tế bào gan người trong gan, là hơn 70%. Chuột này có thể được sử dụng làm mô hình dự đoán sự chuyển hóa thuốc ở người, được động học và tác dụng gây độc tế bào gan người (Naritomi *et al.*, Drug Metab Pharmacokinet. 33:31-39, 2018).

Nghiên cứu được thực hiện ở chuột PBX để so sánh tác dụng gây độc tế bào gan của AD-66810 và AD-81890. Chuột được sử dụng liều vào ngày 0, 21, 28, 35, và 42 với 12, 36, hoặc 100 mg/kg AD-66810, AD-81890, hoặc PBS (đối chứng) bằng cách tiêm dưới da (n=4 mỗi nhóm). Các quan sát điều kiện chung và phép đo thể trọng được thực hiện hai lần mỗi tuần qua ngày thứ 49. Máu được lấy bằng cách làm chảy máu sau hốc mắt hai lần mỗi tuần và huyết thanh được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Việc lấy máu được kết thúc, và các động vật bị gây chết không đau bằng cách chọc tim và gây mất máu. Việc khám nghiệm tử thi được thực hiện sau khi gây chết bằng cách làm mất máu. Gan được lấy và cân. Gan được chia để bảo quản trong dung dịch ARNlater (Ambion), trong formalin trước khi gắn nền parafin, và làm đông lạnh nhanh.

Tất cả các động vật duy trì thể trọng lớn hơn 80% so với mức ban đầu trong toàn bộ thời gian nghiên cứu. Ngoài ra, các giá trị trung bình số học thấp nhất về thể trọng trong nhóm được điều trị bằng hợp chất là cao hơn nhóm được điều trị bằng đối chứng PBS.

Các mức albumin huyết thanh người trong máu được theo dõi trong toàn bộ nghiên cứu. Tất cả động vật sống sót đều duy trì nồng độ h-Alb trong máu cao hơn 7,0 mg/ml trong pha sống của nghiên cứu.

Các enzym gan được theo dõi trong toàn bộ nghiên cứu. Cụ thể là ALT, AST, ALP, GGT, TBIL, và TG được theo dõi trong toàn bộ nghiên cứu. Các mức enzym đo

được ở ngày 49 cho chuột nhận AD-66810, AD-81890, hoặc PBS được thể hiện trong Bảng 10 dưới đây. Fig.5A và 5B thể hiện các mức ALT theo thời gian sau khi sử dụng AD-66810 (Fig.5A) hoặc AD-81890 (Fig.5B), so với việc sử dụng PBS.

Bảng 10. Các mức enzym gan.

| Nhóm | Tác nhân dsARN | Liều (mg/kg) | ALT (U/L) | AST (U/L) | ALP (U/L) | GTT (U/L) | TBIL (U/L) | TG (U/L) |
|------|----------------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|----------|
| 1    | AD-66810       | 12           | 391       | 261       | 407       | 17        | 0,3        | 102      |
| 2    | AD-66810       | 36           | 505       | 293       | 398       | 22        | 0,2        | 85       |
| 3    | AD-66810       | 100          | 611       | 338       | 392       | 26        | 0,3        | 83       |
| 4    | AD-81890       | 12           | 293       | 210       | 375       | 13        | 0,3        | 95       |
| 5    | AD-81890       | 36           | 267       | 198       | 376       | 11        | 0,3        | 112      |
| 6    | AD-81890       | 100          | 330       | 237       | 410       | 14        | 0,2        | 103      |
| 7    | PBS            | 0            | 139       | 146       | 329       | 10        | 0,2        | 110      |

Đối với cả hai nhóm được điều trị bằng hợp chất thử nghiệm, ALT, AST, ALP, và GGT thể hiện sự tăng so với nhóm đối chứng. Ngoài ra, thay đổi phụ thuộc liều được chứng minh ở ALT, AST, và GGT trong nhóm được điều trị bằng AD-66810.

Khi khám nghiệm tử thi, không có phát hiện đặc hiệu hợp chất thử nghiệm nào trong cả hai nhóm. So với nhóm đối chứng, không có thay đổi rõ ràng về khối lượng gan tương đối (gan/thể trọng) ở động vật trong nhóm điều trị bằng hợp chất.

#### Các phương án tương đương

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ công nhận, hoặc có thể chứng minh bằng cách sử dụng không nhiều hơn thử nghiệm thông thường, nhiều phương án tương đương với các phương án và phương pháp cụ thể được mô tả ở đây. Các phương án tương đương này được dự định nằm trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ sau đây.

Mặc dù các phương án cụ thể đã được minh họa và mô tả, sẽ dễ dàng hiểu rõ là nhiều phương án khác nhau được mô tả trên đây có thể được kết hợp để tạo ra các phương án khác nữa và nhiều thay đổi khác nhau có thể được tạo ra mà không vượt ra ngoài bản chất và phạm vi sáng chế.

Tất cả các hình vẽ, patent Mỹ, công bố đơn Mỹ, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ, patent cấp ở nước ngoài, đơn sáng chế nộp ở nước ngoài và các công bố không phải patent được đề cập trong phần mô tả và được liệt kê trong Tờ dữ liệu đơn, bao gồm đơn tạm thời Mỹ số 62/718.314 nộp ngày 13 tháng 8, 2018, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ, trừ khi có quy định khác. Các khía cạnh của các phương án này có

thể được thay đổi, nếu cần sử dụng ý tưởng khác của các patent, đơn và công bố khác nhau để tạo ra các phương án khác nữa.

Các thay đổi này và các thay đổi khác có thể được tạo ra cho các phương án này nhờ phần mô tả chi tiết trên đây. Nói chung, trong phần yêu cầu bảo hộ sau đây, thuật ngữ được sử dụng không nên được hiểu là làm giới hạn yêu cầu bảo hộ vào các phương án cụ thể được mô tả trong phần mô tả và yêu cầu bảo hộ, nhưng nên được hiểu là bao gồm tất cả các phương án có thể cùng với phạm vi đầy đủ của các phương án tương đương mà các điểm yêu cầu bảo hộ này xin bảo hộ. Do đó yêu cầu bảo hộ không bị giới hạn bởi bản mô tả.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tác nhân axit ribonucleic chuỗi kép (dsARN), chứa chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa tạo ra vùng chuỗi kép, trong đó chuỗi đối nghĩa chứa trình tự nucleotit biến đổi như được chỉ ra trong:

5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:16),

5'-usGfsuga(Agn)gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:18),

5'-usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:20),

5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:23),

5'-usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:24),

5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu-3' (SEQ ID NO:25), hoặc

5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:28),

trong đó a, c, g, và u lần lượt là 2'-O-metyladenosin-3'-phosphat, 2'-O-metylxytidin-3'-phosphat, 2'-O-metylguanosin-3'-phosphat và 2'-O-metyluridin-3'-phosphat;

Af, Cf, Gf, và Uf lần lượt là 2'-floadenosin-3'-phosphat, 2'-floxytidin-3'-phosphat, 2'-floguanosin-3'-phosphat và 2'-flouridin-3'-phosphat;

dA, dC, dG, và dT lần lượt là 2'-deoxyadenosin-3'-phosphat, 2'-deoxyxytidin-3'-phosphat, 2'-deoxyguanosin-3'-phosphat, và 2'-deoxythymidin-3'-phosphat;

(Agn) là adenosin-axit glycol nucleic (GNA); và

s là liên kết phosphorothioat.

2. Tác nhân dsARN theo điểm 1, trong đó chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit biến đổi 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29)

trong đó a, c, g, và u lần lượt là 2'-O-metyladenosin-3'-phosphat, 2'-O-metylxytidin-3'-phosphat, 2'-O-metylguanosin-3'-phosphat và 2'-O-metyluridin-3'-phosphat;

Af, Cf, Gf, và Uf lần lượt là 2'-floadenosin-3'-phosphat, 2'-floxytidin-3'-phosphat, 2'-floguanosin-3'-phosphat và 2'-flouridin-3'-phosphat; và

s là liên kết phosphorothioat.

3. Tác nhân dsARN theo điểm 1, trong đó chuỗi đối nghĩa và chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit biến đổi như được chỉ ra trong:

(a) 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:16) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(b) 5'-usGfsuga(Agn)gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:18) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(c) 5'-usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:20) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(d) 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:23) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(e) 5'-usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:24) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

(f) 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu-3' (SEQ ID NO:25) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29); hoặc

(g) 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:28) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca-3' (SEQ ID NO:29);

trong đó a, c, g, và u lần lượt là 2'-O-methyladenosin-3'-phosphat, 2'-O-methylxytidin-3'-phosphat, 2'-O-methylguanosin-3'-phosphat, và 2'-O-methyluridin-3'-phosphat;

Af, Cf, Gf, và Uf lần lượt là 2'-floadenosin-3'-phosphat, 2'-floxtydin-3'-phosphat, 2'-floguanosin-3'-phosphat và 2'-flouridin-3'-phosphat;

dA, dC, dG, và dT lần lượt là 2'-deoxyadenosin-3'-phosphat, 2'-deoxyxytidin-3'-phosphat, 2'-deoxyguanosin-3'-phosphat và 2'-deoxythymidin-3'-phosphat;

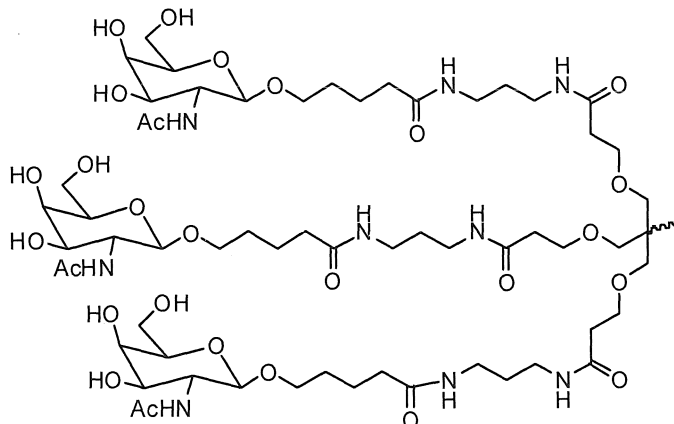
(Agn) là adenosin-axit glycol nucleic (GNA); và

s là liên kết phosphorothioat.

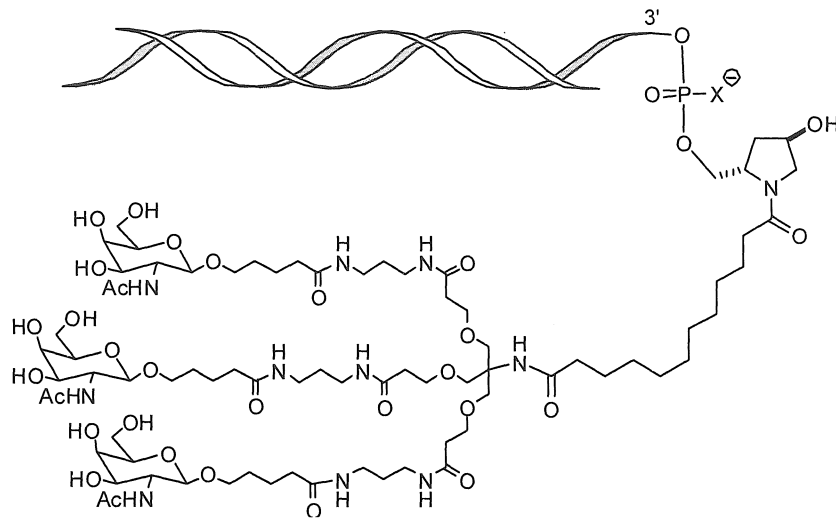
4. Tác nhân dsARN theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 3, trong đó ít nhất một chuỗi chứa phần nhô ra 3' chứa ít nhất là 1 nucleotit.

5. Tác nhân dsARN theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 3, trong đó ít nhất một chuỗi chứa phần nhô ra 3' chứa 2 nucleotit.

6. Tác nhân dsARN theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 5, trong đó vùng chuỗi kép dài 19-21 cặp nucleotit.
7. Tác nhân dsARN theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 6, trong đó mỗi chuỗi độc lập chứa 19-23 nucleotit.
8. Tác nhân dsARN theo điểm 7, trong đó mỗi chuỗi độc lập chứa 19-21 nucleotit.
9. Tác nhân dsARN theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 8, trong đó tác nhân này còn bao gồm phối tử.
10. Tác nhân dsARN theo điểm 9, trong đó phối tử này được liên hợp với đầu 3' của chuỗi có nghĩa của tác nhân dsARN.
11. Tác nhân dsARN theo điểm 9 hoặc 10, trong đó phối tử này là dẫn xuất N-axetylgalactosamin (GalNAc).
12. Tác nhân dsARN theo điểm 11, trong đó phối tử này là



13. Tác nhân dsARN theo điểm 12, trong đó tác nhân dsARN này được liên hợp với phối tử như được thể hiện trong sơ đồ dưới đây



trong đó X là O hoặc S.

14. Tác nhân dsARN theo điểm 13, trong đó X là O.

15. Tác nhân dsARN theo điểm 1, trong đó chuỗi đối nghĩa chứa trình tự nucleotit biến đổi như được chỉ ra trong:

5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:16),

5'-usGfsuga(Agn)gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:18),

5'-usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:20),

5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:23),

5'-usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:24),

5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu-3' (SEQ ID NO:25), hoặc

5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:28),

trong đó a, c, g, và u lần lượt là 2'-O-metyladenosin-3'-phosphat, 2'-O-metylxytidin-3'-phosphat, 2'-O-metylguanosin-3'-phosphat, và 2'-O-methyluridin-3'-phosphat;

Af, Cf, Gf, và Uf lần lượt là 2'-floadenosin-3'-phosphat, 2'-floxytidin-3'-phosphat, 2'-floguanosin-3'-phosphat, và 2'-flouridin-3'-phosphat;

dA, dC, dG, và dT lần lượt là 2'-deoxyadenosin-3'-phosphat, 2'-deoxyxytidin-3'-phosphat, 2'-deoxyguanosin-3'-phosphat, và 2'-deoxythymidin-3'-phosphat;

(Agn) là adenosin-axit glycol nucleic (GNA); và

s là liên kết phosphorothioat.

16. Tác nhân dsARN theo điểm 1, trong đó chuỗi đối nghĩa và chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit biến đổi như được chỉ ra trong:

(a) 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:16) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:10);

(b) 5'-usGfsuga(Agn)gcgaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:18) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:10);

(c) 5'-usGfsudGa(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:20) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:10);

(d) 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:23) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:10);

(e) 5'-usGfsuga(Agn)dGCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:24) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:10);

(f) 5'-usGfsudGadAgdCGfaaguGfcAfdCacsusu-3' (SEQ ID NO:25) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:10); hoặc

(g) 5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfdCAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:28) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:10);

trong đó a, c, g, và u lần lượt là 2'-O-metyladenosin-3'-phosphat, 2'-O-metylxytidin-3'-phosphat, 2'-O-metylguanosin-3'-phosphat, và 2'-O-metyluridin-3'-phosphat;

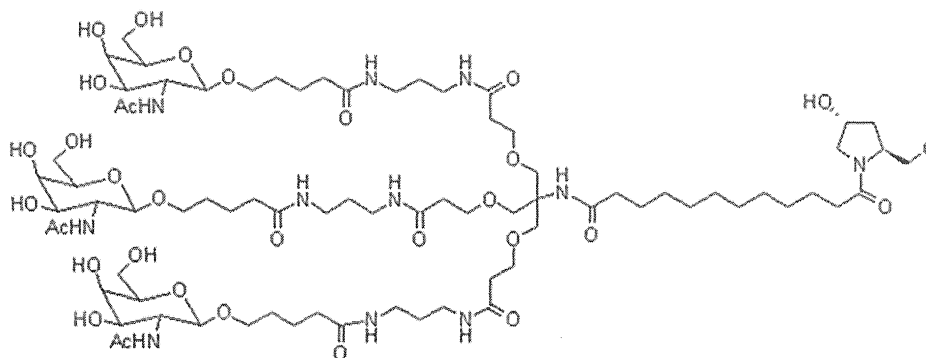
Af, Cf, Gf, và Uf lần lượt là 2'-floadenosin-3'-phosphat, 2'-floxtydin-3'-phosphat, 2'-floguanosin-3'-phosphat, và 2'-flouridin-3'-phosphat;

dA, dC, dG, và dT lần lượt là 2'-deoxyadenosin-3'-phosphat, 2'-deoxyxytidin-3'-phosphat, 2'-deoxyguanosin-3'-phosphat, và 2'-deoxythymidin-3'-phosphat;

(Agn) là adenosin-axit glycol nucleic (GNA);

s là liên kết phosphorothioat; và

L96 là



17. Tác nhân dsARN theo điểm 1, trong đó chuỗi đối nghĩa và chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit biến đổi như được chỉ ra trong:

5'-usGfsuga(Agn)gCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO:16) và 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO:10);

trong đó a, c, g, và u lần lượt là 2'-O-metyladenosin-3'-phosphat, 2'-O-metylxytidin-3'-phosphat, 2'-O-metylguanosi-3'-phosphat, và 2'-O-metyluridin-3'-phosphat;

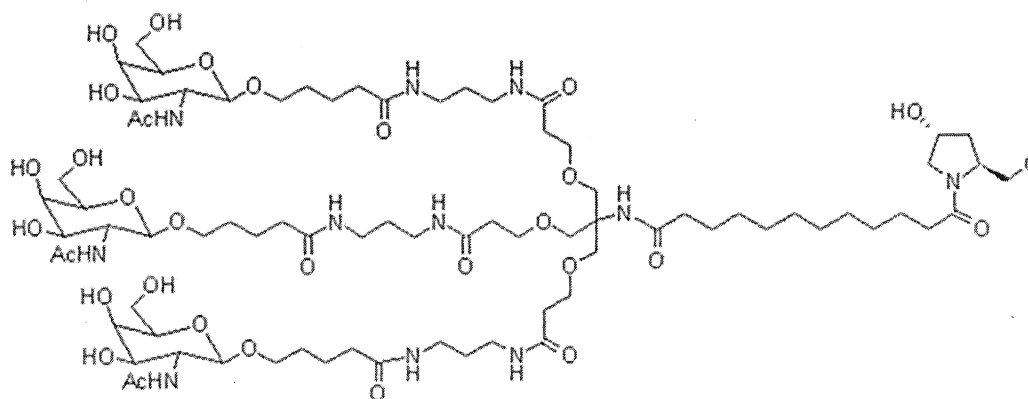
Af, Cf, Gf, và Uf lần lượt là 2'-floadenosin-3'-phosphat, 2'-floxtydin-3'-phosphat, 2'-floguanosi-3'-phosphat, và 2'-flouridin-3'-phosphat;

dA, dC, dG, và dT lần lượt là 2'-deoxyadenosin-3'-phosphat, 2'-deoxyxytidin-3'-phosphat, 2'-deoxyguanosi-3'-phosphat, và 2'-deoxythymidin-3'-phosphat;

(Agn) là adenosin-axit glycol nucleic (GNA);

s là liên kết phosphorothioat; và

L96 là



18. Tế bào chứa tác nhân dsARN theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 17.

19. Dược phẩm chứa tác nhân dsARN theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 17 và tá dược.

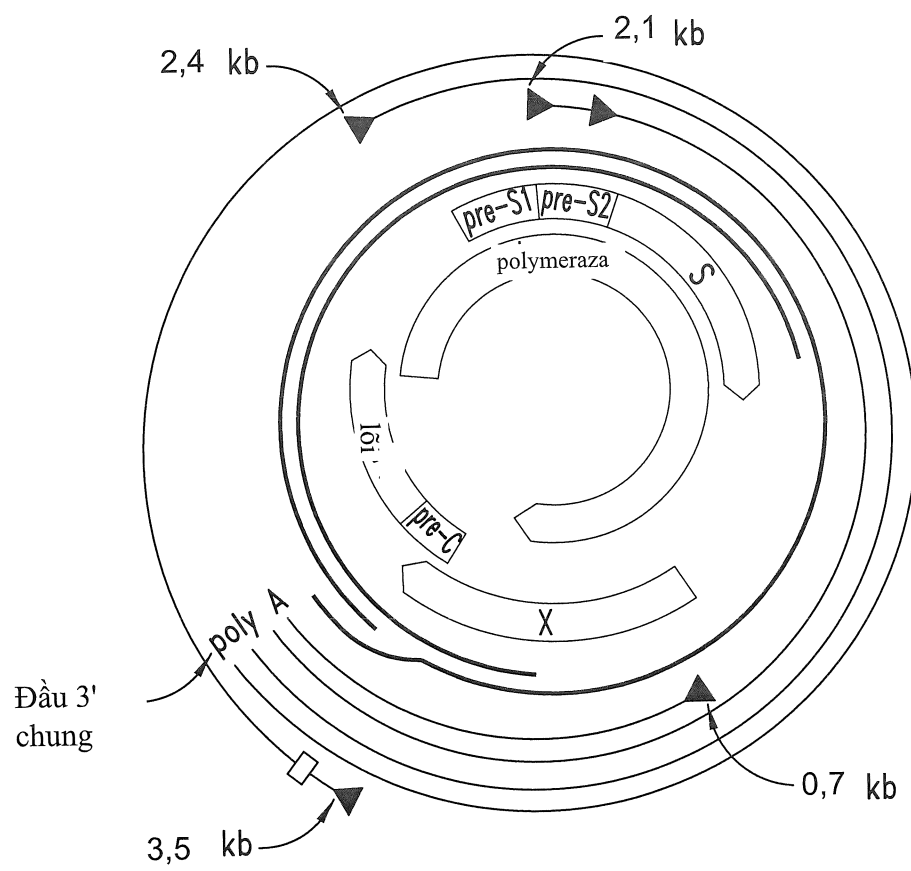
20. Phương pháp ức chế sự biểu hiện gen virus viêm gan B (HBV) trong tế bào in vitro, phương pháp này bao gồm bước cho tế bào tiếp xúc với tác nhân dsARN theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 17, nhờ đó ức chế sự biểu hiện của gen HBV trong tế bào.

21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó sự biểu hiện gen HBV bị ức chế ít nhất là 80%, 90%, 95%, hoặc 98%, hoặc đến thấp hơn mức phát hiện được của phương pháp thử nghiệm.

22. Phương pháp ức chế sự sao chép của virus viêm gan B (HBV) trong tế bào in vitro, phương pháp này bao gồm bước cho tế bào tiếp xúc với tác nhân dsARN theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 17, nhờ đó ức chế sự sao chép của HBV trong tế bào.

23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó sự sao chép của HBV trong tế bào bị ức chế ít nhất là 80%, 90%, 95%, hoặc 98%, hoặc đến thấp hơn mức phát hiện được của phương pháp thử nghiệm.

1/4

*FIG. 1*

2/4

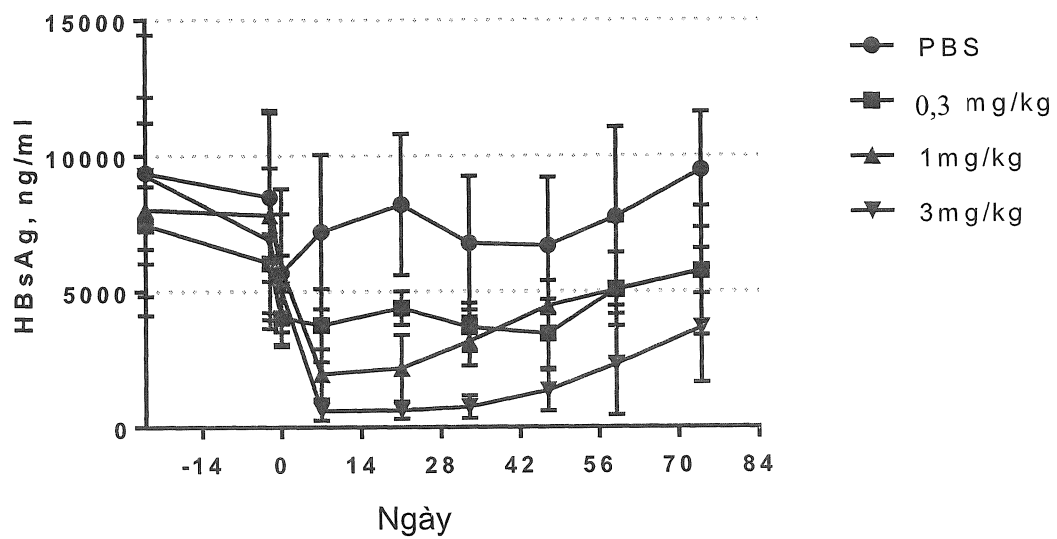


FIG. 2A

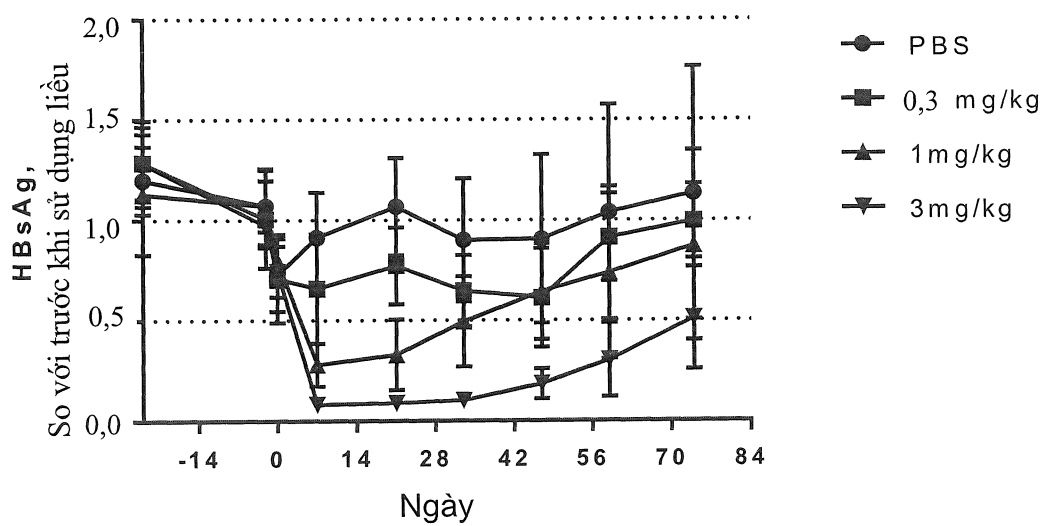


FIG. 2B

3/4

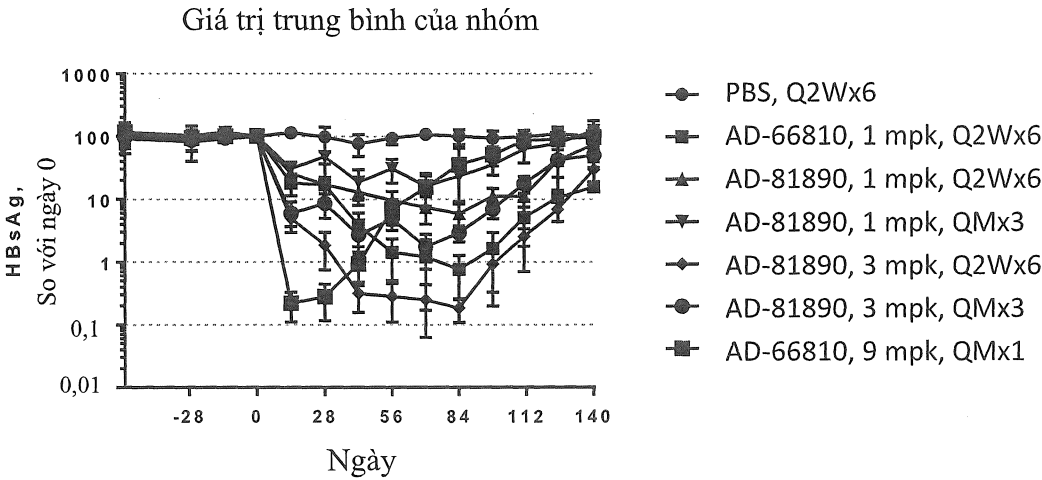


FIG. 3

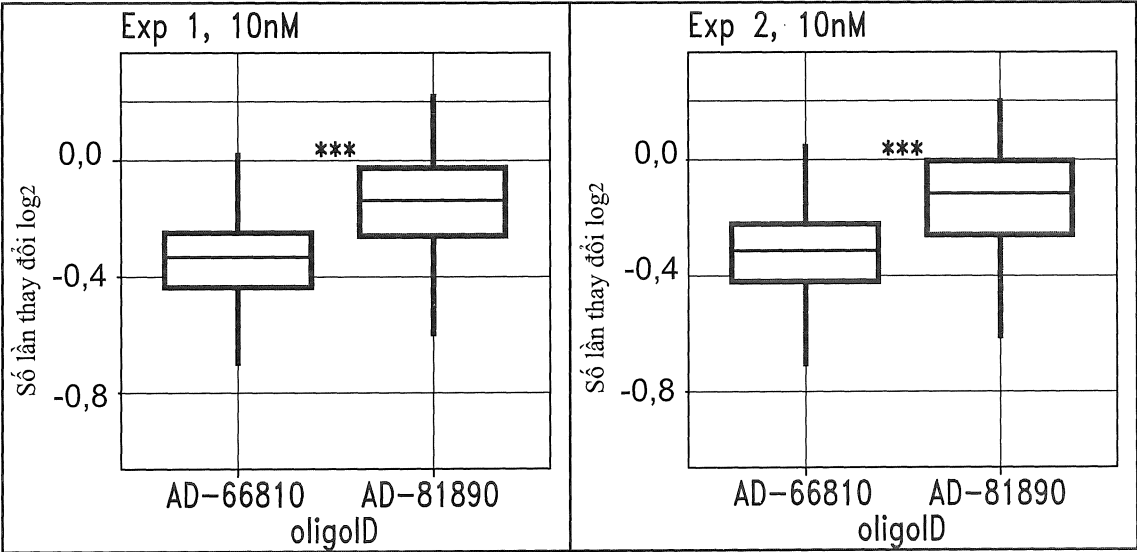


FIG. 4

4/4

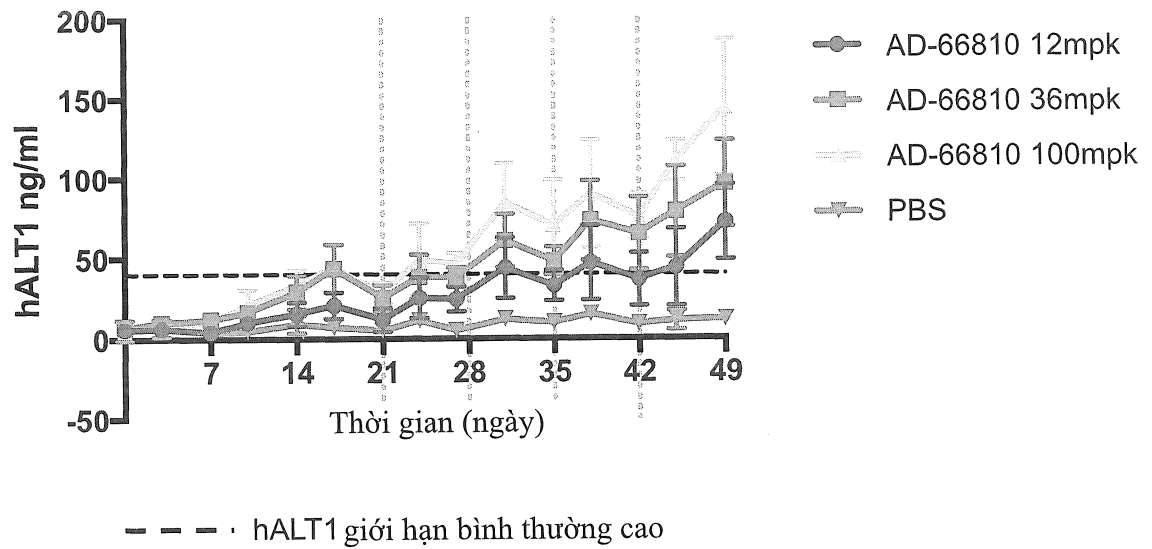


FIG. 5A

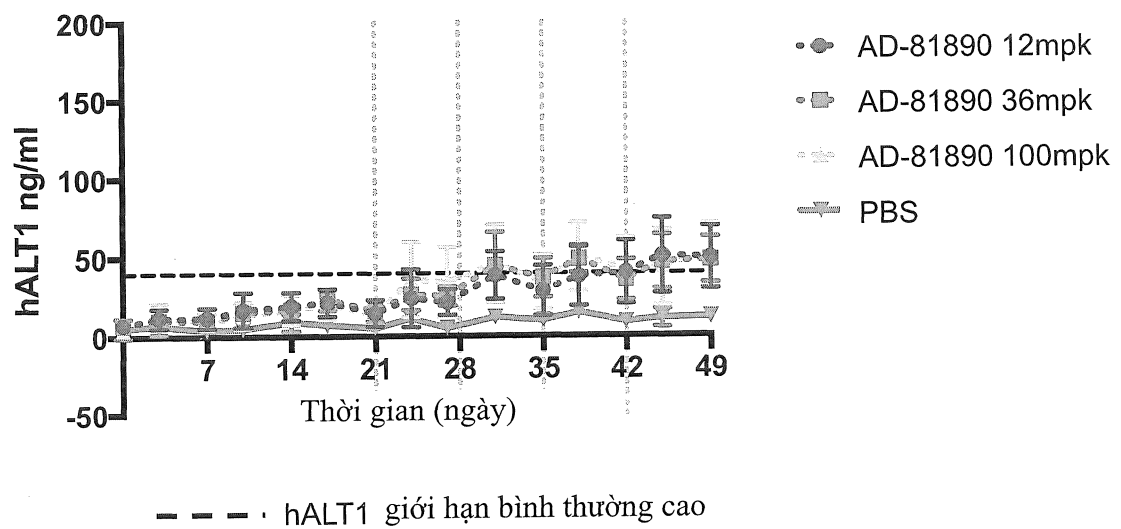


FIG. 5B

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Alnylam Pharmaceuticals, Inc.  
 Jadhav, Vasant R.  
 Maier, Martin A.  
 Milstein, Stuart  
 Schlegel, Mark K.

<120> TÁC NHÂN dsARN VIRUT VIÊM GAN B (HBV) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA TÁC NHÂN NÀY

<130> 930385.410WO

<140> PCT

<141> 12-08-2019

<150> US 62/718,314

<151> 13-08-2018

<160> 49

<170> FastSEQ cho Windows phiên bản 4.0

<210> 1

<211> 3215

<212> ADN

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> NC\_003977.1, bộ gen hoàn chỉnh, virut viêm gan B

<400> 1

|             |            |            |             |             |            |      |
|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| ctccacaaca  | ttccaccaag | ctctgctaga | tcccagagtg  | aggggcctat  | attttcctgc | 60   |
| tgggtggctcc | agttccggaa | cagtaaacc  | tggtccgact  | actgcctcac  | ccatatcgtc | 120  |
| aatcttctcg  | aggactgggg | accctgcacc | gaacatggag  | agcacaacat  | caggattcct | 180  |
| aggacccctg  | ctcgtgttac | aggcggggtt | tttcttggtg  | acaagaatcc  | tcacaatacc | 240  |
| acagagtcta  | gactcgtggt | ggacttctct | caattttcta  | gggggagcac  | ccacgtgtcc | 300  |
| tggccaaaat  | tcgcagtc   | caacctccaa | tcactcacca  | acctcttgct  | ctccaacttg | 360  |
| tcctggctat  | cgctggatgt | gtctgcggcg | ttttatcata  | ttcctcttca  | tcctgctgct | 420  |
| atgcctcatc  | ttcttggttg | ttcttctgga | ctaccaaggt  | atgttgcccg  | tttgtcctct | 480  |
| acttccagga  | acatcaacta | ccagcacggg | accatgcaga  | acctgcacga  | ttcctgctca | 540  |
| aggaacctct  | atgtttccct | cttggtgctg | tacaaaacct  | tcggacggaa  | actgcacttg | 600  |
| tattcccatc  | ccatcatcct | gggctttcgc | aagattccta  | tgggagtggg  | cctcagtccg | 660  |
| tttctcctgg  | ctcagtttac | tagtgccatt | tggtcagtgg  | ttcgtagggc  | tttccccac  | 720  |
| tgtttggtct  | tcagctatat | ggatgatgtg | gtattggggg  | ccaagtctgt  | acaacatctt | 780  |
| gagtcctttt  | ttacctctat | taccaatttt | cttttgtctt  | tgggtataca  | tttgaaccct | 840  |
| aataaaaacca | aacgttgggg | ctactccctt | aacttcatgg  | gatatgtaat  | tggaagtggg | 900  |
| ggtacttttac | cgcaggaaca | tattgtacaa | aaactcaagc  | aatgttttcg  | aaaattgcct | 960  |
| gtaaataagac | ctattgattg | gaaagtatgt | caaagaattg  | tgggtctttt  | gggctttgct | 1020 |
| gcccttttta  | cacaatgtgg | ctatcctgcc | ttgatgcctt  | tatatgcatg  | tatacaatct | 1080 |
| aagcaggctt  | tcactttctc | gccaacttac | aaggcctttc  | tgtgtaaaca  | atatctaacc | 1140 |
| ctttaccccg  | ttgcccgga  | acggtcaggt | ctctgccaa   | tgtttgctga  | cgcaaccccc | 1200 |
| acgggttggg  | gcttggccat | aggccatcgg | cgcattgcgtg | gaacctttgt  | ggctcctctg | 1260 |
| ccgatccata  | ctgcggaact | cctagcagct | tgttttgctc  | gcagccgggtc | tggagcgaaa | 1320 |
| cttatcggaa  | ccgacaactc | agttgtcctc | tctcggaaat  | acacctcctt  | tccatggctg | 1380 |

|             |             |            |             |             |            |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| ctaggctgtg  | ctgccaaactg | gatcctgcgc | gggacgtcct  | ttgtctacgt  | cccgtcggcg | 1440 |
| ctgaatcccg  | cggacgaccc  | gtctcggggc | cgtttggggc  | tctaccgtcc  | ccttcttcat | 1500 |
| ctgccgttcc  | ggccgaccac  | ggggcgaccc | tctcttttacg | cggctctccc  | gtctgtgcct | 1560 |
| tctcatctgc  | cggaccgtgt  | gcacttcgct | tcacctctgc  | acgtagcatg  | gagaccaccg | 1620 |
| tgaacgcca   | ccaggtcttg  | ccaaggtct  | tacacaagag  | gactcttgga  | ctctcagcaa | 1680 |
| tgtcaacgac  | cgaccttgag  | gcatacttca | aagactgttt  | gtttaaagac  | tgggaggagt | 1740 |
| tgggggagga  | gattaggtta  | aaggtctttg | tactaggagg  | ctgtaggcat  | aaattggtct | 1800 |
| gttcaccagc  | accatgcaac  | tttttcccct | ctgcctaata  | atctcatgtt  | catgtcctac | 1860 |
| tgttcaagcc  | tccaagctgt  | gccttgggtg | gctttggggc  | atggacattg  | acccgataaa | 1920 |
| agaatttgga  | gcttctgtgg  | agttactctc | ttttttgcct  | tctgacttct  | ttccttctat | 1980 |
| tcgagatctc  | ctcgacaccg  | cctctgctct | gtatcgggag  | gccttagagt  | ctccggaaca | 2040 |
| ttgttcacct  | caccatacag  | cactcaggca | agctattctg  | tgttgggggtg | agttgatgaa | 2100 |
| tctggccacc  | tgggtgggaa  | gtaatttgga | agaccagca   | tccagggaat  | tagtagtcag | 2160 |
| ctatgtcaat  | gttaatatgg  | gcctaaaaat | tagacaacta  | ttgtgggtttc | acatttcctg | 2220 |
| ccttactttt  | ggaagagaaa  | ctgtccttga | gtatttggtg  | tcttttgag   | tgtggattcg | 2280 |
| cactcctccc  | gcttacagac  | caccaaatac | ccctatctta  | tcaacacttc  | cggaaactac | 2340 |
| tgttggttaga | cgacgaggca  | ggtcccctag | aagaagaact  | ccctcgcttc  | gcagacgaag | 2400 |
| gtctcaatcg  | ccgcgtcgca  | gaagatctca | atctcgggaa  | tctcaatgtt  | agtatccctt | 2460 |
| ggactcataa  | ggtgggaaac  | tttactgggc | tttattcttc  | tactgtacct  | gtctttaatc | 2520 |
| ctgattggaa  | aactccctcc  | tttctcaca  | ttcatttaca  | ggaggacatt  | attaatagat | 2580 |
| gtcaacaata  | tgtgggcccct | ctgacagtta | atgaaaaaag  | gagattaaaa  | ttaattatgc | 2640 |
| ctgctagggtt | ctatcctaac  | cttaccaaat | atttgccctt  | ggacaaaggc  | attaaaccgt | 2700 |
| attatcctga  | atatgcagtt  | aatcattact | tcaaaactag  | gcattattta  | catactctgt | 2760 |
| ggaaggctgg  | cattctatat  | aagagagaaa | ctacacgcag  | cgctcatttt  | tgtgggtcac | 2820 |
| catattcttg  | ggaacaagag  | ctacagcatg | ggagggttgg  | cttccaaacc  | tcgacaaggc | 2880 |
| atggggacga  | atctttctgt  | tcccaatcct | ctgggattct  | ttcccgatca  | ccagttggac | 2940 |
| cctgcgttcg  | gagccaactc  | aaacaatcca | gattgggact  | tcaaccccaa  | caaggatcac | 3000 |
| tggccagagg  | caaatacagg  | aggagcggga | gcatttggtc  | cagggttcac  | cccaccacac | 3060 |
| ggaggccttt  | tgggggtggag | ccctcaggct | cagggcataat | tgacaacact  | gccagcagca | 3120 |
| cctcctcctg  | cctccaccaa  | tcggcagtca | ggaagacagc  | ctactcccat  | ctctccacct | 3180 |
| ctaagagaca  | gtcatcctca  | ggccatgcag | tggaa       |             |            | 3215 |

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 3215

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Trình tự bổ sung ngược của SEQ ID NO:1

&lt;400&gt; 2

|            |             |             |             |             |            |     |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-----|
| ttccactgca | tggcctgagg  | atgactgtct  | cttagagggtg | gagagatggg  | agtaggctgt | 60  |
| cttcctgact | gccgattggg  | ggaggcagga  | ggagggtgctg | ctggcagtgt  | tgtcaatatg | 120 |
| ccctgagcct | gaggggtcca  | ccccaaaagg  | cctccgtgtg  | gtgggggtgaa | ccctggacca | 180 |
| aatgctccc  | ctcctacctg  | atttgccctc  | ggccagtgat  | ccttggttggg | gttgaagtcc | 240 |
| caatctggat | tgtttgagtt  | ggctccgaac  | gcagggtcca  | actggtgatc  | gggaaagaat | 300 |
| cccagaggat | tgggaacaga  | aagattcgtc  | cccatgcctt  | gtcgagggtt  | ggaagaccaa | 360 |
| cctcccatgc | tgtagctctt  | gttcccaaga  | atatggtgac  | ccacaaaatg  | aggcgctgcg | 420 |
| tgtagtttct | ctcttatata  | gaatgccagc  | cttccacaga  | gtatgtaaat  | aatgcctagt | 480 |
| tttgaagtaa | tgattaactg  | catattcagg  | ataatacggg  | ttaatgcctt  | tgtccaaggg | 540 |
| caaataattg | gtaagggttag | gatagaacct  | agcaggcata  | attaatttta  | atctcctttt | 600 |
| ttcattaact | gtcagagggc  | ccacataattg | ttgacatcta  | ttaataatgt  | cctcctgtaa | 660 |
| atgaatgtga | ggaaaggagg  | gagttttcca  | atcaggatta  | aagacaggta  | cagtagaaga | 720 |
| ataaagccca | gtaaagtttc  | ccaccttatg  | agtccaaggg  | atactaacat  | tgagattccc | 780 |
| gagattgaga | tcttctgcga  | cgcggcgatt  | gagaccttcg  | tctgcgaggc  | gagggagttc | 840 |
| ttcttctagg | ggacctgcct  | cgtcgtctaa  | caacagtagt  | ttccggaagt  | gttgataaga | 900 |

```

tagggggcatt  tgggtggtctg  taagcgggag  gagtgcgaat  ccacactcca  aaagacacca  960
aataactcaag  gacagtttct  cttccaaaag  taaggcagga  aatgtgaaac  cacaatagtt  1020
gtctaatttt  taggcccata  ttaacattga  catagctgac  tactaattcc  ctggatgctg  1080
ggtcttccaa  attacttccc  acccaggtgg  ccagattcat  caactcacc  caacacagaa  1140
tagcttgcc  gagtgctgta  tggtagggtg  aacaatgttc  cggagactct  aaggcctccc  1200
gatacagagc  agaggcgggtg  tcgaggagat  ctggaataga  aggaaagaag  tcagaaggca  1260
aaaaagagag  taactccaca  gaagctccaa  attctttata  cgggtcaatg  tccatgcccc  1320
aaagccaccc  aaggcacagc  ttggaggctt  gaacagtagg  acatgaacat  gagatgatta  1380
ggcagagggg  aaaaagttgc  atggtgctgg  tgaacagacc  aatttatgcc  tacagcctcc  1440
tagtaciaaag  acctttaacc  taatctcctc  cccaactcc  tcccagtcct  taaacaaaca  1500
gtctttgaag  tatgcctcaa  ggtcggctcg  tgacattgct  gagagtccaa  gagtcctctt  1560
gtgtaagacc  ttgggcaaga  cctgggtggg  gttcacgggtg  gtctccatgc  tacgtgcaga  1620
ggtgaagcga  agtgacacag  gtccggcaga  tgagaaggca  cagacgggga  gaccgcgtaa  1680
agagaggtgc  gccccgtgg  cggccggaac  ggcagatgaa  gaaggggacg  gtagaggccc  1740
aaacggcccc  gagacgggtc  gtccgcggga  ttcagcgccg  acgggacgta  gacaaaggac  1800
gtcccgcgca  ggatccagtt  ggcagcacag  cctagcagcc  atggaaagga  ggtgtatttc  1860
cgagagagga  caactgagtt  gtcggttccg  ataagtttcg  ctccagaccg  gctgcgagca  1920
aaacaagctg  ctaggagttc  cgcagtatgg  atcggcagag  gagccacaaa  ggttccacgc  1980
atgcgccgat  ggcctatggc  caagcccaa  cccgtggggg  ttgcgtcagc  aaacacttgg  2040
cagagacctg  accgttgccg  ggcaacgggg  taaaggttta  gatattgttt  acacagaaaag  2100
gccttgtaag  ttggcgagaa  agtgaaagcc  tgcttagatt  gtatacatgc  atataaaggc  2160
atcaaggcag  gatagccaca  ttgtgtaaaa  ggggcagcaa  agcccaaag  acccacaatt  2220
ctttgacata  ctttccaatc  aataggtcta  ttacaggca  attttcgaaa  acattgcttg  2280
agtttttgta  caatatgttc  ctgcggtaaa  gtaccccaac  ttccaattac  atatcccatg  2340
aagttaagg  agtagcccca  acgtttggtt  ttattaggtt  tcaaatgtat  acccaaagac  2400
aaaagaaaat  tggtaataga  ggtaaaaagg  gactcaagat  gttgtacaga  cttggcccc  2460
aataccacat  catccatata  gctgaaagcc  aaacagtggg  ggaaagccct  acgaaccact  2520
gaacaaatgg  cactagttaa  ctgagccagg  agaaacggac  tgaggccac  tcccatagga  2580
atcttgcgaa  agcccaggat  gatgggatgg  gaatacaagt  gcagtttccg  tccgaagggt  2640
ttgtacagca  acaagaggga  aacatagagg  ttccttgagc  aggaatcgtg  caggttctgc  2700
atggtcccgt  gctggtagtt  gatgttccctg  gaagtagagg  acaaacgggc  aacatacctt  2760
ggtagtccag  aagaaccaac  aagaagatga  ggcatagcag  caggatgaag  aggaatatga  2820
taaaacgccg  cagacacatc  cagcgatagc  caggacaagt  tggaggacaa  gaggttggtg  2880
agtgattgga  ggttggggac  tgcgaatttt  ggccaggaca  cgtgggtgct  cccctagaa  2940
aattgagaga  agtccaccac  gagtctagac  tctgtggtat  tgtgaggatt  cttgtcaaca  3000
agaaaaaccc  cgcctgtaac  acgagcaggg  gtcctaggaa  tcctgatgtt  gtgctctcca  3060
tgttcggtgc  agggccccca  gtcctcgaga  agattgacga  tatgggtgag  gcagtagtcg  3120
gaacagggtt  tactgttccg  gaactggagc  caccagcagg  aaaatatag  cccctcactc  3180
tgggatctag  cagagcttgg  tggaatgttg  tggag  3215

```

<210> 3

<211> 3215

<212> ADN

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> AB014381.1, ADN bộ gen virut viêm gan B,  
trình tự hoàn chỉnh, thể phân lập 22Y04HCC

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)...(3215)

<223> n = A,T,C hoặc G

<400> 3

ctccaccaca ttccaccaag ctctgctaca cccagagta aggggcctat actttcctgc

60

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| tggtggctcc  | agttccggaa  | cagtaaacc   | tgttccgact  | actgcctctc  | ccatatcgtc  | 120  |
| aatcttctcg  | aggactgggg  | accctgcacc  | gaacatggag  | aacacaacat  | caggattcct  | 180  |
| aggaccctcg  | ctcgtgttac  | aggcggggtt  | tttcttggtg  | acaagaatcc  | tcacaatacc  | 240  |
| acagagtcta  | gactcgtggt  | ggacttctct  | caatttttcta | gggggagcac  | ccacgtgtcc  | 300  |
| tggccaaaat  | tgcagtccc   | caacctccaa  | tcactcacca  | acctcttgtc  | ctccaatttg  | 360  |
| tcctggctat  | cgctggatgt  | gtctgcggcg  | ttttatcata  | ttcctcttca  | tcctgctgct  | 420  |
| atgcctcatc  | ttcttggttg  | ttcttctgga  | ctaccaaggt  | atgttgcccc  | tttgtcctct  | 480  |
| acttccagga  | acatcaacta  | ccagcacggg  | accatgcaag  | acctgcacga  | ttcctgctca  | 540  |
| aggcacctct  | atgtttccct  | cttggttgctg | tacaaaacct  | tcggacggaa  | actgcacttg  | 600  |
| tattcccatc  | ccatcatcct  | gggctttcgc  | aagattccta  | tgggagtggg  | cctcagtcctg | 660  |
| tttctcctgg  | ctcagtttac  | tagtgccatt  | tgttcagtgg  | ttcgtagggc  | tttcccccac  | 720  |
| tgtttggctt  | tcagttatat  | ggatgatgtg  | gtattggggg  | ccaagtctgt  | acaacatctt  | 780  |
| gagtcccttt  | ttaccgctgt  | taccaatttt  | cttttgtctt  | tgggtataca  | tttgaaccct  | 840  |
| aataaaaacca | aacgttgggg  | ttactccctt  | aacttcatgg  | gatatgtaat  | tggaggttg   | 900  |
| ggtactttac  | cgcaagacca  | tattgtacta  | aaaatcaagc  | aatgttttcg  | aaaactgcct  | 960  |
| gtaaatagac  | ctattgattg  | gaaagtatgt  | cagagaattg  | tgggtctttt  | gggctttgct  | 1020 |
| gcccccttta  | cacaatgtgg  | ctatcctgcc  | ttaatgcctt  | tatatgcatg  | tatacaatct  | 1080 |
| aagcaggctt  | tcactttctc  | gccaaacttac | aaggcctttc  | tgtgtaaaca  | atatctgaac  | 1140 |
| ctttaccccg  | ttgcccgga   | acggtcagggt | ctctgccaa   | tgtttgctga  | cgcaaccccc  | 1200 |
| actggatggg  | gcttggtctat | tggccatcgc  | cgcatgcgtg  | gaacctttgt  | ggctcctctg  | 1260 |
| ccgatccata  | ctgcggaact  | cctagcagct  | tgttttgctc  | gcagccgggtc | tggagcgaaa  | 1320 |
| ctgatcggaa  | cggacaactc  | tggtgttctc  | tctcgaaat   | acacctcctt  | tccatggctg  | 1380 |
| ctaggggtgtg | ctgccaaactg | gatcctgcgc  | gggacgtcct  | ttgtttacgt  | cccgctcggcg | 1440 |
| ctgaatccc   | cggacgaccc  | atctcggggc  | cgtttggttc  | tctaccgtcc  | ccttcttcat  | 1500 |
| ctgcggttcc  | ggccgaccac  | ggggcgcacc  | tctctttacg  | cggctctccc  | gtctgtgcct  | 1560 |
| tctcatctgc  | cggaccgtgt  | gcacttcgct  | tcacctctgc  | acgtcgcacg  | gagaccaccg  | 1620 |
| tgaacgccca  | ccaggtcttg  | cccaaggtct  | tatataagag  | gactcttgga  | ctctcagcaa  | 1680 |
| tgtcaacgac  | cgaccttgag  | gcatacttca  | aagactgttt  | gtttaaggac  | tgggaggagt  | 1740 |
| tgggggagga  | gattaggtta  | atgatctttg  | tactaggagg  | ctgtaggcat  | aaattggtct  | 1800 |
| gttcaccagc  | accatgcaac  | tttttcacct  | ctgcctaata  | atctcatgtt  | catgtcctac  | 1860 |
| tgttcaagcc  | tccaagctgt  | gccttgggtg  | gctttaggac  | atggacattg  | acccatataa  | 1920 |
| agaatttggg  | gcttctgtgg  | agttactctc  | ttttttgcct  | tctgactttt  | ttccttctat  | 1980 |
| tcgagatctc  | ctcgacaccg  | cctctgctct  | gtatcgggag  | gccttagagt  | ctccggaaca  | 2040 |
| ttgttcacct  | caccatacag  | cactcagaca  | agccattctg  | tgttgggggtg | agttgatgaa  | 2100 |
| tctggccacc  | tgggtgggaa  | gtaatttgga  | agaccagca   | tccaggggat  | tagtagtcag  | 2160 |
| ctatgtcaat  | gttaatatgg  | gcctaaaaat  | cagacaacta  | ctgtgggtttc | acatttcctg  | 2220 |
| tcttactttt  | ggaagagaaa  | ctgttcttga  | gtatttggtg  | tcttttgagg  | tgtggattcg  | 2280 |
| cactcctcct  | gcttacagac  | catcaaatgc  | ccctatctta  | tcaacacttc  | cggaaactac  | 2340 |
| tggtgttaga  | cgacgaggca  | ggtcccctag  | aagaagaact  | ccctcgcctc  | gcagacgaag  | 2400 |
| gtctcaatcg  | ccgcgtcgca  | gaagatctca  | atctcgggaa  | cctcaatgtt  | agtatccctt  | 2460 |
| ggactcataa  | ggtgggaaac  | tttactgggc  | tttattcttc  | tactgtacct  | gtctttaatc  | 2520 |
| ctgagtggca  | aactccctct  | tttctcata   | ttcatttgca  | ggaggacatt  | attaatagat  | 2580 |
| gtcaacaata  | tgtgggacct  | cttacagtta  | atgaaaaaag  | gagattaaaa  | ttaattatgc  | 2640 |
| ctgctagggt  | ctatcctaac  | cttaccaaat  | atttgccctt  | ggacaaaggc  | attaaaccat  | 2700 |
| attatccgga  | acatgcagtt  | aatcattact  | tcaaaactag  | gcattattta  | catactctgt  | 2760 |
| ggaaggcngg  | cattctatat  | aagagagaaa  | ctacacgcag  | cgcctcattt  | tgtgggtcac  | 2820 |
| catattcttg  | ggaacaagag  | ctacagcatg  | ggagggttgg  | cttccaaacc  | tcgacaaggc  | 2880 |
| atggggacaa  | atctttctgt  | tcccaatcct  | ctgggattct  | ttcccgatca  | ccagttggac  | 2940 |
| cctgcgttcg  | gagccaactc  | aaacaatcca  | gattgggact  | tcaaccccaa  | caaggatcac  | 3000 |
| tggccagagg  | caaatcaggt  | aggagcggga  | gcattcgggc  | cagggttcac  | cccaccacac  | 3060 |
| ggcgggtctt  | tgggggtggag | ccctcaggct  | cagggcacat  | tgacaacagt  | gccagtagca  | 3120 |
| cctcctcctg  | cctccaccaa  | tcggcagtc   | ggaagacagc  | ctactcccat  | ctctccacct  | 3180 |
| ctaagagaca  | gtcatcctca  | ggccatgcag  | tggaa       |             |             | 3215 |

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 3215

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự bổ sung ngược của SEQ ID NO:3

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)...(3215)

<223> n = A,T,C hoặc G

<400> 4

|             |             |            |             |             |             |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ttccactgca  | tggcctgagg  | atgactgtct | cttagagggtg | gagagatggg  | agtaggctgt  | 60   |
| cttcctgact  | gccgattggt  | ggaggcagga | ggagggtgcta | ctggcactgt  | tgtcaatgtg  | 120  |
| ccctgagcct  | gagggctcca  | ccccaaaaga | ccgccgtgtg  | gtgggggtgaa | ccctggccccg | 180  |
| aatgctcccg  | ctcctacctg  | atttgctct  | ggccagtgat  | ccttggttggg | gttgaagtcc  | 240  |
| caatctggat  | tgtttgagtt  | ggctccgaac | gcagggtcca  | actggtgatc  | gggaaagaat  | 300  |
| cccagaggat  | tgggaacaga  | aagatttgtc | cccatgcctt  | gtcgagggtt  | ggaagaccaa  | 360  |
| cctcccatgc  | tgtagctctt  | gttcccaaga | atatggtgac  | ccacaaaatg  | aggcgctgcg  | 420  |
| tgtagtttct  | ctcttatata  | gaatgccngc | cttccacaga  | gtatgtaaat  | aatgcctagt  | 480  |
| tttgaagtaa  | tgattaactg  | catgttccgg | ataatatggt  | ttaatgcctt  | tgtccaaggg  | 540  |
| caaataattt  | gtaaggttag  | gatagaacct | agcaggcata  | attaatttta  | atctcctttt  | 600  |
| ttcattaact  | gtaagagggc  | ccacatattg | ttgacatcta  | ttaataatgt  | cctcctgcaa  | 660  |
| atgaatatga  | ggaaaagagg  | gagtttgcca | ctcaggatta  | aagacaggta  | cagtagaaga  | 720  |
| ataaagccca  | gtaaagtttc  | ccaccttatg | agtccaaggg  | atactaacat  | tgagggtccc  | 780  |
| gagattgaga  | tcttctgcga  | cgcggcgatt | gagaccttcg  | tctgcgaggc  | gagggagttc  | 840  |
| ttcttctagg  | ggacctgcct  | cgtcgtctaa | caacagtagt  | ttccggaagt  | gttgataaga  | 900  |
| taggggcat   | tgatggtctg  | taagcaggag | gagtgcgaat  | ccacactcca  | aaagacacca  | 960  |
| aatactcaag  | aacagtttct  | cttccaaaag | taagacagga  | aatgtgaaac  | cacagtagtt  | 1020 |
| gtctgatttt  | taggcccata  | ttaacattga | catagctgac  | tactaattcc  | ctggatgctg  | 1080 |
| ggtcttccaa  | attacttccc  | accagggtgg | ccagattcat  | caactcacc   | caacacagaa  | 1140 |
| tggcttgtct  | gagtgtctgta | tggtagggtg | aacaatgttc  | cggagactct  | aaggcctccc  | 1200 |
| gatacagagc  | agaggcggtg  | tgcaggagat | ctcgaataga  | aggaaaaaag  | tcagaaggca  | 1260 |
| aaaaagagag  | taactccaca  | gaagctccaa | attctttata  | tgggtcaatg  | tccatgtcct  | 1320 |
| aaagccaccc  | aaggcacagc  | ttggaggctt | gaacagtagg  | acatgaacat  | gagatgatta  | 1380 |
| ggcagagggtg | aaaaagttgc  | atggtgctgg | tgaacagacc  | aatttatgcc  | tacagcctcc  | 1440 |
| tagtaciaaag | atcattaacc  | taatctcctc | ccccaaactcc | tcccagtcct  | taaacaaaca  | 1500 |
| gtctttgaag  | tatgcctcaa  | ggtcggctgt | tgacattgct  | gagagtccaa  | gagtcctctt  | 1560 |
| atataagacc  | ttgggcaaga  | cctggtgggc | gttcacgggtg | gtctccatgc  | gacgtgcaga  | 1620 |
| ggtgaagcga  | agtgcacacg  | gtccggcaga | tgagaaggca  | cagacgggga  | gaccgcgtaa  | 1680 |
| agagagggtgc | gccccgtggt  | cggccggaac | ggcagatgaa  | gaaggggacg  | gtagagaccc  | 1740 |
| aaacggcccc  | gagatgggtc  | gtccgcggga | ttcagcgccg  | acgggacgta  | aacaaaggac  | 1800 |
| gtcccgcgca  | ggatccagtt  | ggcagcacac | cctagcagcc  | atggaaagga  | ggtgtatttc  | 1860 |
| cgagagagaa  | caacagagtt  | gtccgttccg | atcagtttcg  | ctccagaccg  | gctgcgagca  | 1920 |
| aaacaagctg  | ctaggagttc  | cgcagtatgg | atcggcagag  | gagccacaaa  | ggttccacgc  | 1980 |
| atgcggcgat  | ggccaatagc  | caagccccat | ccagtggggg  | ttgcgtcagc  | aaacacttgg  | 2040 |
| cagagacctg  | accgttgccg  | ggcaacgggg | taaaggttca  | gatattgttt  | acacagaaag  | 2100 |
| gccttgtaag  | ttggcgagaa  | agtgaagcc  | tgcttagatt  | gtatacatgc  | atataaaggc  | 2160 |
| attaaggcag  | gatagccaca  | ttgtgtaaaa | ggggcagcaa  | agcccaaaag  | accacaatt   | 2220 |
| ctctgacata  | ctttccaatc  | aataggtcta | tttacaggca  | gttttcgaaa  | acattgcttg  | 2280 |
| attttttagta | caatatgggtc | ttgcggtaaa | gtaccccaac  | ttccaattac  | atatcccatg  | 2340 |
| aagttaaggg  | agtaacccca  | acgttttggt | ttattagggg  | tcaaatgtat  | acccaaagac  | 2400 |
| aaaagaaaat  | tggtaacagc  | ggtaaaaagg | gactcaagat  | gttgtagaca  | cttggccccc  | 2460 |
| aataccacat  | catccatata  | actgaaagcc | aaacagtggg  | ggaaagccct  | acgaaccact  | 2520 |
| gaacaaatgg  | cactagtaaa  | ctgagccagg | agaaacggac  | tgaggcccac  | tcccatagga  | 2580 |
| atcttgcgaa  | agcccaggat  | gatgggatgg | gaatacaagt  | gcagtttccg  | tccgaagggt  | 2640 |

|             |             |            |            |            |             |      |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| ttgtacagca  | acaagagggg  | aacatagagg | tgccttgagc | aggaatcgtg | caggtccttgc | 2700 |
| atggtcccgt  | gctggtagtt  | gatgttcctg | gaagtagagg | acaaacgggc | aacatacctt  | 2760 |
| ggtagtccag  | aagaaccaac  | aagaagatga | ggcatagcag | caggatgaag | aggaatatga  | 2820 |
| taaaacgccg  | cagacacatc  | cagcgatagc | caggacaaat | tggaggacaa | gagggttggtg | 2880 |
| agtgtattgga | ggttggggac  | tgcgaatttt | ggccaggaca | cgtgggtgct | ccccctagaa  | 2940 |
| aattgagaga  | agtccaccac  | gagtctagac | tctgtggtat | tgtgaggatt | cttgtcaaca  | 3000 |
| agaaaaaccc  | cgcctgtaac  | acgagcaggg | gtcctaggaa | tcttgatggt | gtgttctcca  | 3060 |
| tgttcgggtgc | aggggtcccca | gtcctcgaga | agattgacga | tatgggagag | gcagtagtcg  | 3120 |
| gaacaggggt  | tactgttccg  | gaactggagc | caccagcagg | aaagtatagg | ccccttactc  | 3180 |
| tgggggtgtag | cagagccttg  | tggaatgtgg | tggag      |            |             | 3215 |

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1200

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; plasmit psiCHECK2-HBV

&lt;400&gt; 5

|             |            |            |            |            |             |      |
|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| ctccacaaca  | ttccaccaag | ctctgcaaga | tcccagagtc | aggggcctgt | attttcctgc  | 60   |
| tgggtggctcc | agttcaggaa | cagtgaaccc | tgttccgact | attgcctctc | ccatatcgtc  | 120  |
| aatcttctcg  | aggactgggg | accctgcacc | gaacatggag | aacatcacat | caggattcct  | 180  |
| aggaccctcg  | ctcgtgttac | aggcgggggt | tttcttggtg | acaaaaatcc | tcacaatacc  | 240  |
| acagagtcta  | gactcgtggg | ggacttctct | caattttcta | gggggagcac | ccgtgtgtcc  | 300  |
| tggccaaaat  | tgcgagtcct | caacctccaa | tcactcacca | acctcctgtc | ctccaacttg  | 360  |
| tcttggttat  | cgttggatgt | gtctgcggcg | ttttatcatc | ttcctcttca | tcctgctgct  | 420  |
| atgcctcatc  | ttcttggttg | ttcttctgga | ctatcaagg  | atgttgcccc | tttgtcctct  | 480  |
| aattccagga  | tcatcaacca | ccagcacggg | accatgcaaa | acctgcacga | ctcctgctca  | 540  |
| aggaacctct  | atgtttccct | catgttgctg | tacaaaacct | tcggacggaa | attgcacctg  | 600  |
| tattcccatc  | ccatcatctt | gggctttcgc | aaaataccta | tgggagtggg | cctcagtcct  | 660  |
| tttctcttgg  | ctcagtttac | tagtgccatt | tgttcagtgg | ttcgtagggc | tttcccccac  | 720  |
| tgtctggcct  | tcagttatat | ggatgatgtg | gtattggggg | ccaagtctgt | acagcatctt  | 780  |
| gagtcctctt  | ataccgctgt | taccaatttt | cttttgtctt | tgggtataca | tttaaaccct  | 840  |
| aacaaaacaa  | aaagatgggg | ttattcccta | aacttcatgg | gttatgtaat | tgggaagtgg  | 900  |
| gggacattgc  | cacaggaaca | tattgtacaa | aaaatcaaac | aatgttttag | aaaacttcct  | 960  |
| gttaacaggc  | ctattgattg | gaaagtatgt | caacgaattg | tgggtctttt | gggcttttgct | 1020 |
| gcccctttta  | cacaatgtgg | ttatcctgct | ttaatgcctt | tgtatgcatg | tatacaagct  | 1080 |
| aaacaggcct  | ttactttctc | gccaaattac | aaggcctttc | tctgtaaaca | atacatgaac  | 1140 |
| ctttaccccg  | ttgctcggca | acggccagg  | ctgtgccaa  | tgtttgctga | cgcaaccccc  | 1200 |

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 681

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Virut viêm gan B

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HBV, kiểu gen A

&lt;400&gt; 6

|             |            |            |            |             |             |     |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-----|
| atggagaaca  | tcacatcagg | attcctagga | cccctgctcg | tgttacaggc  | gggggtttttc | 60  |
| ttgttgacaa  | gaatcctcac | aataccgcag | agtctagact | cgtgggtggac | ttctctcaat  | 120 |
| tttctagggg  | gatcaccctg | gtgtcttggc | caaaattcgc | agtccecaac  | ctccaatcac  | 180 |
| tcaccaacct  | cctgtcctcc | aatttgtcct | ggttatcgct | ggatgtgtct  | gcggcggtttt | 240 |
| atcatattcc  | tcttcatcct | gctgctatgc | ctcatcttct | tattggttct  | tctggattat  | 300 |
| caaggatatgt | tgcccgtttg | tcctctaatt | ccaggatcaa | caacaaccag  | tacgggacca  | 360 |

|             |            |            |             |            |            |     |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| tgcaaaacct  | gcacgactcc | tgctcaaggc | aactctatgt  | ttccctcatg | ttgctgtaca | 420 |
| aaacctacgg  | atggaaattg | cacctgtatt | cccatcccat  | cgtcctgggc | tttcgcaaaa | 480 |
| tacctatggg  | agtgggcctc | agtccgtttc | tcttggtcca  | gtttactagt | gccatttggt | 540 |
| cagtgggttcg | tagggccttc | cccactggtt | tggcctttcag | ctatatggat | gatgtggtat | 600 |
| tggggggccaa | gtctgtacag | catcgtgagt | ccctttatac  | cgctgttacc | aattttcttt | 660 |
| tgtctctggg  | tatacattta | a          |             |            |            | 681 |

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 681

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Virut viêm gan B

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HBV, kiểu gen C

&lt;400&gt; 7

|             |            |            |             |             |             |     |
|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| atggagaaca  | caacatcagg | attcctagga | cccctgctcg  | tgttacaggc  | gggggtttttc | 60  |
| ttgttgacaa  | gaatcctcac | aataccacag | agtctagact  | cgtgggtggac | ttctctcaat  | 120 |
| tttctagggg  | gagcaccac  | gtgtcctggc | caaaattcgc  | agtccccaac  | ctccaatcac  | 180 |
| tcaccaacct  | cttgtcctcc | aatttgctct | ggctatcgct  | ggatgtgtct  | gcggcggttt  | 240 |
| atcatattcc  | tcttcatcct | gctgctatgc | ctcatcttct  | tggtgggttct | tctggactac  | 300 |
| caaggatatgt | tgcccgtttg | tcctctactt | ccaggaacat  | caactaccag  | cacgggacca  | 360 |
| tgcaagacct  | gcacgattcc | tgctcaagga | acctctatgt  | ttccctcttg  | ttgctgtaca  | 420 |
| aaaccttcgg  | acggaaactg | cacttgattt | cccatcccat  | catcctgggc  | tttcgcaaga  | 480 |
| ttcctatggg  | agtgggcctc | agtccgtttc | tcctggctca  | gtttactagt  | gccatttggt  | 540 |
| cagtgggttcg | tagggccttc | cccactggtt | tggcctttcag | ttatatggat  | gatgtggtat  | 600 |
| tggggggccaa | gtctgtacaa | catcttgagt | ccctttttac  | ctctattacc  | aattttcttt  | 660 |
| tgtctttggg  | tatacatttg | a          |             |             |             | 681 |

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 681

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Virut viêm gan B

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HBV, kiểu gen E

&lt;400&gt; 8

|             |            |            |             |             |             |     |
|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| atggaaagca  | tcacatcagg | attcctagga | cccctgctcg  | tgttacaggc  | gggggtttttc | 60  |
| ttgttgacaa  | aaatcctcac | aataccgcag | agtctagact  | cgtgggtggac | ttctctcaat  | 120 |
| tttctagggg  | gagctcccgt | gtgtcttggc | caaaattcgc  | agtccccaac  | ctccaatcac  | 180 |
| tcaccaacct  | cttgtcctcc | aatttgctct | ggctatcgct  | ggatgtgtct  | gcggcggttt  | 240 |
| atcatcttcc  | tcttcatcct | gctgctatgc | ctcatcttct  | tggtgggttct | tctggactat  | 300 |
| caaggatatgt | tgcccgtttg | tcctctaatt | ccaggatcat  | caaccaccag  | tacgggaccc  | 360 |
| tgccgaacct  | gcacgactct | tgctcaagga | acctctatgt  | ttccctcatg  | ttgctgttca  | 420 |
| aaaccttcgg  | acggaaattg | cacttgattt | cccatcccat  | catcatgggc  | tttcggaaaa  | 480 |
| ttcctatggg  | agtgggcctc | agcccgtttc | tcctggctca  | gtttactagt  | gccatttggt  | 540 |
| cagtgggttcg | cggggccttc | cccactgttc | tggcctttcag | ttatatggat  | gatgtggtat  | 600 |
| tggggggccaa | gtctgtacaa | catcttgagt | ccctttatac  | ctctgttacc  | aattttcttt  | 660 |
| tgtctttggg  | tatacattta | a          |             |             |             | 681 |

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 681

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Virut viêm gan B

<220>

<223> HBV, kiểu gen F

<400> 9

|             |            |            |            |            |            |     |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| atggacaaca  | tcacatcagg | actcctagga | cccctgctcg | tgttacaggc | ggtgtgtttc | 60  |
| ttgttgacaa  | aaatcctcac | aataccacag | agtctagact | cgtggtggac | ttctctcaat | 120 |
| tttctagggg  | gactaccggg | gtgtcctggc | caaaattcgc | agtccccaac | ctccaatcac | 180 |
| ttaccaacct  | cctgtcctcc | aacttgtcct | ggctatcggt | ggatgtgtct | gcggcgtttt | 240 |
| atcatcttcc  | tcttcatect | gctgctatgc | ctcatcttct | tgttggttct | tctggactat | 300 |
| caaggatatgt | tgcccgtttg | tcctctactt | ccaggatcca | cgaccaccag | cacgggacca | 360 |
| tgcaaaacct  | gcacaactct | tgctcaagga | acctctatgt | ttccctcctg | ttgctgttcc | 420 |
| aaaccctcgg  | acggaaactg | cacctgtatt | ccatcccat  | catcttgggc | tttaggaaaa | 480 |
| tacctatggg  | agtgggcctc | agcccgtttc | tcctggctca | gtttactagt | gcaatttgtt | 540 |
| cagtgggtgcg | tagggccttc | cccactgtc  | tggcttttag | ttatatggat | gatctggtat | 600 |
| tgggggccaa  | atctgtgcag | catcttgagt | ccctttatac | cgctgttacc | aattttctgt | 660 |
| tatctgtggg  | tatccattta | a          |            |            |            | 681 |

<210> 10

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp (có nghĩa)

<400> 10

|            |           |    |
|------------|-----------|----|
| gugugcacuu | cgcuucaca | 19 |
|------------|-----------|----|

<210> 11

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp (có nghĩa)

<400> 11

|            |           |    |
|------------|-----------|----|
| gugugcactu | cgcuucaca | 19 |
|------------|-----------|----|

<210> 12

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp (có nghĩa)

<400> 12

|            |           |    |
|------------|-----------|----|
| gugugcactu | cgcuucaca | 19 |
|------------|-----------|----|

<210> 13

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AD-66810 Đối nghĩa

<400> 13

ugugaagcga agugcacacu u

21

<210> 14

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AD-192282 Đối nghĩa

<400> 14

ugugaagcga agugcacacu u

21

<210> 15

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AD-192289 Đối nghĩa

<400> 15

ugugaagcga agugcacacu u

21

<210> 16

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AD-81890 Đối nghĩa

<400> 16

ugugaagcga agugcacacu u

21

<210> 17

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AD-81892 Đối nghĩa

<400> 17

ugugaagcga agugcacacu u

21

<210> 18

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AD-192283 Đối nghĩa

<400> 18  
 ugugaagcga agugcacacu u 21

<210> 19  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> AD-192291 Đối nghĩa

<400> 19  
 ugugaagcga agugcacacu u 21

<210> 20  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> AD-192277 Đối nghĩa

<400> 20  
 ugugaagcga agugcacacu u 21

<210> 21  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> AD-192284 Đối nghĩa

<400> 21  
 ugugaagcga agugcacacu u 21

<210> 22  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> AD-192285 Đối nghĩa

<400> 22  
 ugugaagcga agugcacacu u 21

<210> 23  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> AD-192293 Đối nghĩa

|                           |    |
|---------------------------|----|
| <400> 23                  |    |
| ugugaagcga agugcacacu u   | 21 |
| <210> 24                  |    |
| <211> 21                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Trình tự nhân tạo   |    |
| <220>                     |    |
| <223> AD-192279 Đối nghĩa |    |
| <400> 24                  |    |
| ugugaagcga agugcacacu u   | 21 |
| <210> 25                  |    |
| <211> 21                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Trình tự nhân tạo   |    |
| <220>                     |    |
| <223> AD-192294 Đối nghĩa |    |
| <400> 25                  |    |
| ugugaagcga agugcacacu u   | 21 |
| <210> 26                  |    |
| <211> 21                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Trình tự nhân tạo   |    |
| <220>                     |    |
| <223> AD-192280 Đối nghĩa |    |
| <400> 26                  |    |
| ugugaagcga agugcacacu u   | 21 |
| <210> 27                  |    |
| <211> 21                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Trình tự nhân tạo   |    |
| <220>                     |    |
| <223> AD-192287 Đối nghĩa |    |
| <400> 27                  |    |
| ugugaagcga agugcacacu u   | 21 |
| <210> 28                  |    |
| <211> 21                  |    |
| <212> ARN                 |    |
| <213> Trình tự nhân tạo   |    |
| <220>                     |    |
| <223> AD-192281 Đối nghĩa |    |
| <400> 28                  |    |

ugugaagcga agugcacacu u

21

<210> 29

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp (có nghĩa)

<400> 29

gugugcacuu cgcuucaca

19

<210> 30

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp (có nghĩa)

<400> 30

gugugcactu cgcuucaca

19

<210> 31

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit tổng hợp (có nghĩa)

<400> 31

gugugcactu cgcuucaca

19

<210> 32

<211> 832

<212> PRT

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> HBV P protein (YP\_009173866)

<400> 32

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Pro | Leu | Ser | Tyr | Gln | His | Phe | Arg | Arg | Leu | Leu | Leu | Leu | Asp | Asp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Ala | Gly | Pro | Leu | Glu | Glu | Glu | Leu | Pro | Arg | Leu | Ala | Asp | Glu | Gly |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Leu | Asn | Arg | Arg | Val | Ala | Glu | Asp | Leu | Asn | Leu | Gly | Asn | Leu | Asn | Val |
|     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| Ser | Ile | Pro | Trp | Thr | His | Lys | Val | Gly | Asn | Phe | Thr | Gly | Leu | Tyr | Ser |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Ser | Thr | Val | Pro | Val | Phe | Asn | Pro | His | Trp | Lys | Thr | Pro | Ser | Phe | Pro |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Asn | Ile | His | Leu | His | Gln | Asp | Ile | Ile | Lys | Lys | Cys | Glu | Gln | Phe | Val |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

13

```

Gly Ala Lys Ser Val Gln His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr
545          550          555          560
Asn Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys
          565          570          575
Arg Trp Gly Tyr Ser Leu Asn Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly Cys Tyr
          580          585          590
Gly Ser Leu Pro Gln Glu His Ile Ile Gln Lys Ile Lys Glu Cys Phe
          595          600          605
Arg Lys Leu Pro Ile Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg
          610          615          620
Ile Val Gly Leu Leu Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr
625          630          635          640
Pro Ala Leu Met Pro Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe
          645          650          655
Thr Phe Ser Pro Thr Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn
          660          665          670
Leu Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala
          675          680          685
Asp Ala Thr Pro Thr Gly Trp Gly Leu Val Met Gly His Gln Arg Met
          690          695          700
Arg Gly Thr Phe Ser Ala Pro Leu Pro Ile His Thr Ala Glu Leu Leu
705          710          715          720
Ala Ala Cys Phe Ala Arg Ser Arg Ser Gly Ala Asn Ile Ile Gly Thr
          725          730          735
Asp Asn Ser Val Val Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu
          740          745          750
Leu Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr
          755          760          765
Val Pro Ser Ala Leu Asn Pro Ala Asp Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu
          770          775          780
Gly Leu Ser Arg Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly
785          790          795          800
Arg Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro
          805          810          815
Asp Arg Val His Phe Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro
          820          825          830

```

<210> 33

<211> 389

<212> PRT

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> HBV S protein (YP\_009173869)

<400> 33

```

Met Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp
  1          5          10          15
His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp
          20          25          30
Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
          35          40          45
Ala Gly Ala Phe Gly Leu Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu
          50          55          60
Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Gln Thr Leu Pro Ala Asn
65          70          75          80

```

```

Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro
      85                      90                      95
Leu Ser Pro Pro Leu Arg Asn Thr His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn
      100                    105                    110
Ser Thr Thr Phe His Gln Thr Leu Gln Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu
      115                    120                    125
Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Leu
      130                    135                    140
Thr Thr Ala Ser Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Arg Ile Gly Asp Pro
      145                    150                    155                    160
Ala Leu Asn Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu
      165                    170                    175
Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro
      180                    185                    190
Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr
      195                    200                    205
Thr Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser
      210                    215                    220
Pro Thr Ser Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu
      225                    230                    235                    240
Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe
      245                    250                    255
Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu
      260                    265                    270
Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met
      275                    280                    285
Thr Thr Ala Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys
      290                    295                    300
Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala
      305                    310                    315                    320
Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu
      325                    330                    335
Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr
      340                    345                    350
Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu
      355                    360                    365
Tyr Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys
      370                    375                    380
Leu Trp Val Tyr Ile
      385

```

<210> 34

<211> 281

<212> PRT

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> HBV PreS2 protein (YP\_009173870.1)

<400> 34

```

Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Thr Leu Gln Asp Pro Arg
  1                      5                      10                      15
Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val
      20                    25                    30
Asn Pro Val Leu Thr Thr Ala Ser Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Arg
      35                      40                      45

```

```

Ile Gly Asp Pro Ala Leu Asn Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu
 50          55          60
Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile
65          70          75          80
Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe
          85          90          95
Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr
          100          105          110
Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg
          115          120          125
Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu
          130          135          140
Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro
145          150          155          160
Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys
          165          170          175
Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys
          180          185          190
Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro
          195          200          205
Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg
          210          215          220
Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly
225          230          235          240
Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp
          245          250          255
Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro
          260          265          270
Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
          275          280

```

<210> 35

<211> 226

<212> PRT

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> HBV S protein (YP\_009173871.1)

<400> 35

```

Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
 1          5          10          15
Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
          20          25          30
Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys
          35          40          45
Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
          50          55          60
Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65          70          75          80
Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
          85          90          95
Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
          100          105          110
Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala
          115          120          125

```

Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp  
 130 135 140  
 Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys  
 145 150 155 160  
 Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu  
 165 170 175  
 Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu  
 180 185 190  
 Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile  
 195 200 205  
 Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val  
 210 215 220  
 Tyr Ile  
 225

<210> 36

<211> 154

<212> PRT

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> HBV X protein (YP\_009173867.1)

<400> 36

Met Ala Ala Arg Leu Cys Cys Gln Leu Asp Pro Ala Arg Asp Val Leu  
 1 5 10 15  
 Cys Leu Arg Pro Val Gly Ala Glu Ser Cys Gly Arg Pro Phe Ser Gly  
 20 25 30  
 Ser Leu Gly Thr Leu Ser Ser Pro Ser Ala Val Pro Thr Asp  
 35 40 45  
 His Gly Ala His Leu Ser Leu Arg Gly Leu Pro Val Cys Ala Phe Ser  
 50 55 60  
 Ser Ala Gly Pro Cys Ala Leu Arg Phe Thr Ser Ala Arg Arg Met Glu  
 65 70 75 80  
 Thr Thr Val Asn Ala His Gln Ile Leu Pro Lys Val Leu His Lys Arg  
 85 90 95  
 Thr Leu Gly Leu Ser Ala Met Ser Thr Thr Asp Leu Glu Ala Tyr Phe  
 100 105 110  
 Lys Asp Cys Leu Phe Lys Asp Trp Glu Glu Leu Gly Glu Glu Ile Arg  
 115 120 125  
 Leu Lys Val Phe Val Leu Gly Gly Cys Arg His Lys Leu Val Cys Ala  
 130 135 140  
 Pro Ala Pro Cys Asn Phe Phe Thr Ser Ala  
 145 150

<210> 37

<211> 212

<212> PRT

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> HBV PreC protein (YP\_009173857.1)

<400> 37

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr  
 1 5 10 15

```

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile
      20      25      30
Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu
      35      40      45
Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser
      50      55      60
Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His
      65      70      75      80
His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr
      85      90      95
Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp
      100      105      110
Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln
      115      120      125
Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val
      130      135      140
Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala
      145      150      155      160
Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr
      165      170      175
Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro
      180      185      190
Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg
      195      200      205
Glu Ser Gln Cys
      210

```

<210> 38

<211> 843

<212> PRT

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> HBV pol protein (BAA32913.1)

<400> 38

```

Met Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Lys Leu Leu Leu Leu Asp Asp
  1      5      10      15
Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu Glu Leu Pro Arg Leu Ala Asp Glu Gly
      20      25      30
Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu Asp Leu Asn Leu Gly Asn Leu Asn Val
      35      40      45
Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn Phe Thr Gly Leu Tyr Ser
      50      55      60
Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro Glu Trp Gln Thr Pro Ser Phe Pro
      65      70      75      80
His Ile His Leu Gln Glu Asp Ile Ile Asn Arg Cys Gln Gln Tyr Val
      85      90      95
Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg Leu Lys Leu Ile Met Pro
      100      105      110
Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Leu Thr Lys Tyr Leu Pro Leu Asp Lys Gly
      115      120      125
Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Ala Val Asn His Tyr Phe Lys Thr
      130      135      140
Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr Lys Arg
      145      150      155      160

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Thr | Thr | Arg | Ser | Ala | Ser | Phe | Cys | Gly | Ser | Pro | Tyr | Ser | Trp | Glu |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Gln | Glu | Leu | Gln | His | Gly | Arg | Leu | Val | Phe | Gln | Thr | Ser | Thr | Arg | His |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |
| Gly | Asp | Lys | Ser | Phe | Cys | Ser | Gln | Ser | Ser | Gly | Ile | Leu | Ser | Arg | Ser |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Pro | Val | Gly | Pro | Cys | Val | Arg | Ser | Gln | Leu | Lys | Gln | Ser | Arg | Leu | Gly |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Leu | Gln | Pro | Gln | Gln | Gly | Ser | Leu | Ala | Arg | Gly | Lys | Ser | Gly | Arg | Ser |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Gly | Ser | Ile | Arg | Ala | Arg | Val | His | Pro | Thr | Thr | Arg | Arg | Ser | Phe | Gly |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Val | Glu | Pro | Ser | Gly | Ser | Gly | His | Ile | Asp | Asn | Ser | Ala | Ser | Ser | Thr |
|     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Ser | Ser | Cys | Leu | His | Gln | Ser | Ala | Val | Arg | Lys | Thr | Ala | Tyr | Ser | His |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Leu | Ser | Thr | Ser | Lys | Arg | Gln | Ser | Ser | Ser | Gly | His | Ala | Val | Glu | Leu |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| His | His | Ile | Pro | Pro | Ser | Ser | Ala | Thr | Pro | Gln | Ser | Lys | Gly | Pro | Ile |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Leu | Ser | Cys | Trp | Trp | Leu | Gln | Phe | Arg | Asn | Ser | Lys | Pro | Cys | Ser | Asp |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Tyr | Cys | Leu | Ser | His | Ile | Val | Asn | Leu | Leu | Glu | Asp | Trp | Gly | Pro | Cys |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Thr | Glu | His | Gly | Glu | His | Asn | Ile | Arg | Ile | Pro | Arg | Thr | Pro | Ala | Arg |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Val | Thr | Gly | Gly | Val | Phe | Leu | Val | Asp | Lys | Asn | Pro | His | Asn | Thr | Thr |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Glu | Ser | Arg | Leu | Val | Val | Asp | Phe | Ser | Gln | Phe | Ser | Arg | Gly | Ser | Thr |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| His | Val | Ser | Trp | Pro | Lys | Phe | Ala | Val | Pro | Asn | Leu | Gln | Ser | Leu | Thr |
|     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |     |
| Asn | Leu | Leu | Ser | Ser | Asn | Leu | Ser | Trp | Leu | Ser | Leu | Asp | Val | Ser | Ala |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     | 430 |     |     |     |
| Ala | Phe | Tyr | His | Ile | Pro | Leu | His | Pro | Ala | Ala | Met | Pro | His | Leu | Leu |
|     | 435 |     |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Val | Gly | Ser | Ser | Gly | Leu | Pro | Arg | Tyr | Val | Ala | Arg | Leu | Ser | Ser | Thr |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Ser | Arg | Asn | Ile | Asn | Tyr | Gln | His | Gly | Thr | Met | Gln | Asp | Leu | His | Asp |
| 465 |     |     |     | 470 |     |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Ser | Cys | Ser | Arg | His | Leu | Tyr | Val | Ser | Leu | Leu | Leu | Leu | Tyr | Lys | Thr |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     | 490 |     |     |     |     |     | 495 |     |
| Phe | Gly | Arg | Lys | Leu | His | Leu | Tyr | Ser | His | Pro | Ile | Ile | Leu | Gly | Phe |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Arg | Lys | Ile | Pro | Met | Gly | Val | Gly | Leu | Ser | Pro | Phe | Leu | Leu | Ala | Gln |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Phe | Thr | Ser | Ala | Ile | Cys | Ser | Val | Val | Arg | Arg | Ala | Phe | Pro | His | Cys |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Leu | Ala | Phe | Ser | Tyr | Met | Asp | Asp | Val | Val | Leu | Gly | Ala | Lys | Ser | Val |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Gln | His | Leu | Glu | Ser | Leu | Phe | Thr | Ala | Val | Thr | Asn | Phe | Leu | Leu | Ser |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |
| Leu | Gly | Ile | His | Leu | Asn | Pro | Asn | Lys | Thr | Lys | Arg | Trp | Gly | Tyr | Ser |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Leu | Asn | Phe | Met | Gly | Tyr | Val | Ile | Gly | Ser | Trp | Gly | Thr | Leu | Pro | Gln |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |

```

Asp His Ile Val Leu Lys Ile Lys Gln Cys Phe Arg Lys Leu Pro Val
 610                               615                620
Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg Ile Val Gly Leu Leu
625                               630                635                640
Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr Pro Ala Leu Met Pro
                               645                650                655
Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe Thr Phe Ser Pro Thr
                               660                665                670
Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala
                               675                680                685
Arg Gln Arg Ser Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala Asp Ala Thr Pro Thr
                               690                695                700
Gly Trp Gly Leu Ala Ile Gly His Arg Arg Met Arg Gly Thr Phe Val
705                               710                715                720
Ala Pro Leu Pro Ile His Thr Ala Glu Leu Leu Ala Ala Cys Phe Ala
                               725                730                735
Arg Ser Arg Ser Gly Ala Lys Leu Ile Gly Thr Asp Asn Ser Val Val
                               740                745                750
Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala
                               755                760                765
Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Val Pro Ser Ala Leu
                               770                775                780
Asn Pro Ala Asp Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly Leu Tyr Arg Pro
785                               790                795                800
Leu Leu His Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr
                               805                810                815
Ala Val Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp Arg Val His Phe
                               820                825                830
Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro
                               835                840

```

<210> 39

<211> 400

<212> PRT

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> Protein màng bọc HBV (BAA32914.1)

<400> 39

```

Met Gly Gly Trp Ser Ser Lys Pro Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu
 1                               5                10                15
Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro
                               20                25                30
Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn
                               35                40                45
Lys Asp His Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly
                               50                55                60
Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln
65                               70                75                80
Ala Gln Gly Thr Leu Thr Thr Val Pro Val Ala Pro Pro Pro Ala Ser
                               85                90                95
Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu
                               100                105                110
Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His
                               115                120                125

```

```

Gln Ala Leu Leu His Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly
  130          135          140
Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro
145          150          155          160
Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg Thr Gly Asp Pro Ala Pro Asn Met Glu
          165          170          175
Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly
          180          185          190
Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser
          195          200          205
Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly
210          215          220
Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro
225          230          235          240
Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile
          245          250          255
Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu
          260          265          270
Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser
          275          280          285
Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly
          290          295          300
Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn
305          310          315          320
Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu
          325          330          335
Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro
          340          345          350
Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val
          355          360          365
Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser
          370          375          380
Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
385          390          395          400

```

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 210

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Virut viêm gan B

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HBV X protein (BAA32912.1)

&lt;400&gt; 40

```

Met Gly Leu Gly Tyr Trp Pro Ser Pro His Ala Trp Asn Leu Cys Gly
  1          5          10          15
Ser Ser Ala Asp Pro Tyr Cys Gly Thr Pro Ser Ser Leu Phe Cys Ser
          20          25          30
Gln Pro Val Trp Ser Glu Thr Asp Arg Asn Gly Gln Leu Cys Cys Ser
          35          40          45
Leu Ser Glu Ile His Leu Leu Ser Met Ala Ala Arg Val Cys Cys Gln
          50          55          60
Leu Asp Pro Ala Arg Asp Val Leu Cys Leu Arg Pro Val Gly Ala Glu
65          70          75          80
Ser Arg Gly Arg Pro Ile Ser Gly Pro Phe Gly Ser Leu Pro Ser Pro
          85          90          95

```

```

Ser Ser Ser Ala Val Pro Ala Asp His Gly Ala His Leu Ser Leu Arg
      100      105      110
Gly Leu Pro Val Cys Ala Phe Ser Ser Ala Gly Pro Cys Ala Leu Arg
      115      120      125
Phe Thr Ser Ala Arg Arg Met Glu Thr Thr Val Asn Ala His Gln Val
      130      135      140
Leu Pro Lys Val Leu Tyr Lys Arg Thr Leu Gly Leu Ser Ala Met Ser
145      150      155      160
Thr Thr Asp Leu Glu Ala Tyr Phe Lys Asp Cys Leu Phe Lys Asp Trp
      165      170      175
Glu Glu Leu Gly Glu Glu Ile Arg Leu Met Ile Phe Val Leu Gly Gly
      180      185      190
Cys Arg His Lys Leu Val Cys Ser Pro Ala Pro Cys Asn Phe Phe Thr
      195      200      205
Ser Ala
      210

```

<210> 41

<211> 389

<212> PRT

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> protein HBV lớn S (P03138.3)

<400> 41

```

Met Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp
 1      5      10      15
His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp
      20      25      30
Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
      35      40      45
Ala Gly Ala Phe Gly Leu Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu
      50      55      60
Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Gln Thr Leu Pro Ala Asn
65      70      75      80
Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro
      85      90      95
Leu Ser Pro Pro Leu Arg Asn Thr His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn
      100      105      110
Ser Thr Thr Phe His Gln Thr Leu Gln Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu
      115      120      125
Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Leu
      130      135      140
Thr Thr Ala Ser Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Arg Ile Gly Asp Pro
145      150      155      160
Ala Leu Asn Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu
      165      170      175
Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro
      180      185      190
Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr
      195      200      205
Thr Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser
      210      215      220
Pro Thr Ser Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu
225      230      235      240

```

```

Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe
                245                250                255
Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu
                260                265                270
Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met
                275                280                285
Thr Thr Ala Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys
                290                295                300
Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala
305                310                315                320
Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu
                325                330                335
Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr
                340                345                350
Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu
                355                360                365
Tyr Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys
                370                375                380
Leu Trp Val Tyr Ile
385

```

<210> 42

<211> 183

<212> PRT

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> Protein lõi HBV (P03146.1)

<400> 42

```

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 1                5                10                15
Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
                20                25                30
Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
                35                40                45
Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50                55                60
Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala
65                70                75                80
Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
                85                90                95
Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
                100                105                110
Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
                115                120                125
Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
130                135                140
Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr
145                150                155                160
Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser
                165                170                175
Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
                180

```

<210> 43

&lt;211&gt; 3182

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Virut viêm gan B

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Bộ gen virut viêm gan B (chủng ayw)

&lt;400&gt; 43

|             |             |            |             |            |             |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| aattccactg  | catggcctga  | ggatgagtg  | ttctcaaagg  | tggagacagc | ggggtaggct  | 60   |
| gccttcctga  | ctggcgattg  | gtggaggcag | gaggcggatt  | tgctggcaaa | gtttgtagta  | 120  |
| tgccctgagc  | ctgaggggctc | caccccaaaa | ggcctccgtg  | cgggtggggg | aaacccagcc  | 180  |
| cgaatgctcc  | agctcctacc  | ttgttggcgt | ctggccagg   | gtccttggtg | ggattgaagt  | 240  |
| cccaatctgg  | atttgcggtg  | tttgctctga | aggctggatc  | caactgggtg | tcgggaaaga  | 300  |
| atcccagagg  | attgctgggtg | gaaagattct | gccccatgct  | gtagatcttg | ttccaagaa   | 360  |
| tatgggtgacc | cacaaaatga  | ggcgctatgt | gttgtttctc  | tcttatataa | tatacccgcc  | 420  |
| ttccatagag  | tgtgtaaata  | gtgtctagtt | tggaagtaat  | gattaactag | atgttctgga  | 480  |
| taataagggt  | taataaccctt | atccaatggt | aaatatgttg  | taacctttg  | ataaaacctg  | 540  |
| gcaggcataa  | tcaattgcaa  | tcttcttttc | tcattaactg  | tgagtggg   | tacaaactgt  | 600  |
| tcacattttt  | tgataatgtc  | ttggtgtaaa | tgtatattag  | gaaaagatgg | tgttttccaa  | 660  |
| tgaggattaa  | agacagggtac | agtagaagaa | taaagccag   | taaagttccc | caccttatga  | 720  |
| gtccaaggaa  | tactaacatt  | gagattccc  | agattgagat  | cttctgcgac | gcggcgattg  | 780  |
| agaccttcgt  | ctgcgaggcg  | agggagttct | tcttctagg   | gacctgcctc | gtcgtctaac  | 840  |
| aacagtagtc  | tccggaagt   | ttgataggat | aggggcattt  | ggtggtctat | aagctggagg  | 900  |
| agtgcgaatc  | cacactccga  | aagacaccaa | atactctata  | actgtttctc | ttccaaaagt  | 960  |
| gagacaagaa  | atgtgaaacc  | acaagagttg | cctgaacttt  | aggccatat  | tagtggtgac  | 1020 |
| ataactgact  | actaggtctc  | tagacgctgg | atcttccaaa  | ttaacacca  | cccaggtagc  | 1080 |
| tagagtcatt  | agttccccc   | agcaagaat  | tgcttgccctg | agtgcagtat | ggtgagggtga | 1140 |
| acaatgctca  | ggagactcta  | aggcttccc  | atacagagct  | gaggcggat  | ctagaagatc  | 1200 |
| tcgtactgaa  | ggaaagaagt  | cagaaggcaa | aaacgagagt  | aactccacag | tagctccaaa  | 1260 |
| ttctttataa  | gggtcgatgt  | ccatgcccc  | aagccacca   | aggcacagct | tgagggcttg  | 1320 |
| aacagtagga  | catgaacaag  | agatgattag | gcagagggtga | aaaagttgca | tggtgctggt  | 1380 |
| gcgcagacca  | atztatgcct  | acagcctcct | agtacaaaga  | cctttaacct | aatctcctcc  | 1440 |
| cccaactcct  | cccagtcctt  | aaacaaacag | tctttgaagt  | atgcctcaag | gtcggtcgtt  | 1500 |
| gacattgctg  | agagtccaag  | agtcctctta | tgtaagacct  | tgggcaatat | ttggtggg    | 1560 |
| ttcacgggtg  | tctccatg    | acgtgcagag | gtgaagcgaa  | gtgcacacgg | tccggcagat  | 1620 |
| gagaaggcac  | agacggggag  | tccgcgtaaa | gagagggtgc  | ccccgtgg   | ggtcgggaac  | 1680 |
| gcagacggag  | aaggggacga  | gagagtccca | agcgaccccg  | agaaggggtc | tccgcaggat  | 1740 |
| tcagcgccga  | cgggacgtaa  | acaaaggacg | tccgcgcgag  | gatccagttg | gcagcacagc  | 1800 |
| ctagcagcca  | tggaacgat   | gtatatgttc | gggataggac  | aacagagtta | tcagtcccga  | 1860 |
| taatgtttgc  | tccagacctg  | ctgcgagcaa | aacaagcggc  | taggagttcc | gcagtatgga  | 1920 |
| tcggcagagg  | agccgaaaag  | gttccacgca | tgcgctgatg  | gcccagatg  | aagccccagc  | 1980 |
| cagtgggggt  | tgcgtcagca  | aacacttg   | acagacctgg  | ccgttgccg  | gcaacggggt  | 2040 |
| aaaggttcag  | gtattgttta  | cacagaaagg | ccttgtaagt  | tggcgagaaa | gtgaaagcct  | 2100 |
| gcttagattg  | aatacatgca  | tacaaaggca | tcaacgcagg  | ataaccacat | tgtgtaaaag  | 2160 |
| gggcagcaaa  | acccaaaaga  | cccacaattc | gttgacatac  | tttccaatca | ataggcctgt  | 2220 |
| taataggaag  | ttttctaaaa  | cattctttga | ttttttgtat  | gatgtgttct | tgtggcaagg  | 2280 |
| acccataaca  | tccaatgaca  | taaccataa  | aatttagaga  | gtaaccccat | ctctttgttt  | 2340 |
| tgtaggggtt  | taaatgtata  | cccaaagaca | aaagaaaatt  | ggtaacagcg | gtaaaaagg   | 2400 |
| actcaagatg  | ctgtacagac  | ttggccccc  | ataccacatc  | atccatataa | ctgaaagcca  | 2460 |
| aacagtgggg  | gaaagcccta  | cgaaccactg | aacaaatggc  | actagtaaac | tgagccagga  | 2520 |
| gaaacgggct  | gaggccact   | cccataggaa | ttttccgaaa  | gcccaggatg | atgggatggg  | 2580 |
| aatacagggtg | caatttccgt  | ccgaagggtt | ggtacagcaa  | caggagggat | acatagaggt  | 2640 |
| tccttgagca  | gtagtcatgc  | aggtccggca | tggtcccg    | ctggttggtg | aggatcctgg  | 2700 |
| aattagagga  | caaacgggca  | acataccttg | atagtccaga  | agaaccaaca | agaagatgag  | 2760 |
| gcatagcagc  | aggatgaaga  | ggaagatgat | aaaacgccc   | agacacatcc | agcgataacc  | 2820 |
| aggacaagtt  | ggaggacaag  | aggttggtga | gtgattggag  | gttggggact | gcgaattttg  | 2880 |

|            |            |            |            |            |            |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| gccaagacac | acggtagttc | cccctagaaa | attgagagaa | gtccaccacg | agtctagact | 2940 |
| ctgcggtatt | gtgaggattc | ttgtcaacaa | gaaaaacccc | gcctgtaaca | cgagaagggg | 3000 |
| tcctaggaat | cctgatgtga | tgttctccat | gttcagcgca | gggtcccca  | tcctcgagaa | 3060 |
| gattgacgat | aagggagagg | cagtagtcag | aacagggttt | actgttcctg | aactggagcc | 3120 |
| accagcaggg | aaatacaggc | ctctcactct | gggatcttgc | agagtttggg | ggaagggttg | 3180 |
| gg         |            |            |            |            |            | 3182 |

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 3182

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Trình tự bổ sung ngược của SEQ ID NO: 16

&lt;400&gt; 44

|             |             |             |             |            |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| ccacaacctt  | ccaccaaaact | ctgcaagatc  | ccagagtgag  | aggcctgtat | ttccctgctg  | 60   |
| gtggctccag  | ttcaggaaca  | gtaaaccctg  | ttctgactac  | tgcctctccc | ttatcgtcaa  | 120  |
| tcttctcgag  | gattggggac  | cctgcgctga  | acatggagaa  | catcacatca | ggattcctag  | 180  |
| gacccttctt  | cgtgttacag  | gcggggtttt  | tcttgttgac  | aagaatcctc | acaataccgc  | 240  |
| agagtctaga  | ctcgtggtgg  | acttctctca  | atthtctagg  | gggaactacc | gtgtgtcttg  | 300  |
| gcaaaaattc  | gcagtcacca  | acctccaatc  | actcaccaac  | ctcttgtcct | ccaacttgct  | 360  |
| ctgggttatcg | ctggatgtgt  | ctgcggcggt  | ttatcatctt  | cctcttcata | ctgctgctat  | 420  |
| gcctcatctt  | cttgttggtt  | cttctggact  | atcaagggtat | gttgcccgtt | tgtcctctaa  | 480  |
| ttccaggatc  | ctcaacaacc  | agcacgggac  | catgccggac  | ctgcatgact | actgctcaag  | 540  |
| gaacctctat  | gtatccctcc  | tgttgctgta  | ccaaaccttc  | ggacggaaat | tgcacctgta  | 600  |
| ttcccatccc  | atcatcctgg  | gctttcggaa  | aattcctatg  | ggagtgggct | tcagcccggt  | 660  |
| tctcctggct  | cagtttacta  | gtgccatttg  | ttcagtgggt  | cgtagggctt | ttccccactg  | 720  |
| tttggtcttc  | agttatatgg  | atgatgtggt  | attggggggc  | aagtctgtac | agcatcttga  | 780  |
| gtcccttttt  | accgctgtta  | ccaattttct  | tttgtctttg  | ggtatacatt | taaaccctaa  | 840  |
| caaaacaaag  | agatgggggt  | actctctaaa  | ttttatgggt  | tatgtcattg | gatgttatgg  | 900  |
| gtccttgcca  | caagaacaca  | tcatacaaaa  | aatcaaagaa  | tgttttagaa | aacttcctat  | 960  |
| taacaggcct  | attgattgga  | aagtatgtca  | acgaattgtg  | ggtctttttg | gttttgctgc  | 1020 |
| ccctttttaca | caatgtgggt  | atcctgcggt  | gatgcctttg  | tatgcatgta | ttcaatctaa  | 1080 |
| gcaggctttc  | actttctcgc  | caacttacaa  | ggcctttctg  | tgtaaacaat | acctgaacct  | 1140 |
| ttaccccggt  | gcccggcaac  | ggccagggtc  | gtgccaaagt  | tttgctgacg | caacccccac  | 1200 |
| tggctggggc  | ttgggtcatgg | gccatcagcg  | catgctggga  | accttttctg | ctcctctgcc  | 1260 |
| gatccatact  | gcggaactcc  | tagccgcttg  | ttttgctcgc  | agcaggctct | gagcaaacat  | 1320 |
| tatcgggact  | gataactctg  | ttgtcctatc  | ccgcaaatat  | acatcgtttc | catggctgct  | 1380 |
| aggctgtgct  | gccaactgga  | tcctgcgcgg  | gacgtccttt  | gtttacgtcc | cgtcggcgct  | 1440 |
| gaatcctgcg  | gacgaccctt  | ctcggggctc  | cttgggactc  | tctcgtcccc | ttctccgtct  | 1500 |
| gccgttccga  | ccgaccacgg  | ggcgcacctc  | tctttacgcg  | gactccccgt | ctgtgccttc  | 1560 |
| tcattctgcc  | gaccgtgtgc  | acttcgcttc  | acctctgcac  | gtcgcattga | gaccaccgtg  | 1620 |
| aacgcccacc  | aaatatgtcc  | caaggctcta  | cataagagga  | ctcttggtg  | ctcagcaatg  | 1680 |
| tcaacgaccg  | accttgaggc  | atacttcaaa  | gactgtttgt  | ttaaagactg | ggaggagtgt  | 1740 |
| ggggaggaga  | ttaggttaaa  | ggtctttgta  | ctaggaggct  | gtaggcataa | attggtctgc  | 1800 |
| gcaccagcac  | catgcaactt  | tttcacctct  | gcctaatacat | ctcttggtca | tgtcctactg  | 1860 |
| ttcaagcctc  | caagctgtgc  | cttgggtggc  | tttggggcat  | ggacatcgac | ccttataaag  | 1920 |
| aatttgaggc  | tactgtggag  | ttactctcgt  | ttttgccttc  | tgacttcttt | ccttcagtac  | 1980 |
| gagatcttct  | agataccgcc  | tcagctctgt  | atcggggaag  | cttagagtct | cctgagcatt  | 2040 |
| gttcacctca  | ccatactgca  | ctcaggcaag  | caattctttg  | ctggggggaa | ctaattgactc | 2100 |
| tagctacctg  | ggtgggtggt  | aattttggaag | atccagcgct  | tagagacctc | gtagtcaagt  | 2160 |
| atgtcaacac  | taatatgggc  | ctaaagtcca  | ggcaactctt  | gtggtttcac | atthtctgtc  | 2220 |
| tcacttttgg  | aagagaaaca  | gttatagagt  | atthtgggtg  | tttcggagtg | tggattcgca  | 2280 |
| ctcctccagc  | ttatagacca  | ccaaatgccc  | ctatcctatc  | aacacttccg | gagactactg  | 2340 |
| ttgttagacg  | acgaggcagg  | tcccctagaa  | gaagaactcc  | ctcgccctcg | agacgaagg   | 2400 |

```

ctcaatcgcc gcgtcgcaga agatctcaat ctcggggaatc tcaatgttag tattccttgg 2460
actcataagg tggggaactt tactgggctt tattcttcta ctgtacctgt ctttaatcct 2520
cattggaaaa caccatcttt tcctaataata catttacacc aagacattat caaaaaatgt 2580
gaacagtttg taggcccact cacagttaat gagaaaagaa gattgcaatt gattatgcct 2640
gccaggtttt atccaaaggt taccaaatat ttaccattgg ataagggtat taaaccttat 2700
tatccagaac atctagttaa tcattacttc caaactagac actatttaca cactctatgg 2760
aaggcgggta tattatataa gagagaaaca acacatagcg cctcattttg tgggtcacca 2820
tattcttggg aacaagatct acagcatggg gcagaatctt tccaccagca atcctctggg 2880
attctttccc gaccaccagt tggatccagc cttcagagca aacaccgcaa atccagattg 2940
ggacttcaat cccaacaagg acacctggcc agacgccaac aaggtaggag ctggagcatt 3000
cgggctgggt ttcaccccac cgcacggagg ccttttgggg tggagccctc aggetcaggg 3060
catactacaa actttgccag caaatccgcc tcctgcctcc accaatcgcc agtcaggaag 3120
gcagcctacc ccgctgtctc cacctttgag aaacactcat ctcaggcca tgcagtggaa 3180
tt

```

<210> 45

<211> 389

<212> PRT

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> HBV S protein (P03142.4)

<400> 45

```

Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Leu Pro Asp
 1          5          10          15
His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Thr Asn Pro Asp Trp
          20          25          30
Asp Phe Asn Pro Ile Lys Asp His Trp Pro Ala Ala Asn Gln Val Gly
          35          40          45
Val Gly Ala Phe Gly Pro Gly Leu Thr Pro Pro His Gly Gly Ile Leu
          50          55          60
Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Ser Thr Ile
65          70          75          80
Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro
          85          90          95
Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn
          100          105          110
Ser Thr Ala Leu His Gln Ala Leu Gln Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu
          115          120          125
Tyr Leu Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Ala Pro
          130          135          140
Asn Ile Ala Ser His Ile Ser Ser Ile Ser Ala Arg Thr Gly Asp Pro
145          150          155          160
Val Thr Ile Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu
          165          170          175
Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro
          180          185          190
Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser
          195          200          205
Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser
          210          215          220
Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu
225          230          235          240
Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe
          245          250          255

```

Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu  
 260 265 270  
 Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr  
 275 280 285  
 Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Lys Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys  
 290 295 300  
 Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala  
 305 310 315 320  
 Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu  
 325 330 335  
 Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr  
 340 345 350  
 Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu  
 355 360 365  
 Tyr Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys  
 370 375 380  
 Leu Trp Val Tyr Ile  
 385

<210> 46

<211> 185

<212> PRT

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> protein lõi HBV (P03149.1)

<400> 46

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp  
 20 25 30  
 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys  
 35 40 45  
 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu  
 50 55 60  
 Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Gln Asp Pro Ala  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys  
 85 90 95  
 Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg  
 100 105 110  
 Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr  
 115 120 125  
 Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro  
 130 135 140  
 Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg  
 145 150 155 160  
 Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg  
 165 170 175  
 Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys  
 180 185

<210> 47

<211> 3200

<212> ADN

<213> Virut viêm gan B

<220>

<223> Trình tự ADN hoàn chỉnh của virut viêm gan B (typ phụ  
adw)

<400> 47

|             |             |            |             |             |             |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ttccactgcc  | ttgcaccaag  | ctctgcagga | tcccagagtc  | aggggtctgt  | atcttcctgc  | 60   |
| tgggtggctcc | agttcaggaa  | cagtaaacc  | tgctccgaat  | attgcctctc  | acatctcgtc  | 120  |
| aatctccgcg  | aggactggg   | accctgtgac | gatcatggag  | aacatcacat  | caggattcct  | 180  |
| aggacccctg  | ctcgtgttac  | aggcggggtt | tttcttggtg  | acaagaatcc  | tcacaatacc  | 240  |
| gcagagtcta  | gactcgtggt  | ggacttctct | caattttcta  | gggggatcac  | ccgtgtgtct  | 300  |
| tggccaaaat  | tcgcagtc    | caacctccaa | tcactcacca  | acctcctgtc  | ctccaatttg  | 360  |
| tcttggttat  | cgctggatgt  | gtctgcggcg | ttttatcata  | ttcctcttca  | tctgtgtgct  | 420  |
| atgcctcatc  | ttcttattgg  | ttcttctgga | ttatcaagg   | atgttgccc   | tttgtcctct  | 480  |
| aattccagga  | tcaacaacaa  | ccagtacggg | accatgcaaa  | acctgcacga  | ctcctgtctca | 540  |
| aggcaactct  | aagtttccct  | catgttgctg | tacaaaacct  | acggatggaa  | attgcacctg  | 600  |
| tattcccatc  | ccatcgtcct  | gggctttcgc | aaaataccta  | tgggagtggg  | cctcagtccg  | 660  |
| tttctcttg   | ctcagtttac  | tagtgccatt | tgttcagtgg  | ttcgtagggc  | tttccccac   | 720  |
| tgtttggtt   | tcagctatat  | ggatgatgtg | gtattggggg  | ccaagtctgt  | acagcatcgt  | 780  |
| gagtcctctt  | ataccgctgt  | taccaatttt | cttttgtctc  | tgggtataca  | tttaaaccct  | 840  |
| aacaaaacaa  | aaagatgggg  | ttattcccta | aacttcatgg  | gctacataat  | tggaagtgtg  | 900  |
| ggaactttgc  | cacaggatca  | tattgtacaa | aagatcaaac  | actgttttag  | aaaacttcct  | 960  |
| gttaacaggc  | ctattgattg  | gaaagtatgt | caaagaattg  | tgggtctttt  | gggctttgct  | 1020 |
| gctccattta  | cacaatgtgg  | atatcctgcc | ttaatgcctt  | tgtatgcatg  | tatacaagct  | 1080 |
| aaacaggctt  | tcactttctc  | gccaacttac | aaggcctttc  | taagtaaaca  | gtacatgaac  | 1140 |
| ctttaccccg  | ttgctcggca  | acggcctggt | ctgtgccaa   | tgtttgctga  | cgcaaccccc  | 1200 |
| actggctggg  | gcttagccat  | aggccatcag | cgcatgcgtg  | gaacctttgt  | ggctcctctg  | 1260 |
| ccgatccata  | ctgcggaact  | cctagccgct | tgttttgctc  | gcagccgggtc | tggagcaaa   | 1320 |
| ctcatcggaa  | ctgacaattc  | tgtcgtcctc | tcgcggaaat  | atacatcatt  | tccatggctg  | 1380 |
| ctaggctgta  | ctgccaactg  | gacccctcgc | gggacgtcct  | ttgtttacgt  | cccgtcggcg  | 1440 |
| ctgaatcccg  | cggacgaccc  | ctctcggggc | cgcttgggac  | tctctcgtcc  | ccttctccgt  | 1500 |
| ctgccgttcc  | agccgaccac  | ggggcgcacc | tctctttacg  | cggctctccc  | gtctgtgcct  | 1560 |
| tctcatctgc  | cggctcgtgt  | gcacttcgct | tcacctctgc  | acgttgcatg  | gcgaccaccg  | 1620 |
| tgaacgcca   | tcagatcctg  | cccaaggctt | tacataagag  | gactcttgga  | ctcccagcaa  | 1680 |
| tgtcaacgac  | cgaccttgag  | gcctacttca | aagactgtgt  | gtttaaggac  | tgggaggagt  | 1740 |
| tgggggagga  | gattagggtta | atgatctttg | tattaggagg  | ctgtaggcat  | aaattggtct  | 1800 |
| gcgaccagc   | accatgcaac  | tttttcacct | ctgcctaata  | atctcttgta  | catgtcccac  | 1860 |
| tgttcaagcc  | tccaagctgt  | gccttgggtg | gctttggggc  | atggacattg  | acccttataa  | 1920 |
| agaatttgga  | gctactgtgg  | agttactctc | gtttttgcct  | tctgacttct  | ttccttccgt  | 1980 |
| acgagatctc  | ctagacaccg  | cctcagctct | gtatcgagaa  | gccttagagt  | ctcctgagca  | 2040 |
| ttgctcacct  | caccatactg  | cactcaggca | agccattctc  | tgctgggggg  | aattgatgac  | 2100 |
| tctagctacc  | tgggtgggta  | ataatttgca | agatccagca  | tccagagatc  | tagtagtcaa  | 2160 |
| ttatgttaat  | actaacatgg  | gtttaaagat | caggcaacta  | ttgtgggttc  | atatactctg  | 2220 |
| ccttactttt  | ggaagagaga  | ctgtacttga | atatttggtc  | tctttcggag  | tgtggattcg  | 2280 |
| cactcctcca  | gcctatagac  | caccaaattg | ccctatctta  | tcaacacttc  | cggaaactac  | 2340 |
| tgttgttaga  | cgacgggacc  | gaggcaggtc | ccctagaaga  | agaactccct  | cgcctcgcag  | 2400 |
| acgcagatct  | caatcgccgc  | gtcgcagaag | atctcaatct  | cgggaatctc  | aatgttagta  | 2460 |
| ttccttggtg  | tcataagggtc | ggaaacttta | cggggcttta  | ttcctctaca  | gtacctatct  | 2520 |
| ttaatcctga  | atggcaaaact | ccttcctttc | ctaagattca  | tttacaagag  | gacattatta  | 2580 |
| ataggtgtca  | acaatttggtg | ggccctctca | ctgtaaata   | aaagagaaga  | ttgaaattaa  | 2640 |
| ttatgcctgc  | tagattctat  | cctaccacaa | ctaaatatatt | gcccttagac  | aaaggaatta  | 2700 |
| aaccttatta  | tccagatcag  | gtagttaatc | attacttcca  | aaccagacat  | tattttacata | 2760 |
| ctctttggaa  | ggctgggtatt | ctatataaga | gggaaaccac  | acgtagcgca  | tcattttgcg  | 2820 |
| ggtcaccata  | ttcttgggaa  | caagagctac | agcattcgca  | aaggcatggg  | gacgaatctt  | 2880 |
| tctgttccca  | accctctggg  | attccttccc | gatcatcagt  | tggaccctgc  | attcggagcc  | 2940 |

|            |            |            |            |            |            |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| aactcaacaa | atccagattg | ggacttcaac | cccatcaagg | accactggcc | agcagccaac | 3000 |
| caggtaggag | tgggagcatt | cgggccaggg | ctcaccctc  | cacacggcgg | tattttgggg | 3060 |
| tggagccctc | aggctcaggg | catattgacc | acagtgtcaa | caattcctcc | tcctgcctcc | 3120 |
| accaatcggc | agtcaggaag | gcagcctact | cccatctctc | cacctctaag | agacagtcac | 3180 |
| cctcaggcca | tgcagtggaa |            |            |            |            | 3200 |

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 3200

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Trình tự bổ sung ngược của SEQ ID NO: 47

&lt;400&gt; 48

|             |             |            |             |            |             |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| ttccactgca  | tggcctgagg  | atgactgtct | cttagagggtg | gagagatggg | agtaggctgc  | 60   |
| cttcctgact  | gccgattggt  | ggaggcagga | ggaggaattg  | ttgacactgt | ggtcaatatg  | 120  |
| ccctgagcct  | gagggctcca  | ccccaaaata | ccgccgtgtg  | gaggggtgag | ccctggccccg | 180  |
| aatgctccca  | ctcctacctg  | gttggctgct | ggccagtggg  | ccttgatggg | gttgaagtcc  | 240  |
| caatctggat  | ttgttgagtt  | ggctccgaat | gcagggtcca  | actgatgac  | gggaaggaat  | 300  |
| cccagagggg  | tgggaacaga  | aagattcgct | cccatgcctt  | tgcgaatgct | gtagctcttg  | 360  |
| ttcccaagaa  | tatggtgacc  | cgcaaaatga | tgcgctacgt  | gtggtttccc | tcttatatag  | 420  |
| aataccagcc  | ttccaaagag  | tatgtaaata | atgtctgggt  | tggaaagta  | gattaactac  | 480  |
| ctgatctgga  | taataaggtt  | taattccttt | gtctaagggc  | aaatatattg | tgtgggtagg  | 540  |
| atagaatcta  | gcaggcataa  | ttaatttcaa | tcttctcttt  | tcatttacag | tgagagggcc  | 600  |
| cacaaattgt  | tgacacctat  | taataatgtc | ctcttgtaaa  | tgaatcttag | gaaaggaagg  | 660  |
| agtttgccat  | tcaggattaa  | agataggtac | tgtagaggaa  | taaagccccg | taaagtttcc  | 720  |
| gaccttatga  | gtccaaggaa  | tactaacatt | gagattcccc  | agattgagat | cttctgcgac  | 780  |
| gcggcgattg  | agatctgcgt  | ctgcgaggcg | agggagtctt  | tcttctaggg | gacctgcctc  | 840  |
| ggtcccgtcg  | tctaacaaca  | gtagtctccg | gaagtgttga  | taagataggg | gcatttggtg  | 900  |
| gtctataggc  | tggaggagtg  | cgaatccaca | ctccgaaaga  | gaccaaata  | tcaagtacag  | 960  |
| tctctcttcc  | aaaagtaagg  | caagatatat | gaaaccacaa  | tagttgcctg | atctttaaac  | 1020 |
| ccatgttagt  | attaacataa  | ttgactacta | gatctctgga  | tgctggatct | tgcaaattat  | 1080 |
| taccacacca  | ggtagctaga  | gtcatcaatt | ccccccagca  | gagaatggct | tgcttgagtg  | 1140 |
| cagtatggtg  | aggtgagcaa  | tgctcaggag | actctaaggc  | ttctcgatac | agagctgagg  | 1200 |
| cgggtgtctag | gagatctcgt  | acggaaggaa | agaagtcaga  | aggcaaaaac | gagagtaact  | 1260 |
| ccacagtagc  | tccaaattct  | ttataagggt | caatgtccat  | gccccaaagc | cacccaaggc  | 1320 |
| acagcttgga  | ggcttgaaca  | gtgggacatg | tacaagagat  | gattaggcag | aggtgaaaaa  | 1380 |
| gttgcattgg  | gctgggtgcg  | agaccaatct | atgcctacag  | cctcctaata | caaagatcat  | 1440 |
| taacctaatc  | tcctccccca  | actcctccca | gtccttaaac  | acacagtctt | tgaagttagg  | 1500 |
| ctcaaggctg  | gtcgttgaca  | ttgctgggag | tccaagagtc  | ctcttatgta | agaccttggg  | 1560 |
| caggatctga  | tgggcgttca  | cgggtggtcg | catgcaacgt  | gcagaggtga | agcgaagtgc  | 1620 |
| acacggaccg  | gcagatgaga  | aggcacagac | ggggagaccg  | cgtaaagaga | ggtgcgcccc  | 1680 |
| gtggtcggct  | ggaacggcag  | acggagaagg | ggacgagaga  | gtcccaagcg | gccccgagag  | 1740 |
| gggtcgtccg  | cgggattcag  | cgccgacggg | acgtaaacaa  | aggacgtccc | gcgaaggatc  | 1800 |
| cagttggcag  | tacagcctag  | cagccatgga | aatgatgtat  | atttcgcgca | gaggacgaca  | 1860 |
| gaattgtcag  | ttccgatgag  | ctttgctcca | gaccggctgc  | gagcaaaaca | agcggctagg  | 1920 |
| agttccgcag  | tatggatcgg  | cagaggagcc | acaaagggtt  | cacgcatgcg | ctgatggcct  | 1980 |
| atggctaagc  | cccagccagt  | gggggttgcg | tcagcaaaaca | cttggcacag | accaggccgt  | 2040 |
| tgccgagcaa  | cgggggtaaag | gttcatgtac | tgtttactta  | gaaaggcctt | gtaagttggc  | 2100 |
| gagaaagtga  | aagcctgttt  | agcttgtata | catgcataca  | aaggcattaa | ggcaggatat  | 2160 |
| ccacattgtg  | taaatggagc  | agcaaagccc | aaaagaccca  | caattctttg | acatactttc  | 2220 |
| caatcaatag  | gcctgttaac  | aggaagtttt | ctaaaacagt  | gtttgatctt | ttgtacaata  | 2280 |
| tgatcctgtg  | gcaaagttcc  | ccaacttcca | attatgtagc  | ccatgaagtt | tagggaataa  | 2340 |
| ccccatcttt  | ttgttttggt  | agggtttaaa | tgtataccca  | gagacaaaag | aaaattggta  | 2400 |
| acagcgggtat | aaagggactc  | acgatgctgt | acagacttgg  | cccccaatac | cacatcatcc  | 2460 |

|            |             |            |            |            |            |      |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| atatagctga | aagccaaaca  | gtgggggaaa | gccctacgaa | ccactgaaca | aatggcacta | 2520 |
| gtaaactgag | ccaagagaaa  | cggactgagg | cccactccca | taggtathtt | gcgaaagccc | 2580 |
| aggacgatgg | gatgggaata  | caggtgcaat | ttccatccgt | aggttttgta | cagcaacatg | 2640 |
| agggaaactt | agagttgcct  | tgagcaggag | tcgtgcagg  | tttgcattgt | cccgtactgg | 2700 |
| ttgtttgtga | tcctggaatt  | agaggacaaa | cgggcaacat | accttgataa | tccagaagaa | 2760 |
| ccaataagaa | gatgaggcat  | agcagcagga | tgaagaggaa | tatgataaaa | cgccgcagac | 2820 |
| acatccagcg | ataaccagga  | caaattggag | gacaggaggt | tggtgagtga | ttggagggtg | 2880 |
| gggactgcga | atthttggcca | agacacacgg | gtgatcccc  | tagaaaattg | agagaagtcc | 2940 |
| accacgagtc | tagactctgc  | ggtattgtga | ggattcttgt | caacaagaaa | aaccccgctt | 3000 |
| gtaacacgag | caggggtcct  | aggaatcctg | atgtgatgtt | ctccatgatc | gtcacagggt | 3060 |
| ccccagtcct | cgcgagagatt | gacgagatgt | gagaggcaat | attcggagca | gggtttactg | 3120 |
| ttcctgaact | ggagccacca  | gcaggaagat | acagaccctt | gactctggga | tcctgcagag | 3180 |
| cttggtgcaa | ggcagtgga   |            |            |            |            | 3200 |

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 3182

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Virut viêm gan B

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Bộ gen hoàn chỉnh typ phụ ayw của virut viêm gan B

&lt;400&gt; 49

|            |            |            |            |             |            |      |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| aattccacaa | cctttcacca | aactctgcaa | gatcccagag | tgagaggcct  | gtattttcct | 60   |
| gctgggtggc | ccagttcagg | agcagtaaac | cctgtttcga | ctactgcctc  | tccttatatg | 120  |
| tcaatcttct | cgaggattgg | ggacctgag  | ctgaacatgg | agaacatcac  | atcaggattc | 180  |
| ctaggacccc | ttctcgtgtt | acaggcgggg | tttttcttgt | tgacaagaat  | cctcacataa | 240  |
| ccgcagagtc | tagactcgtg | gtggacttct | ctcaattttc | tagggggaac  | taccgtgtgt | 300  |
| cttgccaaa  | attcgagtc  | cccaacctcc | aatcactcac | caacctcctg  | tcctccaact | 360  |
| tgctcctggt | atcgctggat | gtgtctgcgg | cgttttatca | tcttcctctt  | catcctgctg | 420  |
| ctatgcctca | tcttcttgtt | ggttcttctg | gactatcaag | gtatgttgcc  | cgtttgtcct | 480  |
| ctaattccag | gatcctcaac | caccagcacg | ggacctgac  | gaacctgcat  | gactactgct | 540  |
| caaggaacct | ctatgtatcc | ctcctgttgc | tgtaccaaac | cttcggacgg  | aaattgcacc | 600  |
| tgtattccca | tcccatcatc | ctgggctttc | ggaaaattcc | tatgggagtg  | ggcctcagcc | 660  |
| cgtttctcct | ggctcagttt | actagtcca  | tttgttcagt | ggttcgtagg  | gctttcccc  | 720  |
| actgtttggc | tttcagttat | atggatgatg | tggtattggg | ggccaagtct  | gtacagcatc | 780  |
| ttgagtcctt | ttttaccgct | gttaccaatt | ttcttttgtc | tttgggtata  | catttaaacc | 840  |
| ctaacaaaac | aaagagatgg | ggttactctc | tgaattttat | gggttatgtc  | attggaagtt | 900  |
| atgggtcctt | gccacaagaa | cacatcatac | aaaaaatcaa | agaatgtttt  | agaaaacttc | 960  |
| ctattaacag | gcctattgat | tggaaaagat | gtcaacgaat | tgtgggtcct  | ttgggttttg | 1020 |
| ctgccccatt | tacacaatgt | ggttatcctg | cgttaatgcc | cttgatgca   | tgtattcaat | 1080 |
| ctaagcaggc | tttactttc  | tcgccaactt | acaaggcctt | tctgtgtaaa  | caatacctga | 1140 |
| acctttaccc | cgttgcccg  | caacggccag | gtctgtgcca | agtgtttgct  | gacgcaacc  | 1200 |
| ccactggctg | gggcttggtc | atgggccatc | agcgcgtgcg | tggaaccttt  | tcggctcctc | 1260 |
| tgccgatcca | tactgcggaa | ctcctagccg | cttgttttgc | tcgcagcagg  | tctggagcaa | 1320 |
| acattatcgg | gactgataac | tctgttgctc | tctcccgcaa | atatacatcg  | tatccatggc | 1380 |
| tgctaggctg | tgctgccaac | tggatcctgc | gcgggacgtc | ctttgtttac  | gtcccgtcgg | 1440 |
| cgctgaatcc | tgcgagcagc | ccttctcggg | gtcgttggtg | actctctcgt  | ccccttctcc | 1500 |
| gtctgcggtt | ccgaccgacc | acggggcgca | cctctcttta | cgcggaactc  | ccgtctgtgc | 1560 |
| cttctcatct | gccggaccgt | gtgcacttgc | cttcacctct | gcacgtcgca  | tggagaccac | 1620 |
| cgtgaacgcc | caccgaatgt | tgcccaaggt | cttacataag | aggactcttg  | gactctctgc | 1680 |
| aatgtcaacg | accgaccttg | aggcatactt | caaagactgt | ttgttttaaag | actgggagga | 1740 |
| gttgggggag | gagattagat | taaaggtcct | tgtactagga | ggctgtaggc  | ataaattggt | 1800 |
| ctgcgcacca | gcaccatgca | actttttcac | ctctgcctaa | tcatctcttg  | ttcatgtcct | 1860 |
| actgttcaag | cctccaagct | gtgccttggg | tggctttggg | gcatggacat  | cgaccttat  | 1920 |
| aaagaatttg | gagctactgt | ggagttactc | tcgtttttgc | cttctgactt  | ctttccttca | 1980 |

|             |            |             |            |            |            |      |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| gtacgagatc  | ttctagatac | cgcctcagct  | ctgtatcggg | aagccttaga | gtctcctgag | 2040 |
| cattgttcac  | ctcaccatac | tgcactcagg  | caagcaattc | tttgctgggg | ggaactaatg | 2100 |
| actctagcta  | cctgggtggg | tggttaatttg | gaagatccag | catctagaga | cctagtagtc | 2160 |
| agttatgtca  | acactaatat | gggcctaaag  | ttcaggcaac | tcttgtgggt | tcacatttct | 2220 |
| tgtctcactt  | ttggaagaga | aaccgttata  | gagtatttgg | tgtctttcgg | agtgtggatt | 2280 |
| cgcactcctc  | cagcttatag | accaccaaat  | gcccctatcc | tatcaacact | tccggaaact | 2340 |
| actgttggtta | gacgacgagg | caggtcccct  | agaagaagaa | ctccctcgcc | tcgcagacga | 2400 |
| aggtctcaat  | cgccgcgtcg | cagaagatct  | caatctcggg | aacctcaatg | ttagtattcc | 2460 |
| ttggactcat  | aaggtgggga | actttactgg  | tctttattct | tctactgtac | ctgtctttaa | 2520 |
| tcctcattgg  | aaaacaccat | cttttcctaa  | tatacattta | caccaagaca | ttatcaaaaa | 2580 |
| atgtgaacag  | tttgtaggcc | cacttacagt  | taatgagaaa | agaagattgc | aattgattat | 2640 |
| gcctgctagg  | ttttatccaa | aggttaccaa  | atatttacca | ttggataagg | gtattaaacc | 2700 |
| ttattatcca  | gaacatctag | ttaatcatta  | cttccaaact | agacactatt | tacacactct | 2760 |
| atggaaggcg  | ggtatattat | ataagagaga  | aacaacacat | agcgcctcat | tttgtgggtc | 2820 |
| accatattct  | tgggaacaag | atctacagca  | tggggcagaa | tctttccacc | agcaatcctc | 2880 |
| tgggattctt  | tcccgaccac | cagttggatc  | cagccttcag | agcaaacaca | gcaaatccag | 2940 |
| attgggactt  | caatcccaac | aaggacacct  | ggccagacgc | caacaaggta | ggagctggag | 3000 |
| cattcgggct  | gggtttcacc | ccaccgcacg  | gaggcctttt | ggggtggagc | cctcaggctc | 3060 |
| agggcatact  | acaaactttg | ccagcaaate  | cgcctcctgc | ctccaccaat | cgccagacag | 3120 |
| gaaggcagcc  | taccccgctg | tctccacctt  | tgagaaacac | tcatcctcag | gccatgcagt | 3180 |
| gg          |            |             |            |            |            | 3182 |