



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

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

(11)



1-0028494

(51)⁷ A61K 47/02; A61K 31/712; C07H (13) B
21/00; A61K 31/713; A61K 31/7088;
A61K 31/7125

(21) 1-2013-00348

(22) 18/08/2011

(86) PCT/CA2011/000956 18/08/2011

(87) WO 2012/021985 23/02/2012

(30) 61/375,257 20/08/2010 US

(45) 25/06/2021 399

(43) 26/08/2013 305A

(73) Replicor Inc. (CA)

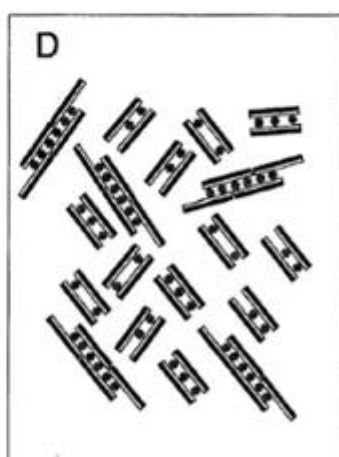
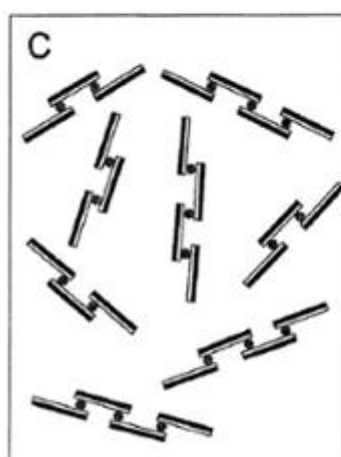
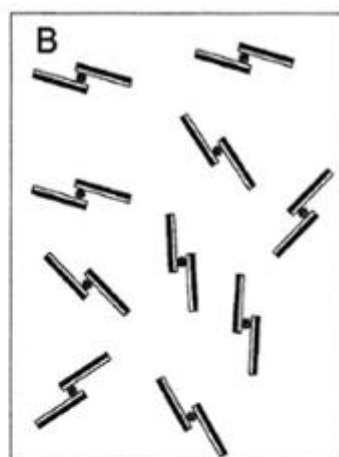
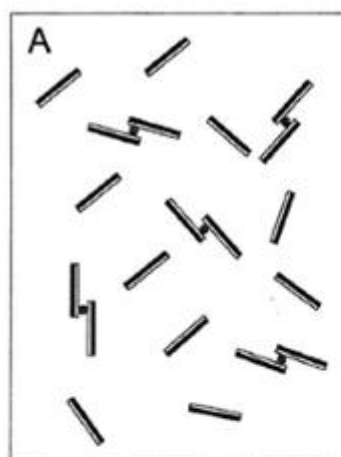
6100 Royalmount Avenue, Suite D-101, Montréal, Québec H4P 2R2, Canada

(72) VAILLANT, Andrew (CA); BAZINET, Michel (CA).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHỨC CHẤT OLIGONUCLEOTIT CHELAT, DƯỢC PHẨM CHỨA PHỨC CHẤT VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ PHỨC CHẤT NÀY

(57) Sáng chế bộc lộ sự chelat hóa hoạt tính rộng các cation kim loại hoá trị 2+ khác nhau bởi oligonucleotit (ON) bất kỳ, không tính đến kích thước hoặc sự cải biến. Tác dụng chelat hóa này là đặc hiệu với các cation có hoá trị hai (hoặc hoá trị cao hơn) và dẫn đến sự tạo thành phức chất oligonucleotit chelat mà không có đặc tính giống muối. Sáng chế đề xuất chế phẩm của phức chất ON chelat được điều chế sử dụng ON bất kỳ và cation kim loại hoá trị hai và các phương pháp ức chế tác dụng chống đông và hoặc phản ứng tại vị trí tiêm dưới da và hoặc khả năng dung nạp oligonucleotit được cải thiện bởi việc sử dụng phức chất ON chelat trong khi sử dụng oligonucleotit.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phức chất oligonucleotit chelat, chế phẩm của chúng và các phương pháp tạo chế phẩm oligonucleotit (ON) ở dạng phức chất chelat.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Muối là hợp chất ion thu được từ sự tương tác (phản ứng trung hoà) giữa axit và bazơ. Muối bao gồm cation và anion mà tương tác với nhau sao cho trạng thái trung hòa điện được duy trì. Các anion có thể ở dạng vô cơ (như Cl^-) hoặc hữu cơ như axetat (CH_3COO^-). Dung dịch nước chứa muối hòa tan (chất điện phân) có khả năng dẫn điện do trạng thái phân ly của cặp anion và cation trong môi trường nước. Oligonucleotit là các polyanion và trước kia được cho là chỉ hoạt động dưới dạng muối khi các đối tác cation của chúng tồn tại trong dung dịch ở trạng thái phân ly.

Việc sử dụng ON cho người bệnh thường đi kèm một số tác dụng phụ phổ biến không liên quan tới sự có mặt của trình tự nucleotit. Các tác dụng phụ này bao gồm sự chống đông máu (tăng thời gian pro-thrombin hay thời gian PTT) (Kandmimlla và các đồng tác giả, 1998, Bioorgan. Med. Chem. Let., 8: 2103; Sheeban và các đồng tác giả, Blood, 1998, 92: 1617; Nicklin và các đồng tác giả, 1997, Nucleosides & Nucleotides, 16: 1145; Kwoh, 2008, Antisense Drug Tech. 2nd Ed., p374) và các phản ứng tại vị trí tiêm hay ISR (sự chai cứng, viêm, yếu và đau) khi sử dụng dưới da (Webb và các đồng tác giả, 1997, Lancet, 349: 9059; Schrieber và các đồng tác giả, 2001, Gastroenterol., 120: 1339; Seawell và các đồng tác giả, 2002, J. Pharmacol. Exp. Therap., 303: 1334; Kwoh, 2008, Antisense Drug Tech. 2nd Ed., p383; Raal và các đồng tác giả, 2010, Lancet, 375: 998). Tác dụng chống đông được cho là được điều tiết bởi sự tương tác không đặc hiệu trình tự với các protein của tầng kết đông. Vì các ON được cho thấy là có các tính chất kích thích miễn dịch (thông qua thụ thể giống Toll hoặc sự cảm ứng xytokin qua trung gian TLR), các ISR thường được quy cho là do yêu cầu sử dụng ON nồng độ cao ở lượng nhỏ (thường là 1cc) để tiêm dưới da (SC), mà được cho là dẫn đến sự viêm khu trú ở vị trí tiêm.

Với sự xuất hiện của liệu pháp dựa vào axit nucleic trong những năm gần đây, số lượng các hợp chất gốc ON trong phát triển lâm sàng đã tăng lên. Về mặt lịch sử, hầu hết các chế độ liều ON là sử dụng nhiều liều trong một tuần hoặc một liều đơn hàng tuần mà cần phải đưa vào qua đường ngoài đường tiêu hóa do tính sinh khả dụng qua đường miệng của ON kém. Vì việc truyền ON trong tĩnh mạch thường bị giới hạn về liều và tốc độ bởi tính phản ứng (sốt, run, yếu) và sẽ có đòi hỏi khắt khe về mặt vận chuyển trong trường hợp dùng liều mãn tính, ứng dụng lâm sàng gần đây hơn của các ON đã sử dụng con đường dưới da (SC). Điều này tạo ra tác dụng phụ của việc dùng liều toàn thân tối thiểu, nhưng thường đi kèm bởi các phản ứng tại vị trí tiêm gồm các mức độ nghiêm trọng khác nhau (như đã nêu trên đây) mà cũng làm hạn chế việc dùng liều có thể đạt được bằng đường dùng này.

Do vậy, sẽ là hữu dụng và mong muốn có chế phẩm ON mà làm giảm tính phản ứng khi sử dụng IV hoặc SC. Ngoài ra, mặc dù tác dụng chống đông từ việc sử dụng ON được xem là tối thiểu, sẽ là hữu dụng nếu làm trung hòa tác dụng phụ này của các ON để tạo ra giới hạn an toàn lớn hơn ở đối tượng là người và không phải là người.

Do đó, có nhu cầu về chế phẩm ON được cải thiện.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một mục đích của sáng chế là đề xuất phức chất oligonucleotit chelat gồm hai hoặc nhiều hơn hai oligonucleotit được liên kết bởi cation đa hóa trị.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm oligonucleotit để sử dụng dưới da, chế phẩm oligonucleotit này chứa phức chất oligonucleotit chelat như được nêu trong bản mô tả.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa phức chất oligonucleotit chelat hoặc chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả và chất mang.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp làm giảm rối loạn chức năng gan hoặc thận có liên quan đến việc sử dụng oligonucleotit ở đối tượng gồm bước cho đối tượng sử dụng oligonucleotit ở dạng phức chất chelat như được nêu trong bản mô tả này, chế phẩm oligonucleotit như được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm như được nêu trong bản mô tả.

Sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa, ức chế hoặc làm giảm chứng chống đông máu bởi ON bằng cách sử dụng ON dưới dạng phức chất chelat canxi hoặc phức chất chelat kim loại ON thích hợp khác, chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm được nêu trong bản mô tả.

Sáng chế còn mô tả phương pháp cải thiện khả năng dung nạp ON bất kỳ được đưa vào theo đường truyền IV bằng cách điều chế ON dưới dạng phức chất chelat canxi hoặc phức chất chelat kim loại ON thích hợp khác, chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm được nêu trong bản mô tả.

Sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa hoặc làm giảm các phản ứng tại vị trí tiêm bằng việc sử dụng ON ở dạng phức chất chelat canxi hoặc phức chất chelat kim loại ON thích hợp khác, chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm được nêu trong bản mô tả. Cụ thể là, ON được đưa vào qua đường dưới da.

Sáng chế mô tả phương pháp ngăn sự chelat hóa kim loại bằng ON bất kỳ được đưa vào theo đường bất kỳ gồm bước cung cấp ON dưới dạng phức chất chelat canxi hoặc phức chất chelat kim loại ON thích hợp khác, chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm được nêu trong bản mô tả.

Sáng chế mô tả phương pháp làm giảm chu kỳ bán rã trong huyết thanh của ON bất kỳ bằng cách sử dụng ON dưới dạng phức chất chelat canxi hoặc phức chất chelat kim loại ON thích hợp khác, chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm được nêu trong bản mô tả.

Sáng chế mô tả phương pháp làm giảm sự tương tác protein huyết thanh với ON bất kỳ bằng cách sử dụng ON dưới dạng phức chất chelat canxi hoặc phức chất kim loại chelat thích hợp khác, chế phẩm oligonucleotit như được nêu trong bản mô tả này, hoặc được phẩm như được nêu trong bản mô tả. Cụ thể là, phức chất oligonucleotit chelat, chế phẩm hoặc chế phẩm được đưa vào theo đường truyền IV cho đối tượng.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm oligonucleotit trong đó nguồn cation kim loại hoá trị hai từ kim loại bất kỳ trong danh sách dưới đây được cung cấp oligonucleotit dưới dạng phức chất chelat ON ở thời điểm sử dụng oligonucleotit: canxi, magiê, coban, sắt,

mangan, bari, niken, đồng, và/hoặc kẽm. Do đó, sáng chế mô tả chế phẩm oligonucleotit chứa canxi; chế phẩm oligonucleotit chứa magiê; chế phẩm oligonucleotit chứa coban; chế phẩm oligonucleotit chứa sắt (2+); chế phẩm oligonucleotit chứa mangan; chế phẩm oligonucleotit chứa đồng; chế phẩm oligonucleotit chứa kẽm.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phức chất chelat kim loại ON sử dụng cation bất kỳ trong số các cation kim loại sau đây, riêng rẽ hoặc kết hợp: canxi, magiê, coban, sắt, mangan, bari, niken, đồng, và/hoặc kẽm.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều chế phức chất oligonucleotit chelat như được nêu trong bản mô tả này, chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm được nêu trong bản mô tả, phương pháp này bao gồm bước hòa tan muối natri oligonucleotit bất kỳ trong tá dược chứa nước được dụng, và bổ sung từ từ dung dịch muối kim loại hoá trị hai vào oligonucleotit hòa tan sao cho phức chất oligonucleotit chelat vẫn tan.

Sáng chế đề xuất phương pháp chelat hóa các cation kim loại hoá trị hai sau đây ở đối tượng sử dụng muối natri oligonucleotit: canxi, magiê, coban, sắt, mangan, bari, niken, đồng, kẽm, cadimi, thủy ngân, chì, berili, stronti, radi, và/hoặc kim loại khác bất kỳ, kim loại chuyển tiếp, kim loại sau chuyển tiếp, nguyên tố dãy lantanit hoặc actinit có khả năng tồn tại ở trạng thái điện tích 2+ hoặc 3+.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp cải thiện độ ổn định của ON bất kỳ trong dung dịch bằng cách điều chế ON dưới dạng phức chất chelat canxi hoặc phức chất chelat kim loại ON thích hợp khác, chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm được nêu trong bản mô tả. Cụ thể, sáng chế bộc lộ phương pháp làm ổn định oligonucleotit trong dung dịch nước.

Theo sáng chế, được bao gồm là cation đa hóa trị là cation có hoá trị hai.

Theo sáng chế, được bao gồm là cation có hoá trị hai là kim loại kiềm thổ có trạng thái điện tích 2+.

Theo sáng chế, được bao gồm là cation có hoá trị hai là kim loại chuyển tiếp hoặc sau chuyển tiếp có trạng thái điện tích 2+.

Theo sáng chế, được bao gồm là cation có hoá trị hai là kim loại lantanoit có trạng thái điện tích 2+.

Theo sáng chế, được bao gồm là cation có hoá trị hai là kim loại actinit có trạng thái điện tích 2+.

Cation có hoá trị hai có thể là, riêng rẽ hoặc ở dạng kết hợp: canxi, magiê, coban, sắt, mangan, bari, niken, đồng, và/hoặc kẽm.

Cụ thể là, phức chất chelat được nêu trong bản mô tả có thể gồm hai hoặc nhiều hơn hai cation kim loại có hoá trị hai khác nhau.

Theo phương án khác, phức chất chelat gồm ít nhất một oligonucleotit sợi kép.

Theo phương án khác, phức chất chelat gồm ít nhất một oligonucleotit với một liên kết phosphorothioat.

Phức chất chelat cũng có thể gồm ít nhất một oligonucleotit được phosphorothioat hóa hoàn toàn.

Phức chất chelat cũng có thể gồm ít nhất một oligonucleotit với một riboza được cải biến ở vị trí 2'.

Phức chất chelat cũng có thể gồm ít nhất một oligonucleotit mà có mỗi riboza được O-metyl hóa ở vị trí 2'.

Theo một phương án, phức chất chelat hoặc chế phẩm được làm cho phù hợp để sử dụng dưới da; được làm cho phù hợp với ít nhất một trong số các con đường sử dụng sau: trong mắt, ăn vào qua miệng, tan trong ruột, xông, tiêm qua da, tiêm trong cơ, tiêm trong màng bụng (IP), tiêm nội tủy mạc, truyền nội tủy mạc, trong khí quản, tiêm tĩnh mạch, truyền tĩnh mạch và khu trú. Cụ thể, sử dụng qua đường xông có thể là sol khí.

Còn được bao gồm là oligonucleotit có SEQ ID NO: 3 đến 14.

Còn được bao gồm là nồng độ oligonucleotit hòa tan nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100mg/ml trước khi bổ sung muối kim loại.

Cụ thể, tỷ lệ muối kim loại được thêm vào oligonucleotit hòa tan có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến 40mg muối hoá trị hai với mỗi 100mg oligonucleotit.

Còn được bao gồm là nồng độ cuối của oligonucleotit nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mg/ml.

Theo phương án khác, muối kim loại là ít nhất một trong số muối clorua, muối gluconat, muối xitrat, muối lactat, muối malat, muối aspartat, muối fumarat, muối ascorbat, muối benzoat, muối erythorbat và muối propionat.

Theo phương án khác, dung dịch muối kim loại chứa ít nhất một trong số canxi, magiê, coban, sắt (2+), mangan, đồng và/hoặc kẽm.

Còn được bao gồm là phức chất chelat mà là phức chất chelat canxi; phức chất chelat magiê; hoặc hỗn hợp phức chất chelat magiê/canxi.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng cation đa hóa trị như được nêu trong bản mô tả để sản xuất phức chất oligonucleotit chelat.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng phức chất oligonucleotit chelat như được nêu trong bản mô tả này, chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm được nêu trong bản mô tả để ngăn chặn hoặc giảm tác dụng chống đông của việc sử dụng oligonucleotit cho đối tượng.

Sáng chế mô tả việc sử dụng phức chất oligonucleotit chelat như được nêu trong bản mô tả này, chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm được nêu trong bản mô tả để ức chế hoặc làm giảm phản ứng tại vị trí tiêm dưới da ở đối tượng được cho sử dụng oligonucleotit theo đường dưới da.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng phức chất oligonucleotit chelat như được nêu trong bản mô tả này, chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm được nêu trong bản mô tả để cải thiện khả năng dung nạp của oligonucleotit ở đối tượng khi được dùng theo đường truyền IV.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng phức chất oligonucleotit chelat như được nêu trong bản mô tả này, chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm được nêu trong bản mô tả để làm giảm sự tương tác protein huyết thanh của oligonucleotit khi được dùng theo đường truyền IV cho đối tượng.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng phức chất oligonucleotit chelat như được nêu trong bản mô tả này, chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm được nêu trong bản mô tả để làm giảm chu kỳ bán rã trong huyết thanh của oligonucleotit ở đối tượng.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng phức chất oligonucleotit chelat như được nêu trong bản mô tả này, chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm được nêu trong bản mô tả để làm giảm rối loạn chức năng gan hoặc thận có liên quan đến việc sử dụng oligonucleotit ở đối tượng.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng phức chất oligonucleotit chelat như được nêu trong bản mô tả này, chế phẩm oligonucleotit được nêu trong bản mô tả, hoặc được phẩm được nêu trong bản mô tả để làm ổn định oligonucleotit trong dung dịch nước.

Thuật ngữ "chống đông" được nhằm để chỉ sự ức chế quá trình đông máu hoặc tạo thành cục máu đông thông thường.

Thuật ngữ "chelate hóa" được nhằm để chỉ việc cô lập hoặc loại bỏ ion đối (âm hoặc dương) ra khỏi phản ứng dung dịch tự do bằng phân tử khác có khả năng liên kết với ion đối, tạo thành phức chất chelat hóa.

Thuật ngữ "cation kim loại hóa trị hai" được nhằm để chỉ cation kim loại bất kỳ có thể tồn tại trong tự nhiên ở trạng thái điện tích $2+$ và bao gồm kim loại kiềm thổ (các nguyên tố nhóm 2 theo bảng danh pháp IUPAC), kim loại chuyển tiếp, kim loại sau chuyển tiếp, á kim hoặc nguyên tố họ lanthan.

Thuật ngữ "cation kim loại hóa trị ba" được nhằm để chỉ cation kim loại bất kỳ tồn tại trong tự nhiên ở trạng thái điện tích $3+$ và bao gồm kim loại chuyển tiếp, kim loại sau chuyển tiếp, á kim, nguyên tố họ lanthan hoặc nguyên tố họ actini.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sau đây, sự tham khảo sẽ được thực hiện với các hình vẽ đi kèm:

Fig. 1 là hình minh họa các đặc điểm hóa lý thông thường của ON. A) Sự đồng phân tách REP 2006 và 21 mer phosphorothioat ON với trình tự xác định bằng sắc ký

lông hiệu năng cao. B) Xác định kiểu trong 21 mer ON bằng phổ khối lượng. C) Xác định kiểu trong REP 2006 ON bằng phổ khối lượng.

Fig. 2 là hình minh họa sự tạo thành phức chất ON-chelat canxi bằng phosphorothioat ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang: A) gồm các kích thước khác nhau 6mer (REP 2032-FL), 10mer (REP 2003-FL), 20mer (REP 2004-FL), 40mer (REP 2006-FL) và B) của ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang sử dụng quá trình phosphorothioat hóa (REP 2006-FL), phosphorothioat hóa + 2' O methyriboza (REP 2107-FL) hoặc 2' O metylriboza (REP 2086-FL) và các trình tự khác nhau (poly C -REP 2031 -FL; SEQ ID NO:4). Bản chất không phụ thuộc trình tự của sự tạo thành phức chất chelat ON được chứng minh bằng cách sử dụng các oligonucleotit thoái hóa mà cũng được chứng minh sử dụng oligonucleotit đặc hiệu trình tự (REP 2031; SEQ ID NO:4). Sự tạo thành phức chất ON-chelat canxi được chứng minh bằng cách kết hợp các nồng độ tăng dần của canxi clorua loại ACS với oligonucleotit được đánh dấu FITC trong dung dịch và kiểm soát quá trình tạo thành phức chất oligonucleotit chelat bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang như được mô tả trong Ví dụ 1. Các giá trị là giá trị trung bình +/- độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 3 là hình minh họa sự tạo thành phức chất ON-chelat magiê bởi phosphorothioat ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang: A) gồm các kích thước khác nhau 6mer (REP 2032-FL), 10mer (REP 2003-FL), 20mer (REP 2004-FL), 40mer (REP 2006-FL) và B) của ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang sử dụng quá trình phosphorothioat hóa (REP 2006-FL), phosphorothioat hóa + 2' O methyriboza (REP 2107-FL) hoặc 2' O metylriboza (REP 2086-FL) và các trình tự khác nhau (poly C -REP 2031 -FL; SEQ ID NO:4). Bản chất không phụ thuộc trình tự của sự tạo thành phức chất ON chelat được chứng minh bằng cách sử dụng oligonucleotit thoái hóa mà cũng được chứng minh sử dụng oligonucleotit đặc hiệu trình tự (REP 2031; SEQ ID NO:4). Sự tạo thành phức chất ON-chelat magiê đã được chứng minh bằng cách kết hợp các nồng độ tăng dần của magiê clorua loại ACS với oligonucleotit được đánh dấu FITC trong dung dịch và kiểm soát quá trình tạo thành phức chất oligonucleotit chelat bởi sự tăng độ phân

cực huỳnh quang như được nêu trong Ví dụ 1. Các giá trị là giá trị trung bình +/- độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 4 là hình minh họa sự tạo thành phức chất ON-chelat coban bởi phosphorothioat ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang: A) gồm các kích thước khác nhau 6mer (REP 2032-FL), 10mer (REP 2003-FL), 20mer (REP 2004-FL), 40mer (REP 2006-FL) và B) của ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang sử dụng quá trình phosphorothioat hóa (REP 2006-FL), phosphorothioat hóa + 2' O methyriboza (REP 2107-FL) hoặc 2' O metylriboza (REP 2086-FL) và các trình tự khác nhau (poly C -REP 2031 -FL; SEQ ID NO:4). Bản chất không phụ thuộc trình tự của sự tạo thành phức chất ON chelat được chứng minh bằng cách sử dụng oligonucleotit thoái hóa mà cũng được chứng minh sử dụng oligonucleotit đặc hiệu trình tự (REP 2031; SEQ ID NO:4). Sự tạo thành phức chất ON-chelat coban đã được chứng minh bằng cách kết hợp các nồng độ tăng dần của coban clorua loại ACS với oligonucleotit được đánh dấu FITC trong dung dịch và kiểm soát quá trình tạo thành phức chất oligonucleotit chelat bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang như được nêu trong Ví dụ 1. Các giá trị là giá trị trung bình +/- độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 5 là hình minh họa sự tạo thành phức chất ON-chelat sắt bởi phosphorothioat ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang: A) gồm các kích thước khác nhau 6mer (REP 2032-FL), 10mer (REP 2003-FL), 20mer (REP 2004-FL), 40mer (REP 2006-FL) và B) của ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang sử dụng quá trình phosphorothioat hóa (REP 2006-FL), phosphorothioat hóa + 2' O methyriboza (REP 2107-FL) hoặc 2' O metylriboza (REP 2086-FL) và các trình tự khác nhau (poly C -REP 2031 -FL; SEQ ID NO:4). Bản chất không phụ thuộc trình tự của sự tạo thành phức chất ON chelat được chứng minh bằng cách sử dụng oligonucleotit thoái hóa mà cũng được chứng minh sử dụng oligonucleotit đặc hiệu trình tự (REP 2031; SEQ ID NO 4). Sự tạo thành phức chất ON-chelat sắt đã được chứng minh bằng cách kết hợp các nồng độ tăng dần của sắt clorua loại ACS với oligonucleotit được đánh dấu FITC trong dung dịch và kiểm soát quá trình tạo thành phức chất oligonucleotit chelat bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang như được nêu trong Ví dụ 1. Các giá trị là giá trị trung bình +/- độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 6 là hình minh họa sự tạo thành phức chất ON-chelat mangan bởi phosphorothioat ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang: A) gồm các kích thước khác nhau 6mer (REP 2032-FL), 10mer (REP 2003-FL), 20mer (REP 2004-FL), 40mer (REP 2006-FL) và B) của ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang sử dụng quá trình phosphorothioat hóa (REP 2006-FL), phosphorothioat hóa + 2' O methyriboza (REP 2107-FL) hoặc 2' O metylriboza (REP 2086-FL) và các trình tự khác nhau (poly C -REP 2031 -FL; SEQ ID NO:4). Bản chất không phụ thuộc trình tự của sự tạo thành phức chất ON chelat được chứng minh bằng cách sử dụng oligonucleotit thoái hóa mà cũng được chứng minh sử dụng oligonucleotit đặc hiệu trình tự (REP 2031; SEQ ID NO:4). Sự tạo thành phức chất ON-chelat mangan đã được chứng minh bằng cách kết hợp các nồng độ tăng dần của mangan clorua loại ACS với oligonucleotit được đánh dấu FITC trong dung dịch và kiểm soát quá trình tạo thành phức chất oligonucleotit chelat bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang như được nêu trong Ví dụ 1. Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 7 là hình minh họa sự tạo thành của phức chất ON-chelat bari bởi phosphorothioat ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang: A) gồm các kích thước khác nhau 6mer (REP 2032-FL), 10mer (REP 2003-FL), 20mer (REP 2004-FL), 40mer (REP 2006-FL) và B) of ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang sử dụng quá trình phosphorothioat (REP 2006-FL), phosphorothioat hóa + 2' O methyriboza (REP 2107-FL) hoặc 2' O metylriboza (REP 2086-FL) và các trình tự khác nhau (poly C -REP 2031 -FL; SEQ ID N:4). Bản chất không phụ thuộc trình tự của sự tạo thành phức chất ON chelat được chứng minh bằng cách sử dụng oligonucleotit thoái hóa mà cũng được chứng minh sử dụng oligonucleotit đặc hiệu trình tự (REP 2031; SEQ ID NO:4). Sự tạo thành của phức chất ON-chelat bari đã được chứng minh bằng cách kết hợp các nồng độ tăng dần của bari clorua loại ACS với oligonucleotit được đánh dấu FITC trong dung dịch và kiểm soát quá trình tạo thành phức chất oligonucleotit chelat bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang như được nêu trong Ví dụ 1. Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 8 là hình minh họa sự tạo thành của phức chất ON-chelat niken bởi phosphorothioat ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang: A) gồm các kích thước khác nhau 6mer (REP 2032-FL), 10mer (REP 2003-FL), 20mer (REP 2004-FL), 40mer (REP 2006-FL) và B) của ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang sử dụng quá trình phosphorothioat hóa (REP 2006-FL), phosphorothioat hóa + 2' O methyriboza (REP 2107-FL) hoặc 2' O metylriboza (REP 2086-FL) và các trình tự khác nhau (poly C -REP 2031 -FL; SEQ ID NO:4). Bản chất không phụ thuộc trình tự của sự tạo thành phức chất ON chelat được chứng minh bằng cách sử dụng oligonucleotit thoái hóa mà cũng được chứng minh sử dụng oligonucleotit đặc hiệu trình tự (REP 2031; SEQ ID NO:4). Sự tạo thành phức chất ON-chelat niken đã được chứng minh bằng cách kết hợp các nồng độ tăng dần của niken clorua loại ACS với oligonucleotit được đánh dấu FITC trong dung dịch và sự kiểm soát quá trình tạo thành phức chất oligonucleotit chelat bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang như được nêu trong Ví dụ 1. Các giá trị là giá trị trung bình +/- độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 9 là hình minh họa sự tạo thành của phức chất ON-chelat đồng bởi phosphorothioat ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang: A) gồm các kích thước khác nhau 6mer (REP 2032-FL), 10mer (REP 2003-FL), 20mer (REP 2004-FL), 40mer (REP 2006-FL) và B) của ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang sử dụng quá trình phosphorothioat hóa (REP 2006-FL), phosphorothioat hóa + 2' O methyriboza (REP 2107-FL) hoặc 2' O metylriboza (REP 2086-FL) và các trình tự khác nhau (poly C -REP 2031 -FL; SEQ ID NO:4). Bản chất không phụ thuộc trình tự của sự tạo thành phức chất ON chelat được chứng minh bằng cách sử dụng oligonucleotit thoái hóa mà cũng được chứng minh sử dụng oligonucleotit đặc hiệu trình tự (REP 2031; SEQ ID NO:4). Sự tạo thành phức chất ON-chelat đồng đã được chứng minh bằng cách kết hợp các nồng độ tăng dần của đồng clorua loại ACS với oligonucleotit được đánh dấu FITC trong dung dịch và kiểm soát quá trình tạo thành phức chất oligonucleotit chelat bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang như được nêu trong Ví dụ 1. Các giá trị là giá trị trung bình +/- độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 10 là hình minh họa sự tạo thành của phức chất ON-chelat kẽm bởi phosphorothioat ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang: A) gồm các kích thước khác nhau 6mer (REP 2032-FL), 10mer (REP 2003-FL), 20mer (REP 2004-FL), 40mer (REP 2006-FL) và B) của ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang sử dụng quá trình phosphorothioat hóa (REP 2006-FL), phosphorothioat hóa + 2' O methyriboza (REP 2107-FL) hoặc 2' O metylriboza (REP 2086-FL) và các trình tự khác nhau (poly C -REP 2031 -FL; SEQ ID NO:4). Bản chất không phụ thuộc trình tự của sự tạo thành phức chất ON chelat được chứng minh bằng cách sử dụng oligonucleotit thoái hóa mà cũng được chứng minh sử dụng oligonucleotit đặc hiệu trình tự (REP 2031; SEQ ID NO:4). Sự tạo thành phức chất ON-chelat kẽm đã được chứng minh bằng cách kết hợp các nồng độ tăng dần của kẽm clorua loại ACS với oligonucleotit được đánh dấu FITC trong dung dịch và kiểm soát quá trình tạo thành phức chất oligonucleotit chelat bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang như được nêu trong Ví dụ 1. Các giá trị là giá trị trung bình +/- độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 11 là hình minh họa sự tạo thành của phức chất ON-chelat cadimi bởi phosphorothioat ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang: A) gồm các kích thước khác nhau 6mer (REP 2032-FL), 10mer (REP 2003-FL), 20mer (REP 2004-FL), 40mer (REP 2006-FL) và B) của ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang sử dụng quá trình phosphorothioat hóa (REP 2006-FL), phosphorothioat hóa + 2' O methyriboza (REP 2 07-FL) hoặc 2' O metylriboza (REP 2086-FL) và các trình tự khác nhau (poly C -REP 203 -FL; SEQ ID NO:4). Bản chất không phụ thuộc trình tự của sự tạo thành phức chất ON chelat được chứng minh bằng cách sử dụng oligonucleotit thoái hóa mà cũng được chứng minh sử dụng oligonucleotit đặc hiệu trình tự (REP 2031; SEQ ID NO:4). Sự tạo thành phức chất ON-chelat cadimi đã được chứng minh bằng cách kết hợp các nồng độ tăng dần của cadimi clorua loại ACS với oligonucleotit được đánh dấu FITC trong dung dịch và kiểm soát quá trình tạo thành phức chất oligonucleotit chelat bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang như được nêu trong Ví dụ 1. Các giá trị là giá trị trung bình +/- độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 12 là hình minh họa sự tạo thành của phức chất ON-chelat thủy ngân bởi phosphorothioat ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang: A) gồm các kích thước khác nhau 6mer (REP 2032-FL), 10mer (REP 2003-FL), 20mer (REP 2004-FL), 40mer (REP 2006-FL) và B) của ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang sử dụng quá trình phosphorothioat hóa (REP 2006-FL), phosphorothioat hóa + 2" O methyriboza (REP 2107-FL) hoặc 2' O metylriboza (REP 2086-FL) và các trình tự khác nhau (poly C -REP 2031 -FL; SEQ ID NO:4). Bản chất không phụ thuộc trình tự của sự tạo thành phức chất ON chelat được chứng minh bằng cách sử dụng oligonucleotit thoái hóa mà cũng được chứng minh sử dụng oligonucleotit đặc hiệu trình tự (REP 2031; SEQ ID NO:4). Sự tạo thành phức chất ON-chelat thủy ngân đã được chứng minh bằng cách kết hợp các nồng độ tăng dần của thủy ngân clorua loại ACS với oligonucleotit được đánh dấu FITC trong dung dịch và kiểm soát quá trình tạo thành phức chất oligonucleotit chelat bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang như được nêu trong Ví dụ 1. Các giá trị là giá trị trung bình +/- độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 13 là hình minh họa sự tạo thành của phức chất ON-chelat chì bởi phosphorothioat ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang: A) gồm các kích thước khác nhau 6mer (REP 2032-FL), 10mer (REP 2003-FL), 20mer (REP 2004-FL), 40mer (REP 2006-FL) và B) của ON thoái hóa được đánh dấu huỳnh quang sử dụng quá trình phosphorothioat hóa (REP 2006-FL), phosphorothioat hóa + 2' O methyriboza (REP 2 07-FL) hoặc 2' O metylriboza (REP 2086-FL) và các trình tự khác nhau (poly C -REP 2031 -FL; SEQ ID NO:4). Bản chất không phụ thuộc trình tự của sự tạo thành phức chất ON chelat được chứng minh bằng cách sử dụng oligonucleotit thoái hóa mà cũng được chứng minh sử dụng oligonucleotit đặc hiệu trình tự (REP 2031; SEQ ID NO:4). Sự tạo thành phức chất ON-chelat chì được chứng minh bằng cách kết hợp các nồng độ tăng dần của chì clorua loại ACS với oligonucleotit được đánh dấu FITC trong dung dịch và kiểm soát quá trình tạo thành phức chất oligonucleotit chelat bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang như được nêu trong Ví dụ 1. Các giá trị là giá trị trung bình +/- độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 14A là hình minh họa các đặc điểm hóa học chung của ON mà không phụ thuộc vào trình tự ON. Không quan tâm đến trình tự, ON bất kỳ tồn tại dưới dạng polyme có cả hai hoạt tính kỵ nước và ưa nước. Sự phosphorothioat hóa (được biểu thị trong cấu trúc hóa học trên Fig này) có vai trò làm tăng tính kỵ nước của polyme ON mà không ảnh hưởng đến mức độ ưa nước. Fig. 14B đưa ra khái niệm bản chất của sự oligonucleotit chelat hóa các cation kim loại hoá trị hai và hóa trị ba. Các cation kim loại (được biểu diễn bởi hình tròn đặc màu xám) liên kết các bề mặt ưa nước của polyme ON qua cầu ion kim loại (được biểu diễn bởi hình elip) giữa hai hoặc ba nguyên tử oxy hoặc lưu huỳnh không bắc cầu trong các liên kết phosphodiester.

Fig. 15 là hình minh họa mẫu đặc tính dung dịch của ON trong điều kiện có mặt các cation kim loại hoá trị hai ở các nồng độ ON và cation kim loại hoá trị hai khác nhau. A) Nồng độ cation kim loại hoá trị hai/hóa trị ba thấp, nồng độ ON thấp tạo ra các dime hoặc phức chất ON chelat bậc thấp. B) Nồng độ cation kim loại hoá trị hai/hóa trị ba tăng dần tạo ra sự tạo thành phức chất ON chelat hoàn toàn hơn trong dung dịch. C) Nồng độ ON tăng thêm trong điều kiện có mặt kim loại hoá trị hai hoặc hóa trị ba có khả năng tạo ra phức chất ON chelat bậc cao hơn với nồng độ kim loại tăng. Tất cả các phức chất chelat từ (A) đến (C) đều tan được trong dung dịch nước do có các bề mặt ưa nước vẫn được tiếp xúc với môi trường nước do đó duy trì tính hòa tan. D) Ở nồng độ ON và kim loại đủ, tất cả các bề mặt ưa nước bị nhốt bên trong phức chất ON chelat, chỉ để lại các bề mặt kỵ nước được tiếp xúc với môi trường nước. Điều này dẫn đến sự kết tủa của phức chất ON chelat.

Fig. 16 là hình minh họa ảnh hưởng của đặc tính dung dịch của phức chất ON chelat huỳnh quang đến độ phân cực huỳnh quang. Với nồng độ kim loại tăng dần, kích thước (và khối lượng) của sự tạo thành phức chất ON chelat cũng tăng (xem Fig. 15) và do đó các xáo trộn chậm hơn trong dung dịch. Phức chất xáo trộn chậm hơn trong dung dịch này dẫn đến độ phân cực huỳnh quang tăng và giá trị mP tăng.

Fig. 17 là hình thể hiện sự tạo thành phức chất ON chelat với canxi clorua hoặc canxi sulfat như đo được bằng độ phân cực huỳnh quang. A) Sự tạo thành phức chất ON chelat với REP 2055-FL (SEQ ID NO:6) và REP 2056-FL (SEQ ID NO:7). B) Sự tạo

thành phức chất ON chelat với REP 2033-FL (SEQ ID NO:5) và REP 2029-FL (SEQ ID NO:2). Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 18 là hình thể hiện sự tạo thành phức chất ON chelat với canxi clorua hoặc canxi sulfat như đo được bằng độ phân cực huỳnh quang. A) Không có sự tạo thành của phức chất ON chelat với REP 2028-FL và sự tạo thành phức chất ON chelat với REP 2057-FL (SEQ ID NO:8). B) Sự tạo thành phức chất ON chelat với REP 2120-FL và REP 2030-FL. Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 19 là hình thể hiện sự tạo thành phức chất ON chelat với canxi clorua hoặc canxi sulfat như đo được bằng độ phân cực huỳnh quang. A) Sự tạo thành phức chất ON chelat với REP 2129-FL (SEQ ID NO:12) và REP 2126-FL (SEQ ID NO:9). B) Sự tạo thành phức chất ON chelat với REP 2128-FL (SEQ ID NO:11) và REP 2127-FL (SEQ ID NO: 10). Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 20 là hình thể hiện sự tạo thành ON phức chất chelat với canxi clorua hoặc canxi sulfat như đo được bằng độ phân cực huỳnh quang. A) ON chelat với REP 2139-FL (SEQ ID NO:13) và REP 2006-FL. B) Sự tạo thành phức chất ON chelat với REP 2045-FL và REP 2007-FL. Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 21 là hình thể hiện sự tạo thành phức chất ON chelat với magiê clorua hoặc magiê sulfat như đo được bằng độ phân cực huỳnh quang. A) Sự tạo thành phức chất ON chelat với REP 2055-FL (SEQ ID NO:6) và REP 2056-FL (SEQ ID NO:7). B) Sự tạo thành phức chất ON chelat với REP 2033-FL (SEQ ID NO:5) và REP 2029-FL (SEQ ID NO: 2). Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 22 là hình thể hiện sự tạo thành phức chất ON chelat với magiê clorua hoặc magiê sulfat như đo được bằng độ phân cực huỳnh quang. A) Không có sự tạo thành của phức chất ON chelat với REP 2028-FL (SEQ ID NO:1 1) và sự tạo thành phức chất ON chelat REP 2057-FL (SEQ ID NO:8). B) Sự tạo thành phức chất ON chelat với REP 2120-FL và REP 2030-FL (SEQ ID NO:3). Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn của từ hai lần đo.

Fig. 23 là hình thể hiện sự tạo thành phức chất ON chelat với magiê clorua hoặc magiê sulfat như đo được bằng độ phân cực huỳnh quang. A) Sự tạo thành phức chất ON chelat với REP 2129-FL (SEQ ID NO: 12) và REP 2126-FL (SEQ ID NO:9). B) Sự tạo thành ON phức chất chelat với REP 2128-FL (SEQ ID NO:11) và REP 2127-FL (SEQ ID NO:10). Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 24 là hình thể hiện sự tạo thành phức chất ON chelat với magiê clorua hoặc magiê sulfat như đo được bằng độ phân cực huỳnh quang. A) ON chelat với REP 2139-FL (SEQ ID NO: 13) và REP 2006-FL. B) Sự tạo thành phức chất ON chelat với REP 2045-FL và REP 2007-FL. Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn từ hai lần đo.

Fig. 25 là hình thể hiện sự tạo thành của hai phức chất ON chelat sợi đôi khác nhau trong điều kiện có mặt canxi clorua hoặc magiê clorua như đo được bằng độ phân cực huỳnh quang. ON sợi đôi được điều chế bằng quá trình lai giữa REP 2055-FL (SEQ ID NO:6) với REP 2033-FL (SEQ ID NO:5) và REP 2057-FL (SEQ ID NO:8) với REP 2056-FL (SEQ ID NO:7). Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn của từ ba lần đo.

Fig. 26 là hình thể hiện sự tạo thành của các phức chất ON chelat khác nhau chỉ trong điều kiện có mặt cation kim loại hóa trị hai (Mg^{2+} và **Ca** $^{2+}$) và không phải trong điều kiện có mặt cation hóa trị một (Na^+ , K^+ hoặc NH_4^+). Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn từ ba lần đo.

Fig. 27 là hình thể hiện tác dụng chống đông của việc bổ sung các nồng độ khác nhau của ON có các kích thước khác nhau (REP 2004, REP 2006) và các hóa chất khác nhau (REP 2006, REP 2107) đối với máu của người. Cách thức tương tác không phụ thuộc trình tự này được chứng minh bằng cách sử dụng oligonucleotit thoái hóa (REP 2004, REP 2006, REP 2107) mà cũng được chứng minh bằng cách sử dụng oligonucleotit đặc hiệu trình tự (REP 2031; SEQ ID NO:4). Sự chống đông máu trong điều kiện có mặt các hợp chất này được theo dõi bằng cách đo thời gian pro-thrombin (PTT) và so sánh nó với PTT trong điều kiện có mặt nước muối thông thường trong máu sử dụng phương pháp thử nghiệm trong phòng thí nghiệm lâm sàng được chấp nhận. Tỷ lệ PTT khi có mặt và

không có mặt thuốc tạo ra tỷ lệ chuẩn (NR). NR bằng 1 tức là hoạt tính đông máu là bình thường và NR lớn hơn 1 tức là hoạt tính đông máu bị suy giảm (chống đông).

Fig. 28 là hình thể hiện sự ức chế tác dụng chống đông của oligonucleotit bằng cách bổ sung CaCl_2 . REP 2055 (40mer phosphorothioat với trình tự $(\text{AC})_{20}$; SEQ ID NO:6) được thêm vào máu ở 2,5mM, là nồng độ gây ra tác dụng chống đông máu đáng kể. REP 2055 được kết hợp với hỗn hợp khác nhau của CaCl_2 và tác dụng của mỗi nồng độ bổ sung của CaCl_2 thêm vào được xác định sử dụng phương pháp thử nghiệm trong phòng thí nghiệm lâm sàng được chấp nhận. Sự chống đông máu trong điều kiện có mặt các hợp chất này được theo dõi bằng cách đo thời gian prothrombin (PTT) và so sánh nó với PTT trong điều kiện có mặt nước muối thông thường trong máu sử dụng phương pháp thử nghiệm được chấp nhận. Tỷ lệ PTT khi có mặt và không có mặt thuốc tạo ra tỷ lệ chuẩn (NR). NR bằng 1 tức là hoạt tính đông máu là bình thường và NR lớn hơn 1 tức là hoạt tính đông máu bị suy giảm (chống đông).

Fig. 29 là hình thể hiện tác dụng chelat hóa canxi của việc điều trị ON thường xuyên đến tổng canxi huyết thanh ở bệnh nhân mắc bệnh gan mãn tính. Bệnh nhân không tiếp nhận sự bổ sung khoáng chất được thể hiện ở (A) và bệnh nhân tiếp nhận sự bổ sung trong khi đang điều trị ON được thể hiện ở (B).

Mô tả chi tiết sáng chế

Được nêu ra trong bản mô tả này là sự chứng minh rằng các ON chelat hóa các cation kim loại hoá trị hai khác nhau bao gồm canxi, magiê, coban, sắt, mangan, bari, niken, đồng, kẽm, cadimi, thủy ngân và chì. Còn được chứng minh thêm rằng sự chelat hóa các cation hoá trị hai này dẫn đến sự tạo thành của phức chất ON chelat gồm hai hoặc nhiều hơn hai ON được liên kết qua các cation kim loại và xảy ra như được lấy ví dụ, nhưng không giới hạn ở, các ON có chiều dài từ 6 đến 80 nucleotit, và trong điều kiện có mặt phosphodiester hoặc phosphorothioat oligonucleotit. Sự chelat hóa cũng xảy ra với các oligonucleotit chứa các biến đổi ở vị trí 2' ở ribosa hoặc không. Hơn nữa, sự chelat hóa các cation kim loại là không phụ thuộc vào trình tự nucleotit có mặt mà thay vào đó lại dựa vào các đặc điểm hóa lý thông thường với tất cả các oligonucleotit (xem Fig. 14A).

Sáng chế bộc lộ việc phát hiện ra rằng các oligonucleotit trong dung dịch nước chứa cation kim loại đơn bất kỳ có hoá trị hai (như ví dụ, nhưng không giới hạn ở, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}) không tồn tại dưới dạng muối mà dưới dạng phức chất chelat hóa của ON. Các phức chất này gồm các đime oligonucleotit hoặc các tổ chức phân tử bậc cao hơn trong đó ON được liên kết ở mạch chính phosphodiester của chúng qua cầu ion kim loại hoá trị hai (xem Fig. 14B). Ở nồng độ ON và cation kim loại cụ thể, các phức chất được chelat hóa này là ổn định và tan được trong dung dịch nước và tách một cách hiệu quả cation hoá trị hai bất kỳ trong phức chất ON chelat khỏi tương tác dung dịch. Sự tạo thành phức chất chelat này cũng có thể xảy ra với cation kim loại đơn có điện tích 3+ hoặc cao hơn (như được mô tả trên Fig. 14B). Do đó, các ON đóng vai trò là chất chelat hóa cation hoá trị hai và không tạo thành muối với cation hoá trị hai.

Quan trọng là, sự tạo thành của phức chất oligonucleotit chelat không xảy ra với cation hóa trị một như Na^+ , K^+ hoặc NH_4^+ và do đó không thể xảy ra với cation hóa trị một bất kỳ. Như vậy, thuật ngữ "muối oligonucleotit" bị giới hạn cụ thể chỉ ở các muối oligonucleotit với cation hóa trị một hoặc với cation mà không tạo thành phức chất chelat với oligonucleotit và được sử dụng không chính xác để mô tả oligonucleotit tồn tại ở dạng dung dịch hoặc dạng bột với cation kim loại hoá trị hai (hoặc thậm chí là cation kim loại hóa trị ba).

Tiêu chuẩn trong tình trạng kỹ thuật nói rõ việc sử dụng ON chỉ dưới dạng muối natri. Điều này được lấy ví dụ bởi việc sử dụng nhiều oligonucleotit trong các thử nghiệm lâm sàng dưới dạng muối natri bao gồm Fomivirisen (ISIS 2922), Mipomersen (ISIS 301012), Trecovirsen (GEM 91), Custirsen (OGX-01 1 / ISIS 1 12989), Genasense (G3139) và Aprinocarsem (ISIS 3531 / LY 900003) (Geary và các đồng tác giả, 2002, Clin. Pharmacokinetics, 41: 255-260; Yu và các đồng tác giả, 2009, Clin. Pharmacokinetics, 48: 39-50; Sereni và các đồng tác giả, 1999, J. Clin. Pharmacol., 39: 47-54; Chi và các đồng tác giả, 2005, J. Nat. Cane. Inst., 97: 1287-1296; Marshall và các đồng tác giả, 2004, Ann. Oncol., 15: 1274-1283; Grossman và các đồng tác giả, 2004, Neuro-Oncol, 6: 32-40).

Sáng chế còn đưa ra chứng minh rằng sự chống đông máu bởi oligonucleotit được gây ra do sự chelat hóa canxi bởi oligonucleotit như được thể hiện bởi sự đảo ngược tác dụng chống đông được cảm ứng bởi oligonucleotit bằng cách khôi phục canxi tự do bình thường trong máu bằng cách bổ sung canxi clorua.

Sáng chế còn chứng minh rằng phản ứng tại vị trí tiêm quan sát được với các lần tiêm oligonucleotit dưới da (sự chai cứng, chứng viêm, yếu và đau) ít nhất một phần là do sự chelat hóa tại chỗ canxi và các cation hoá trị hai có thể khác như magiê ở vị trí tiêm bởi oligonucleotit như được thể hiện bởi tác dụng ức chế các phản ứng tại vị trí tiêm (ISR) khi tiêm ON được điều chế dưới dạng phức chất chelat canxi.

Độ phân cực huỳnh quang là phương pháp phổ biến được sử dụng để thử nghiệm các tương tác liên phân tử. Trong kỹ thuật này, môi (tức là ON bất kỳ) được đánh dấu thể phát huỳnh quang (ví dụ FITC). Trong dung dịch, phân tử môi xáo trộn tự do trong dung dịch do chuyển động Brownian dẫn đến sự phát huỳnh quang phân cực kém khi môi được đưa qua kích thích với bước sóng ánh sáng chính xác. Với phối tử có khối lượng phân tử đủ (ít nhất là cùng kích thước như môi), sự tương tác giữa môi và phối tử mở đầu sự ức chế cơ bản của sự xáo trộn phức chất trong dung dịch. Do đó, kết quả từ sự xáo trộn bị ức chế trong dung dịch là sự phát huỳnh quang trở nên bị phân cực đáng kể do kích thích. Do đó, với kỹ thuật này, các tương tác có thể được đo trong dung dịch mà không có ràng buộc vật lý trên đối tác liên kết còn lại. Độ phân cực huỳnh quang được báo cáo theo mP không thứ nguyên, mà tỷ lệ thuận với phần các phân tử môi được liên kết trong phản ứng. Ví dụ, nếu một phần rất nhỏ của phân tử môi được liên kết bởi phối tử cụ thể, sẽ có sự phân cực huỳnh quang rất nhỏ và do đó các giá trị mP là nhỏ. Ở đầu còn lại của phổ, nếu tỷ lệ lớn các phân tử môi được liên kết bởi phối tử cụ thể (hoặc với nồng độ phối tử cao hơn), sẽ có độ phân cực huỳnh quang đáng kể và do đó các giá trị mP là lớn. Theo cách này, các đường đẳng nhiệt liên kết đối với các tương tác môi-phối tử cụ thể có thể được tạo ra bằng cách thay đổi nồng độ của phối tử trong điều kiện có mật lượng cố định của môi được gắn thể huỳnh quang.

Trong bản mô tả, các ON được đánh dấu huỳnh quang khác nhau được sử dụng để kiểm tra sự tạo thành phức chất của chúng trong điều kiện có mặt cation hoá trị một và

hoá trị hai. Mặc dù việc giám sát sự tạo thành phức chất bằng độ phân cực huỳnh quang đòi hỏi các ON này phải được đánh dấu huỳnh quang, dấu này được cố định vào ON ở đầu 3' sao cho không can thiệp vào khung bazơ nitơ hoặc phosphodiester của ON đang nói đến. Hơn nữa, thẻ phát huỳnh quang được giữ cách xa ON bởi thành phần liên kết 3 cacbon cứng để ngăn sự nhiễu loạn bất kỳ của trạng thái ON bình thường trong dung dịch. Do đó, sự tạo thành phức chất ON bất kỳ được quan sát trong bản mô tả sử dụng độ phân cực huỳnh quang với ON được đánh dấu huỳnh quang đều là sự mô tả chính xác của trạng thái dung dịch của ON chưa được đánh dấu (dù là được tạo phức hay không).

Thuật ngữ oligonucleotit (ON) chỉ oligome hoặc polyme của axit ribonucleic (ARN) và/hoặc axit deoxyribonucleic (ADN) và/hoặc các chất tương tự của chúng. Thuật ngữ này gồm các oligonucleotit chứa nucleobazơ có trong tự nhiên, đường và các liên kết internucleosit cộng hóa trị (mạch chính) cũng như các oligonucleotit có các phần không có trong tự nhiên mà có chức năng tương tự. Các oligonucleotit được cải biến hoặc được thể thường được ưu tiên hơn các dạng tự nhiên do các tính chất mong muốn như, ví dụ, mức độ hấp thụ tế bào được tăng cường, ái lực đối với đích axit nucleic được tăng cường và độ ổn định trong điều kiện có mặt nucleaza tăng.

Trong đơn này, thuật ngữ "oligonucleotit thoái hóa" được nhằm để chỉ oligonucleotit sợi đơn có sự dao động (N) ở mọi vị trí, như NNNNNNNNNN. Mỗi bazơ được tổng hợp dưới dạng một dao động sao cho ON này thực sự tồn tại dưới dạng tập hợp các trình tự được tạo ra một cách ngẫu nhiên khác nhau có cùng chiều dài và các tính chất hóa lý. Ví dụ, với một ON thoái hóa 40 bazơ trong chiều dài, trình tự cụ thể bất kỳ trong tập hợp về mặt lý thuyết sẽ chỉ là $1/4^{40}$ hoặc $8,3 \times 10^{-25}$ của phần tổng. Mặc định là 1 mol = $6,022 \times 10^{23}$ phân tử, và thực tế là không có sự tổng hợp các chất thoái hóa nào vượt quá 2mmol cho đến nay, oligonucleotit bất kỳ với trình tự cụ thể có mặt một cách hiệu quả không tồn tại nhiều hơn một lần trong chế phẩm bất kỳ. Do đó, sự tạo thành phức chất bất kỳ quan sát được trong chế phẩm này cần phải là do các tính chất hóa lý không phụ thuộc trình tự (hoặc độc lập với trình tự) của oligonucleotit vì oligonucleotit cụ thể bất kỳ có trình tự xác định, là duy nhất trong chế phẩm, không thể được mong đợi là góp phần vào hoạt tính bất kỳ thu được từ trình tự nucleotit cụ thể của nó.

Minh họa thêm về khía cạnh này, Ví dụ I so sánh đặc điểm của REP 2006 (ON 40mer có trình tự phosphorothioat hóa thoái hóa) với 21 mer của trình tự xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao và phổ khối lượng và cho thấy rõ rằng ON bất kỳ với kích thước và biến đổi hóa học (tức là sự phosphorothioat hóa) tương tự sẽ có các tính chất hóa lý tương tự ở mức cao (nếu không phải là giống hệt) mà không bị ảnh hưởng bởi trình tự của nucleotit có mặt.

Oligonucleotit có thể bao gồm các cải biến khác nhau, ví dụ cải biến làm ổn định, và do đó có thể bao gồm ít nhất một cải biến trong liên kết phosphodiester và/hoặc ở đường, và/hoặc ở bazơ. Ví dụ, oligonucleotit có thể bao gồm, không giới hạn, một hoặc nhiều liên kết phosphorothioat, liên kết phosphorodithioat và/hoặc liên kết methylphosphonat. Các liên kết được cải biến tương thích về mặt hóa học khác nhau có thể được kết hợp, ví dụ các cải biến trong đó các điều kiện tổng hợp là phù hợp về mặt hóa học. Trong khi các liên kết được cải biến là hữu ích, các oligonucleotit có thể bao gồm liên kết phosphodiester trong đó các tính chất hóa lý chung của polyme oligonucleotit về cơ bản là không bị tác động. Các cải biến hữu ích khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các cải biến ở vị trí 2' của đường, như các cải biến 2'-O-alkyl như cải biến 2'-O-metyl, các cải biến 2'-amino, các cải biến 2'-halo như 2'-fluor; các chất tương tự nucleotit không vòng. Các cải biến khác cũng là đã biết trong lĩnh vực và có thể được sử dụng như axit nucleic bị chặn. Cụ thể, oligonucleotit này làm biến đổi các liên kết thông qua, ví dụ phosphorothioat; có mũ 3' và/hoặc 5'; bao gồm liên kết 3'-5' đầu tận; oligonucleotit này là hoặc bao gồm đoạn trùng lặp chứa hai hoặc nhiều hơn hai trình tự oligonucleotit được liên kết bởi (các) thành phần liên kết.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm ON được tính giúp ngăn tác dụng chống đông do oligonucleotit gây ra bằng cách sử dụng lượng hữu hiệu để trị liệu của phức chất oligonucleotit chelat được dụng như được nêu trong bản mô tả này được điều chế sử dụng bất kỳ trong số các cation kim loại sau: canxi, magiê, coban, mangan, sắt, đồng, và/hoặc kẽm. Phức chất ON chelat cũng có thể được điều chế sử dụng hai hoặc nhiều hơn hai cation khác nhau như được nêu trên đây. Cụ thể, được phẩm được chấp thuận để sử dụng cho người, hoặc động vật không phải người như động vật linh trưởng không phải người.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm ON được tính giúp ngăn ngừa phản ứng tại vị trí tiêm bằng việc sử dụng dưới da lượng hữu hiệu trị liệu của phức chất ON chelat được dụng như được nêu trong bản mô tả này được điều chế bằng cách sử dụng cation kim loại bất kỳ trong số các cation kim loại sau: canxi, magiê, coban, mangan, sắt, đồng, và/hoặc kẽm. Phức chất ON chelat cũng có thể được điều chế sử dụng hai hoặc nhiều hơn hai cation khác nhau như được nêu trên đây. Cụ thể, dược phẩm được chấp thuận để sử dụng cho người, hoặc động vật không phải người như động vật linh trưởng không phải người.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm ON được tính giúp cải thiện khả năng chịu phương pháp truyền IV chứa lượng hữu hiệu trị liệu của phức chất ON chelat được dụng được điều chế bằng cách sử dụng cation kim loại bất kỳ trong số các cation kim loại sau: canxi, magiê, coban, mangan, sắt, đồng, và/hoặc kẽm. Phức chất ON chelat cũng có thể được điều chế sử dụng hai hoặc nhiều hơn hai cation khác nhau như được nêu trên đây. Cụ thể, dược phẩm được chấp thuận để sử dụng cho người, hoặc động vật không phải người như động vật linh trưởng không phải người.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm ON được tính giúp ngăn sự thiếu hụt canxi, magiê, sắt, mangan, đồng hoặc kẽm do oligonucleotit gây ra bằng cách sử dụng lượng hữu hiệu trị liệu của phức chất ON chelat được dụng sử dụng cation kim loại bất kỳ trong số các cation kim loại sau: canxi, magiê, coban, mangan, sắt, đồng, và/hoặc kẽm. Phức chất ON chelat cũng có thể được điều chế sử dụng hai hoặc nhiều hơn hai cation khác nhau như được nêu trên đây. Cụ thể, dược phẩm được chấp thuận để sử dụng cho người, hoặc động vật không phải người như động vật linh trưởng không phải người.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm ON được tính, có độ ổn định bảo quản được cải thiện, chứa lượng hữu hiệu trị liệu của phức chất ON chelat được dụng sử dụng cation kim loại bất kỳ trong số các cation kim loại sau: canxi, magiê, coban, mangan, sắt, đồng, và/hoặc kẽm. Phức chất ON chelat cũng có thể được điều chế sử dụng hai hoặc nhiều hơn hai cation khác nhau như được nêu trên đây. Cụ thể, dược phẩm được chấp thuận để sử dụng cho người, hoặc động vật không phải người như động vật linh trưởng không phải người.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm ON được tính, có chu kỳ bán rã trong huyết thanh giảm hoặc sự tương tác với các protein huyết thanh giảm, chứa lượng hữu hiệu trị liệu của phức chất ON chelat được dùng sử dụng cation kim loại bất kỳ trong số các cation kim loại sau: canxi, magiê, coban, mangan, sắt, đồng, và/hoặc kẽm. Phức chất ON chelat cũng có thể được điều chế sử dụng hai hoặc nhiều hơn hai cation khác nhau như được nêu trên đây. Cụ thể, được phẩm được chấp thuận để sử dụng cho người, hoặc động vật không phải người như động vật linh trưởng không phải người.

Ngoài ra, các chế phẩm trên đây có thể bao gồm chất mang, chất hỗ trợ, chất dẫn thuốc và/hoặc tá dược được chấp nhận về mặt sinh lý và/hoặc được dùng. Các đặc tính của chất mang có thể phụ thuộc vào đường dùng. Thuật ngữ "chất mang, chất hỗ trợ, chất dẫn thuốc và/hoặc tá dược được dùng" chỉ chất mang, chất hỗ trợ, chất dẫn thuốc hoặc tá dược có thể được sử dụng cho đối tượng, được kết hợp vào chế phẩm theo sáng chế, và không phá hủy hoạt tính dược lý của chúng. Chất mang, chất hỗ trợ, chất dẫn thuốc và tá dược được dùng mà có thể được sử dụng trong được phẩm được nêu trong bản mô tả bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất sau: chất trao đổi ion, nhôm ôxit, nhôm stearat, lexitin, hệ phân phối thuốc tự nhũ hóa ("SEDDES"), chất hoạt động bề mặt được sử dụng ở dạng liều được tính như Tweens hoặc các chất nền phân phối polyme tương tự khác, các protein huyết thanh như albumin huyết thanh của người, chất đệm như phosphat, glyxin, axit sorbic, kali sorbat, hỗn hợp glyxerit một phần của axit béo no thực vật, nước, muối hoặc chất điện phân như protamin sulfat, đinatri hydro phosphat, kali hydro phosphat, natri clorua, muối kẽm, silic oxit dạng keo, magiê trisilicat, polyvinyl pyrrolidon, các chất gốc xenluloza, polyetylen glycol, natri carboxymetylxenluloza, polyacrylat, sáp, polyme khối polyetylen-polyoxypropylen, polyetylen glycol và mỡ lỏng cừu. Các xyclodextrin như α -, β - và γ -cyclodextrin, hoặc dẫn xuất được biến đổi hóa học như hydroxyalkylcyclodextrin, bao gồm 2- và 3-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, hoặc các dẫn xuất được hòa tan khác cũng có thể được sử dụng để tăng cường sự phân phối chế phẩm theo sáng chế.

Chế phẩm được nêu trong bản mô tả có thể chứa các chất trị liệu khác như được nêu dưới đây, và có thể được tạo chế phẩm theo công thức, ví dụ, bằng cách sử dụng chất

dẫn thuốc hoặc chất pha loãng dạng rắn hoặc lỏng thông thường, cũng như các chất phụ gia được tính có kiểu thích hợp với cách thức sử dụng mong muốn (ví dụ, tá dược, chất gắn kết, chất bảo quản, chất làm ổn định, chất tạo mùi vị, v.v.) theo kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực dược phẩm.

Chế phẩm được nêu trong bản mô tả có thể được sử dụng bằng phương tiện thích hợp bất kỳ, ví dụ, qua đường miệng, như dưới dạng viên nén, viên nang, hạt hoặc bột; qua đường dưới lưỡi; qua má; ngoài đường tiêu hóa, như dưới da, tiêm hoặc truyền tĩnh mạch, trong cơ, hoặc trong ức (ví dụ dung dịch hoặc hỗn dịch tiêm vô trùng chứa nước hoặc không chứa nước); qua đường mũi như bằng cách xông; sử dụng tại chỗ, như dưới dạng kem hoặc thuốc mỡ; hoặc qua trực tràng như dưới dạng thuốc đạn; trong các chế phẩm đơn vị liều chứa chất dẫn thuốc hoặc chất pha loãng được dụng, không độc. Chế phẩm này có thể, ví dụ, được sử dụng ở dạng thích hợp để giải phóng tức thì hoặc giải phóng kéo dài. Sự giải phóng tức thì hoặc giải phóng kéo dài có thể thu được bằng cách sử dụng được phẩm thích hợp, hoặc, đặc biệt là trong trường hợp giải phóng kéo dài, bằng cách sử dụng thiết bị như vật cây dưới da hoặc bơm thẩm thấu. Như vậy, chế phẩm trên đây có thể được làm cho phù hợp để sử dụng bởi bất kỳ một trong số các con đường sau: trong mắt, ăn bằng miệng, tan trong ruột, xông, tiêm qua da, tiêm dưới da, tiêm trong cơ, tiêm trong màng bụng (IP), tiêm hoặc truyền trong vỏ, trong khí quản, tiêm hoặc truyền tĩnh mạch, hoặc tại chỗ.

Chế phẩm được lấy làm ví dụ để sử dụng qua đường miệng bao gồm hỗn dịch mà có thể chứa, ví dụ, xenluloza vi kết tinh để tạo khối, axit alginic hoặc natri alginat dưới dạng chất tạo huyền phù, metylxenluloza dưới dạng chất tăng cường độ nhớt, và chất tạo ngọt hoặc chất tạo mùi vị như các chất đã biết trong lĩnh vực; và viên nén giải phóng tức thì mà có thể chứa, ví dụ, xenluloza vi kết tinh, đicanxi phosphat, tinh bột, magiê stearat và/hoặc lactoza và/hoặc tá dược khác, chất gắn kết, chất kéo dài, chất phân rã, chất pha loãng và chất làm trơn như các chất đã biết trong lĩnh vực. Chế phẩm này cũng có thể được phân phối qua khoang miệng bằng con đường sử dụng dưới lưỡi và/hoặc trong má. Viên nén đúc, viên nén ép hoặc viên nén đông khô là các dạng được lấy làm ví dụ mà có thể được sử dụng. Chế phẩm được lấy làm ví dụ bao gồm các chế phẩm tạo ra chế phẩm

theo sáng chế với chất pha loãng hòa tan nhanh như manitol, lactoza, sucroza và/hoặc xyclodextrin. Còn được bao gồm trong chế phẩm này có thể là tá dược khối lượng phân tử cao như xenluloza (avicel) hoặc polyetylen glycol (PEG). Các chế phẩm này cũng có thể bao gồm tá dược để hỗ trợ cho sự bám dính niêm mạc như hydroxy propyl xenluloza (HPC), hydroxy propyl metyl xenluloza (HPMC), natri carboxy metyl xenluloza (SCMC), copolyme maleic anhydrit (ví dụ Gantrez), và chất để giải phóng có kiểm soát như copolyme polyacrylic (ví dụ Carbopol 934). Chất làm trơn, chất trượt, chất tạo hương vị, chất tạo màu và chất làm ổn định cũng có thể được thêm vào để giúp dễ dàng sản xuất và sử dụng.

Lượng hữu hiệu của hợp chất được nêu trong bản mô tả có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và bao gồm các lượng liều được lấy làm ví dụ cho người lớn từ khoảng 0,1 đến 500 mg hoạt chất/kg khối lượng cơ thể mỗi ngày, mà có thể được sử dụng ở liều đơn hoặc dưới dạng các liều được chia nhỏ riêng biệt, như từ 1 đến 5 lần mỗi ngày. Được hiểu là mức liều cụ thể và tần suất dùng liều cho đối tượng cụ thể bất kỳ có thể thay đổi và sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm hoạt tính của hợp chất cụ thể được sử dụng, độ ổn định chuyển hóa và độ dài tác dụng của hợp chất đó, loài, tuổi tác, cân nặng, sức khỏe chung, giới tính và chế độ ăn của đối tượng, cách thức và thời gian sử dụng, tốc độ bài tiết và thanh thải, kết hợp thuốc, và mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh cụ thể. Đối tượng được ưu tiên để điều trị bao gồm động vật, tốt nhất là loài động vật có vú như người, và động vật nuôi trong nhà như chó, mèo và loài tương tự, dễ bị các rối loạn phụ thuộc sự tạo mạch hoặc đi kèm sự tạo mạch.

Dược phẩm có thể còn chứa các yếu tố và/hoặc chất có hoạt tính khác mà làm tăng cường hoạt tính. Dược phẩm và chế phẩm để sử dụng có thể bao gồm cao dán da, thuốc mỡ, thuốc xức, kem, gel, thuốc nhỏ, thuốc đạn, thuốc xịt, các chất lỏng, bột và sol khí. Chất mang dược tính thông thường, chứa nước, bột hoặc bazơ dầu, chất làm đặc và dạng tương tự có thể là cần thiết hoặc mong muốn. Các chế phẩm khác bao gồm các chất trong đó ON được trộn với chất phân phối tại chỗ như lipid, liposom, axit béo, este của axit béo, steroid, chất chelat hóa và chất hoạt động bề mặt. Lipid và liposom được ưu tiên bao gồm chất trung tính (ví dụ dioleoylphosphatidyl DOPE etanolamin, dimyristoylphosphatidyl

cholin DMPC, distearolyphosphatidyl cholin), chất mang điện âm (ví dụ dimyristoylphosphatidyl glyxerol DMPG) và chất dạng cation (ví dụ dioleoyltetramethylaminopropyl DOTAP, dioleoylphosphatidyl etanolamin DOTMA) và chất hoặc phân tử phân phối khác. ON có thể được bao bên trong liposom hoặc có thể tạo thành phức chất với nó, cụ thể là với liposom dạng cation. Theo cách khác, ON có thể được tạo phức với lipit, cụ thể là với lipit dạng cation. Axit béo và este được ưu tiên bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axit arachidonic, axit oleic, axit eicosanoic, axit lauric, axit caprylic, axit capric, axit myristic, axit palmitic, axit stearic, axit linoleic, axit linolenic, dicaprat, tricaprat, monoolein, dilaurin, glyxeryl 1-monocaprat, 1-dodexylazaxycloheptan-2-on, axylcarnitin, axylcholin, hoặc C1-10 alkyl este (ví dụ isopropylmyristat IPM), monoglyxerit, diglyxerit hoặc muối được dụng của chúng.

Phần bộc lộ này sẽ dễ hiểu hơn khi tham khảo các Ví dụ sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ I

Mô tả đặc điểm của ON thoái hóa

Fig. 1A làm rõ sự phân tách của hai chế phẩm oligonucleotit mà được phun đồng thời vào cột bằng HPLC (sử dụng cột kỵ nước). Chế phẩm thứ nhất trong số hai chế phẩm này được gọi là chất chuẩn nội và là phosphorothioat oligonucleotit 21 mer với trình tự đã được xác định cụ thể, chế phẩm thứ hai là REP 2006 (phosphorothioat oligonucleotit thoái hóa 40mer). Cả hai loại này phân tách thành các pic xác định riêng biệt dựa trên các tính chất hóa lý của chúng (tức là kích thước và tính kỵ nước); trình tự của nucleotit có mặt trong mỗi ON này tác động không đáng kể đến các tính chất hóa lý của chúng và do vậy có không tác động đến sự phân tách của chúng. Như vậy, chất chuẩn nội này rửa giải cột dưới dạng pic được xác định chặt chẽ với thời gian lưu ngắn hơn so với REP 2006, chỉ do sự khác nhau về kích thước giữa hai polyme ON này. Lưu ý rằng các khác ở một trong hai bên của pic REP 2006 là do các trình tự sai diễn hình trong quá trình tạo ra các oligonucleotit dài hơn. Dù REP 2006 có bản chất trình tự không đồng nhất, nó phân tích dưới dạng pic đã được xác định rõ bằng HPLC tương tự như là trình tự cụ thể 21 mer mà minh họa các tính chất hóa lý thông thường của tất cả các loại trong chế phẩm REP 2006,

ngay cả khi có mặt số lượng rất lớn các trình tự khác nhau. Sau khi phân tách các pic REP 2006 và 21-mer bằng HPLC, các pic này có thể được đưa đi đo phổ khối lượng (MS) để xác định loại có mặt bên trong các pic đã được xác định này (Fig. 1B và 1C).

Trên Fig. 1B, 21 mer được phân giải thành loại đơn với MW là 7402,6 Da, phù hợp với PS-ON có trình tự đã được xác định. Tuy nhiên, phân tích MS của REP 2006 (Fig. 1C) thể hiện số lượng cực lớn của loại có mặt mà khoảng khối lượng của chúng có sự phân bố bình thường gần như hoàn hảo, phù hợp với bản chất thoái hóa hoàn toàn của nó. Khoảng khối lượng này đi từ C₄₀ (loại nhỏ nhất) đến A₄₀ (loại lớn nhất) và hóa trị của các loại này là cực kỳ nhỏ với số lượng các loại tăng (mật độ pic) khi khối lượng của chúng tiến gần đến giữa khoảng khối lượng. Điều này là bởi vì số lượng lớn các trình tự khác nhau tăng dần sẽ dẫn đến khối lượng tương tự. Thực tế là tất cả các loại ON khác nhau có mặt trong REP 2006 có cùng thời gian lưu trên cột kỵ nước trong quá trình phân tách HPLC chứng minh rõ ràng rằng tất cả các ON có cùng kích thước và cùng các biến đổi hóa học (tức là quá trình phosphorothioat hóa) sẽ có các tính chất hóa lý tương tự ở mức cao (nếu không phải là giống hệt) và như vậy, có thể được xem là tương tự về mặt chức năng trong ứng dụng hoặc tính chất bất kỳ mà không phụ thuộc vào trình tự của nucleotit có mặt trong phân tử ON cụ thể. Như vậy, sự tạo thành phức chất ON chelat bất kỳ được quan sát thấy với ON thoái hóa cụ thể bất kỳ (ví dụ REP 2003, REP 2004), không thể phụ thuộc vào trình tự trên oligonucleotit có mặt và cần phải phụ thuộc vào các tính chất hóa lý được bảo toàn của ON bất kỳ.

Ví dụ II

ON tạo thành phức chất chelat với các cation kim loại hoá trị hai khác nhau

Sự tương tác của các muối oligonucleotit amoni với các cation kim loại hoá trị hai khác nhau được kiểm tra bằng độ phân cực huỳnh quang (FP) như được nêu ở trên. Trong quá trình tổng hợp oligonucleotit, mỗi oligonucleotit được tiếp hợp với isothioxyanat phát huỳnh quang (FITC) ở đầu 3' bởi thành phần liên kết 3 cacbon cứng sử dụng chất phản ứng và quy trình tổng hợp đã biết. Các oligonucleotit này bị phân cắt khỏi sự tổng hợp và ở lại dưới dạng muối amoni. Oligonucleotit được sử dụng trong ví dụ này được mô tả trong bảng 1.

Bảng 1

ON được sử dụng trong Ví dụ II

Oligonucleotit	Trình tự (5'-3')	Các biến đổi
REP 2032-FL	N ₆	PS
REP 2003-FL	N ₁₀	PS
REP 2004-FL	N ₂₀	PS
REP 2006-FL	N ₄₀	PS
REP 2107-FL	N ₄₀	PS + 2' O Me
REP 2086-FL	N ₄₀	2' O Me
REP 2031-FL	C ₄₀ (SEQ ID NO:4)	PS

N = trình tự thoái hóa (sự kết hợp ngẫu nhiên của A, G, C hoặc T)

PS = phosphorothioat hóa ở mỗi liên kết

2' O Me = 2' O metyl hóa ở mỗi riboza

Oligonucleotit được đánh dấu 3' FITC được sử dụng là REP 2032-FL (oligodeoxynucleotit thoái hóa được phosphorothioat hóa 6 mer), REP 2003-FL (oligodeoxynucleotit thoái hóa được phosphorothioat hóa 10mer), REP 2004-FL (oligodeoxynucleotit thoái hóa được phosphorothioat hóa 20 mer), REP 2006-FL (oligodeoxynucleotit thoái hóa được phosphorothioat hóa 40 mer), REP 2031 -FL (oligodeoxynucleotit được phosphorothioat hóa poly xytosin 40 mer; SEQ ID NO:4), REP 2107-FL (oligonucleotit thoái hóa được phosphorothioat hóa 40 mer có mỗi riboza được cải biến bởi sự O metyl hóa ở vị trí 2') và REP 2086-FL (phosphodiester oligonucleotit thoái hóa 40 mer có mỗi riboza được cải biến bởi sự O metyl hóa ở vị trí 2'). Mỗi trong số các ON này được điều chế dưới dạng dung dịch gốc 0,5 mM trong TRIS 1 mM (pH = 7,2). Dung dịch gốc này được sử dụng để điều chế dung dịch ON phát huỳnh quang 3nM trong chất đệm FP (TRIS 10mM, NaCl 80mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoethanol 10mM và Tween®-20 0,1%). EDTA có mặt để loại bỏ kim loại hoá trị hai bất kỳ có mặt trong dung dịch trước khi xác định FP. Mỗi trong số các dung dịch chất đệm này còn chứa NaCl 80 mM để đánh giá sự tạo thành phức chất ON trong điều kiện có mặt lượng dư mol của cation hóa trị một (trong mỗi đồ thị trên các Fig. 1 -12, điều này

được báo cáo dưới dạng nồng độ kim loại clorua 0 mM). Các lượng khác nhau của muối clorua mức ACS của kim loại hoá trị hai (2+) được thêm vào mỗi ON phát huỳnh quang trong dung dịch. Các muối này bao gồm canxi clorua, magiê clorua, coban clorua, sắt clorua, mangan clorua, bari clorua, niken clorua, đồng clorua, kẽm clorua, cadimi clorua, thủy ngân clorua và chì clorua. Sự tạo thành đime hoặc phức chất ON chelat bậc cao hơn được giám sát bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang (được xác định bởi đơn vị không thứ nguyên "mP") sao cho sự tạo thành của phức chất ON chelat tăng sẽ dẫn đến các thay đổi lớn về khối lượng. Sự xáo trộn thấp thu được của các phức chất ON chelat trong dung dịch dẫn đến độ phân cực được tăng lên của huỳnh quang phát ra (xem Fig. 16). Kết quả của các thử nghiệm này được trình bày trên các Fig. 2-13. Trong mỗi trường hợp, sự tăng đáng kể độ phân cực huỳnh quang được nhìn thấy với tất cả các ON trong điều kiện có mặt tất cả các cation có hoá trị hai nhưng không phải trong điều kiện có mặt lượng dư mol cao của Na^+ (được cung cấp dưới dạng NaCl), thể hiện sự tạo thành của phức chất ON chelat chỉ với cation kim loại hoá trị hai. Những kết quả này chứng minh điều sau:

- ON trong điều kiện có mặt NaCl 80 mM không thể hiện bất kỳ sự tạo thành đime hoặc các phức chất ON bậc cao hơn bất kỳ khác có thể phát hiện được.
- ON tạo thành các đime và phức chất bậc cao hơn trong điều kiện có mặt các cation kim loại hoá trị hai sau đây khi chúng tồn tại ở trạng thái điện tích 2+: canxi, magiê, coban, sắt, mangan, bari, niken, đồng, kẽm, cadimi, thủy ngân và chì. Sự tạo thành các phức chất ON này liên quan đến sự tương tác của ON với các cation kim loại hoá trị hai này.
- Sự tạo thành phức chất ON không thể là do sự lai giữa các bazơ nitơ thông qua các tương tác Watson-Crick truyền thống do bản chất thoái hóa của ON được thử nghiệm. Ngoài ra, REP 2031 (SEQ ID NO:4) không thể tự lai ở điều kiện thử nghiệm sử dụng.
- Sự tạo thành phức chất ON là ổn định và tan được trong dung dịch nước và vì các phức chất này xuất hiện kết hợp với kim loại hoá trị hai đang nói đến như là một phần của phức chất được tạo thành, các phức chất ON này có tác dụng chelat hóa kim loại hoá trị hai đang nói đến từ dung dịch trong đó phức chất ON được tạo thành.
- Sự chelat hóa các kim loại này và sự tạo thành phức chất ON chelat không phụ thuộc vào trình tự nucleotit cụ thể, như được thấy rõ bởi sự chelat hóa quan sát được với

oligonucleotit thoái hóa và cũng không phụ thuộc vào các cải biến nucleotit có liên quan đến sự biến đổi liên kết phosphodiester hoặc gốc 2' ribosa.

- Sự chelat hóa các kim loại này xảy ra với các oligonucleotit có chiều dài từ 6 đến 40 nucleotit.
- Sự chelat hóa các kim loại này xảy ra với sự có mặt hoặc không có mặt của quá trình phosphorothioat hóa hoặc biến đổi 2' ribosa.

Sự tạo thành mở rộng của phức chất ON chelat với nhiều cation kim loại hoá trị hai với tất cả các ON trong ví dụ này còn gợi ý các điều sau:

- Vì cation có hoá trị hai xúc tác sự tạo thành phức chất ON và cation hóa trị một thì không, và vì sự tạo thành phức chất ON không xảy ra thông qua quá trình lai bazơ như được nêu trên đây, sự tạo thành phức chất ON chelat cần phải bao gồm dạng nhất định của "cầu ion kim loại" giữa hai ON ở các vị trí mà dễ dàng góp chung điện tử có khả năng điền đầy orbital điện tử trống trong cation. Các vị trí chịu trách nhiệm nhiều nhất cho "sự góp chung điện tử" này là nguyên tử oxy không tạo cầu (hoặc lưu huỳnh trong trường hợp phosphorothioat hóa) trong liên kết phosphodiester (xem Fig. 14B).
- ON sợi đôi, dù là ADN hoặc ARN được mong đợi là thể hiện cùng sự tạo thành phức chất chelat và do đó có cùng xu hướng chelat hóa cation kim loại từ dung dịch.
- Các cầu kim loại này phải bao gồm các tương tác liên phân tử vì các tương tác trong phân tử sẽ không dẫn đến độ phân cực huỳnh quang được tăng đáng kể nào (xem các Fig. 15 A-C và 6).
- Phức chất ON chelat tan tồn tại ở nồng độ bất kỳ của ON và cation có hoá trị hai mà không tạo thành các kết tủa phức chelat (xem Fig. 14D).
- ON không thể tạo thành muối với cation kim loại hoá trị hai và không hoạt động như là muối trong dung dịch nước. Điều này trái với cation hóa trị một (được lấy làm ví dụ là natri trong ví dụ này, nhưng cũng có thể áp dụng cho các cation hóa trị một khác như kali, lithi hoặc amoni) mà tạo thành các muối với ON và hoạt động giống muối (chất điện phân) trong dung dịch. Hơn nữa, mặc dù tất cả các ON được sử dụng trong ví dụ này là muối amoni, trong dung dịch nước, ion amoni có thể phân ly khỏi ON (như được mong

đội từ muối) và không tạo ra sự ức chế đối với quá trình tạo thành phức chất ON chelat bởi cation hoá trị hai. Điều này còn được củng cố bởi sự quan sát thấy rằng muối hoá trị một bổ sung (trong trường hợp này là NaCl 80 mM) không có vẻ can thiệp vào sự tạo thành phức chất ON chelat với cation hoá trị hai.

- Sự tạo thành của phức chất ON chelat có thể được mong muốn là xảy ra với kim loại bất kỳ, kim loại chuyển tiếp, nguyên tố đất lanthan hoặc nguyên tố actin có trạng thái điện tích 2+ và cũng có thể xảy ra với các ion kim loại mà có thể tồn tại ở trạng thái điện tích 3+ hoặc cao hơn (ví dụ crôm).
- ON có chiều dài lớn hơn 40mer hoặc chứa các cải biến khác hoặc có trình tự nucleotit đã được xác định cụ thể bất kỳ cũng có thể được mong muốn tạo thành phức chất ON chelat với cation kim loại hoá trị hai với điều kiện là chúng có chứa liên kết có khả năng góp chung điện tử theo cùng cách như nguyên tử oxy (hoặc lưu huỳnh) không tạo cầu trong các liên kết phosphodiester truyền thống.
- Muối ON (ví dụ muối natri) có thể là hữu ích với các chelat kim loại hoá trị hai ở bệnh nhân là người hoặc không phải người như, nhưng không giới hạn ở: cadimi, thủy ngân, chì. Ngoài ra, sự chelat hóa bất kỳ một cation kim loại hoá trị hai cụ thể (ví dụ sắt) bởi muối natri oligonucleotit có thể bị ức chế bằng cách điều chế muối natri ON dưới dạng phức chất ON chelat với cation kim loại hoá trị hai khác (ví dụ canxi).
- Muối kim loại khác muối clorua cũng có thể cho phép tạo thành phức chất ON chelat. Lấy muối canxi làm ví dụ, các muối canxi khác có thể tương thích với sự tạo thành phức chất ON chelat có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, canxi gluconat, canxi xitrat, canxi lactat, canxi malat, canxi aspartat, canxi fumarat, canxi ascorbat, canxi benzoat, canxi erythorbat, và/hoặc canxi propionat.

Ví dụ III

ON tạo thành phức chất chelat với các muối khác nhau của canxi và magiê

Để chứng minh thêm bản chất chung của sự tạo thành phức chất ON chelat và cũng để chứng minh tính hữu dụng của các muối khác nhau của cation kim loại hóa trị hai trong sự tạo thành phức chất ON chelat, hai dạng khác nhau của muối canxi và magiê

được sử dụng để điều chế các phức chất ON chelat khác nhau với ON có các trình tự cụ thể khác nhau. Các muối được sử dụng là canxi clorua, canxi sulfat, magiê clorua và magiê sulfat. Các ON được sử dụng được đưa ra trong bảng 2 dưới đây. Các điều kiện phản ứng FP là giống với các điều kiện trong Ví dụ I loại trừ rằng EDTA được bỏ qua để chứng minh sự tạo thành của phức chất ON chelat khi vắng mặt các tác dụng bất kỳ được điều tiết bởi EDTA.

Bảng 2

ON được sử dụng trong Ví dụ III

Oligonucleotit	Trình tự (5' – 3')	SEQ. ID NO.	Các cải biến
REP 2055-FL	(AC) ₂₀	6	PS
REP 2056-FL	(TC) ₂₀	7	PS
REP 2033-FL	(TG) ₂₀	5	PS
REP 2029-FL	(AC) ₂₀	2	PS
REP 2028-FL	A ₄₀	1	PS
REP 2057-FL	(AG) ₂₀	8	PS
REP 2120-FL	N ₄₀ (C = 5' methylcytidin)	NA	PS
REP 2030-FL	T ₄₀	3	PS
REP 2129-FL	C ₆₀	12	PS
REP 2126-FL	C ₂₀	9	PS
REP 2128-FL	C ₅₀	11	PS
REP 2127-FL	C ₃₀	10	PS
REP 2006-FL	N ₄₀	NA	PS
REP 2139-FL	(A5'MeC) ₂₀	13	PS
REP 2045-FL	N ₆₀	NA	PS + 2' O Me
REP 2007-FL	N ₈₀	NA	PS

N = trình tự thoái hóa (sự kết hợp ngẫu nhiên của A, G, C hoặc T)

PS = phosphorothioat hóa ở mỗi liên kết

2' O Me = 2' O methyl hóa ở mỗi riboza

NA = không có khả năng áp dụng (trình tự là thoái hóa)

Kết quả của các thử nghiệm này được minh họa trên các Fig. 17-24 và chứng tỏ rằng tất cả các ON được thử nghiệm có thể tạo thành phức chất ON với muối khác nhau của canxi và magiê. Hai ngoại lệ với sự quan sát chung này là REP 2028-FL (poly G 40mer, SEQ ID NO:1; Fig 18A và 22A) và REP 2029-FL (poly A 40mer, SEQ ID NO:2; Fig 17B và 21 B). Cả hai ON này đều là polypurin và, đặc biệt là trong trường hợp poly G, đều được biết là tạo thành các tương tác trong phân tử ổn định nhiệt động học (được gọi là "G-vạch bốn" trong trường hợp bó poly G) mà dẫn đến việc các ON tạo thành phức chất trong phân tử chặt chẽ trong đó mạch chính phosphodiester có thể được gấp một phần bên trong phức chất này hoặc không còn có thể tham gia vào các tương tác trong dung dịch (như sự tạo thành phức chất chelat). REP 2029-FL (SEQ ID NO:2) có thể tạo thành ở mức yếu phức chất chelat mà có thể là do các tương tác "A-vạch bốn" yếu xảy ra với ON này. Như vậy, không được bao gồm trong bản mô tả là ON mà chỉ gồm poly A và poly G và các aptame tạo thành các tương tác trong phân tử ổn định nhiệt động học. Các ON được bao gồm trong bản mô tả này không phải là ON toàn bộ poly A hoặc poly G và/hoặc các haptame.

Các kết quả từ ví dụ II thể hiện rằng các dạng muối khác nhau của magiê và canxi có thể được sử dụng để điều chế phức chất ON chelat và còn minh họa các điều sau:

- Tất cả các ON trong ví dụ II (trừ REP 2006-FL) chứa trình tự cụ thể mà không chứa trình tự palindromic bất kỳ có khả năng tạo thành cấu trúc kẹp tóc cũng như trình tự bất kỳ trong số các trình tự tự bổ sung này. Do vậy, không có sự tạo thành phức chất ON chelat nào được quan sát thấy là tham gia vào biến cố lai.
- Khả năng tạo thành phức chất ON chelat kém của REP 2028-FL (SEQ ID NO: 1) và REP 2029-FL (SEQ ID NO:2) gợi ý rằng mạch chính phosphodiester được nói lỏng là cần thiết cho sự tạo thành phức chất ON chelat một lần nữa chỉ đến mạch chính phosphodiester như là dấu hiệu hóa học trên ON cần để liên kết hai hoặc nhiều hơn hai ON để tạo thành phức chất chelat.
- ON bất kỳ mà chứa mạch chính phosphodiester được mong đợi là có thể tạo thành phức chất chelat, không tính các cải biến đang có khác như sự phosphorothioat hóa, cải biến 2' riboza hoặc cải biến axit nucleic bị chặn.

- Phức chất ON chelat có thể được tạo thành với các ON có chiều dài bằng 80mer và ON có chiều dài lớn hơn 80mer cũng thể hiện cùng đặc tính trong điều kiện có mặt cation kim loại hoá trị hai.

Ví dụ IV

Sự tạo thành phức chất ON chelat với ON sợi đôi

Các oligonucleotit sợi đôi được tạo ra từ hai oligonucleotit bổ sung sợi đơn mà trong dung dịch nước sẽ lai với nhau qua các tương tác Watson-Crick. Vì ON sợi đôi vẫn có mạch chính phosphodiester được bộc lộ trên phía ngoài của chuỗi xoắn ADN được tạo thành, chúng cần có khả năng tạo thành phức chất chelat trong điều kiện có mặt cation hoá trị hai. Để kiểm tra giả thuyết này, hai oligonucleotit ADN sợi đôi khác nhau được điều chế bằng cách lai REP 2055-FL (poly AC 40mer; SEQ ID NO:6) với REP 2033-FL (poly TG 40mer; SEQ ID NO:5) và REP 2057-FL (poly AG 40mer; SEQ ID NO:8) với REP 2056-FL (poly TC 40mer; SEQ ID NO:7). Vì sự lai ON cho kết quả hai lần, sự tăng khối lượng thu được có thể được phát hiện bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang so với ON sợi đơn được sử dụng để điều chế phức chất. Các ON sợi đơn (REP 2055-FL (SEQ ID NO:6), Rep 2033-FL (SEQ ID NO:5), Rep 2057-FL (SEQ ID NO:8) và REP 2056-FL (SEQ ID NO:7)) mỗi ON được pha loãng đến nồng độ 20nM trong 1X chất đệm FP. Sự lai hai cặp bổ sung như được xác định trên đây cũng được tiến hành trong 1X chất đệm FP (10nM mỗi ON) và việc lai này được xác nhận bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang. Các cấu trúc sợi đôi sau đó được tiếp xúc với CaCl_2 100 mM hoặc MgCl_2 100 mM. Sự tạo thành phức chất chelat được theo dõi bởi sự tăng tiếp độ phân cực huỳnh quang (xem Fig. 25). Các kết quả của thử nghiệm này khẳng định sự lai thành công của hai cặp ON bổ sung thành ON sợi đôi như được thấy rõ bởi sự tăng độ phân cực huỳnh quang. Hơn nữa, việc bổ sung CaCl_2 hoặc MgCl_2 vào ON sợi đôi dẫn đến sự tăng thêm độ phân cực huỳnh quang, cho thấy rằng các ON sợi đôi này cũng có thể tạo thành phức chất chelat trong điều kiện có mặt cation kim loại hoá trị hai. Những kết quả này còn gợi ý rằng ON sợi đôi có thể tạo thành phức chất ON chelat với cation hoá trị hai bất kỳ và cũng sẽ được mong muốn là có tác dụng tách các cation hoá trị hai này ra khỏi dung dịch.

Ví dụ V

Các cation hóa trị một khác nhau không tạo thành phức chất chelat với ON

Để chứng minh cụ thể hơn rằng sự tạo thành phức chất ON chelat không thể xảy ra trong điều kiện có mặt cation hóa trị một và đặc biệt là cần phải có cation có hoá trị hai cho sự tạo thành của chúng, sự tạo thành phức chất ON với nhiều ON (xem Ví dụ 2) được quan sát trong chất đệm FP mà chứa chỉ một nguồn cation. 1X Chất đệm FP được điều chế chỉ chứa một trong số các muối sau: natri clorua, kali clorua, amoni clorua, canxi clorua hoặc magiê clorua, tất cả ở nồng độ 80mM sao cho nồng độ của các cation trong chất đệm FP là tương đương. Các ON được đánh dấu huỳnh quang như được nêu trong ví dụ 2 được pha loãng đến 10nM trong các chất đệm FP khác nhau và sự tạo thành phức chất ON chelat được theo dõi bằng độ phân cực huỳnh quang (xem Fig. 26). Trong trường hợp mỗi ON được thử nghiệm, sự tạo thành phức chất chelat được quan sát chỉ với các cation Mg^{2+} và Ca^{2+} và không với bất kỳ cation hóa trị một được thử nghiệm nào (Na^+ , K^+ hoặc NH_4^+). Như được quan sát thấy trong ví dụ III, REP 2029-FL (SEQ ID NO:2) và REP 2028-FL (SEQ ID NO:1) thể hiện chỉ một sự tạo thành phức chất nhỏ hoặc không có sự tạo thành phức chất, lần lượt trong điều kiện có mặt canxi hoặc magiê. Điều này cũng khẳng định rằng các ON có thể chỉ tạo thành phức chất chelat với cation có hoá trị hai trong khi đó các ON có thể chỉ tồn tại dưới dạng muối với các muối hoá trị một.

Ví dụ VI

Đánh giá nồng độ kim loại trong phức chất ON chelat được điều chế trong WFI

Để chứng minh khả năng ứng dụng rộng rãi của chế phẩm phức chất ON chelat với tất cả các ON, một vài phức chất ON chelat khác nhau được điều chế sử dụng ON và muối clorua kim loại²⁺ như được chỉ định trong bảng 3. Tất cả các ON được sử dụng trong chế phẩm này là muối natri mà được khử muối để loại bỏ natri thu được từ NaCl và chỉ để lại natri kết hợp với sự tạo thành muối ON trong ON được làm đông khô cuối cùng. Phức chất ON chelat được điều chế trong nước để tiêm (WFI) bằng cách trước hết là hòa tan lượng loại trừ của muối natri ON đến nồng độ 50mg/ml và bổ sung lượng loại trừ của muối kim loại hoá trị hai clorua vào dung dịch ON. Dung dịch ON trước khi bổ sung kim loại hoá trị hai clorua / tạo thành ON chelat được phân tích natri và kim loại có liên quan bằng quang phổ phát xạ quang plasma ghép đôi cảm ứng (inductively coupled plasma-

optical emission spectroscopy - ICP-OES). Sau sự tạo thành phức chất ON chelat, các mẫu được khử muối bằng phương pháp siêu lọc sử dụng thiết bị lọc xenluloza hoàn nguyên 5000 MWCO. Thiết bị lọc này trước đó đã được thông qua để cho phép các muối tự do thấm qua nhưng không thấm ON hoặc các cation được gắn vào ON. Dung dịch không đi qua màng (chứa phức chất ON chelat) được phân tích hàm lượng natri và kim loại bằng ICP-OES và hàm lượng clorua bằng sắc ký ion để khẳng định rằng kim loại hoá trị hai có mặt được chelat hóa trên ON và không thu được từ muối kim loại hoá trị hai có mặt trong dung dịch không đi qua màng (Bảng 4).

Bảng 3

Chế phẩm của các phức chất ON chelat khác nhau

ON	Trình tự/hóa chất	Chelat kim loại được điều chế	Kim loại clorua được bổ sung (mg/100mg ON)	Nồng độ ON
REP 2004	N ₂₀ /PS	Ca	10	50 mg/ml
REP 2006	N ₄₀ /PS	Ca	10	50 mg/ml
REP 2006	N ₄₀ /PS	Ca	20	50 mg/ml
REP 2006	N ₄₀ /PS	Ca	30	25 mg/ml
REP 2006	N ₄₀ /PS	Mg	20	50 mg/ml
REP 2006	N ₄₀ /PS	Fe ²⁺	2	25 mg/ml
REP 2107	N ₄₀ /PS, 2'OMe	Ca	10	37,5 mg/ml
REP 2107	N ₄₀ /PS, 2'OMe	Mg	15	37,5 mg/ml
REP 2107	N ₄₀ /PS, 2'OMe	Fe ²⁺	2	37,5 mg/ml
REP 2138 (SEQ ID NO:14)	C ₄₀ / 2'OMe	Ca	10	50 mg/ml
REP 2126 (SEQ ID NO:9)	C ₂₀ / PS	Ca	10	50 mg/ml
REP 2031 (SEQ ID NO:4)	C ₄₀ / PS	Ca	10	50 mg/ml
REP 2129 (SEQ ID NO:12)	C ₆₀ / PS	Ca	10	50 mg/ml

REP 2057 (SEQ ID NO:8)	(AG) ₂₀ / PS	Ca	10	50 mg/ml
REP 2057 (SEQ ID NO:8)	(AG) ₂₀ / PS	Mg	15	50 mg/ml
REP 2057 (SEQ ID NO:8)	(AG) ₂₀ / PS	Fe ²⁺	2	50 mg/ml
REP 2055 (SEQ ID NO:6)	(AC) ₂₀ / PS	Ca	10	50 mg/ml
REP 2139 (SEQ ID NO:13)	(A,5Mec) ₂₀ /PS, 2'OMe	Ca	10	50 mg/ml
REP 2139 (SEQ ID NO:13)	(A,5Mec) ₂₀ /PS, 2'OMe	Ca	30	25 mg/ml
REP 2139 (SEQ ID NO:13)	(A,5Mec) ₂₀ /PS, 2'OMe	Mg	15	50 mg/ml
REP 2139 (SEQ ID NO:13)	(A,5Mec) ₂₀ /PS, 2'OMe	Ca, Mg	5 / 7,5	50 mg/ml

N = bazơ thoái hóa (là sự phân bố ngẫu nhiên của A, G, T hoặc C)

PS = phosphorothioat

2'Ome = ribosa O metyl hóa ở vị trí 2'

5MeC = 5'methylcytidin

Bảng 4

Xác nhận hàm lượng kim loại trong các dung dịch phức chất ON chelat khác nhau

ON	Chelat kim loại (mg/100mg ON)	Dung dịch ON tiền chelate		Phức chất ON chelat sau khi khử muối		
		natri	kim loại	clorua	natri	kim loại
REP 2004	Ca (10)	0,276%	< 2,0 ppm	< 10 ppm	< 0,03%	664 ppm
REP 2006	Ca (10)	0,381%	< 11 ppm	< 8 ppm	400 ppm	614 ppm
REP 2006	Ca (20)	0,443%	1,21 ppm	< 8 ppm	141 ppm	0,11%
REP 2006	Ca (30)	0,399%	2,0 ppm	< 8 ppm	< 110 ppm	861 ppm
REP 2006	Mg (20)	0,390%	< 5 ppm	< 9 ppm	110 ppm	564 ppm
REP 2006	Fe ²⁺ (2)	0,394%	< 5 ppm	< 10 ppm	979 ppm	176 ppm

REP 2107	Ca (10)	0,232%	< 6 ppm	< 9 ppm	215 ppm	539 ppm
REP 2107	Mg (20)	0,237%	< 0,9 ppm	< 9 ppm	162 ppm	339 ppm
REP 2107	Fe ²⁺ (2)	0,219%	2,5 ppm	15 ppm	0,049%	141 ppm
REP 2138 (SEQ ID NO:14)	Ca (10)	0,210%	< 0,04%	< 10 ppm	3,2 ppm	745 ppm
REP 2126 (SEQ ID NO:9)	Ca (10)	0,266%	< 2,3 ppm	< 10 ppm	< 0,04%	681 ppm
REP 2031 (SEQ ID NO:4)	Ca (10)	0,222%	< 2,4 ppm	< 9 ppm	< 0,03%	772 ppm
REP 2129 (SEQ ID NO:12)	Ca (10)	0,236%	< 2,4 ppm	< 10 ppm	< 0,03%	681 ppm
REP 2057 (SEQ ID NO:8)	Ca (10)	0,257%	5,5 ppm	< 10 ppm	398 ppm	743 ppm
REP 2057 (SEQ ID NO:8)	Mg (20)	0,250%	< 1 ppm	< 9 ppm	177 ppm	531 ppm
REP 2057 (SEQ ID NO:8)	Fe ²⁺ (2)	0,244%	0,7 ppm	< 9 ppm	0,101%	195 ppm
REP 2055 (SEQ ID NO:6)	Ca (10)	0,238%	< 6 ppm	< 9 ppm	351 ppm	639 ppm
REP 2139 (SEQ ID NO:13)	Ca (10)	0,244%	< 6 ppm	< 8 ppm	347 ppm	638 ppm
REP 2139 (SEQ ID NO:13)	Ca (30)	0,236%	< 1,8 ppm	< 8 ppm	91 ppm	937 ppm
REP 2139 (SEQ ID NO:13)	Mg (15)	0,247%	< 1 ppm	< 9 ppm	248 ppm	472 ppm
REP 2139 (SEQ ID NO:13)	Ca (5), Mg (7,5)	0,276%	< 9 ppm (Ca)	< 10 ppm	0,022%	0,033% (Ca)
			< 5 ppm (Mg)			0,314% (Mg)

Các kết quả này khẳng định sự thay thế một phần natri bằng canxi, magiê hoặc sắt (2+) trong ON thay đổi theo chiều dài từ 20 đến 60mer, thay đổi theo trình tự từ toàn bộ ON thoái hóa đến ba trình tự cụ thể (poly C, poly AC và poly AG) và trong các ON có

hoặc không có các cải biến phosphorothioat hóa, có hoặc không có các cải biến 2' riboza và chứa phosphorothioat và các cải biến Z riboza. Khả năng tạo thành ON được cải biến 2' O methyl riboza dưới dạng phức chất chelat được dự định là mở rộng cả với các ON chứa cải biến 2' riboza bất kỳ khác như, nhưng không bị giới hạn ở, 2' flo và 2' O methoxyethyl. Ngoài ra, chúng chứng tỏ rằng sự thay thế natri đáng kể thu được với sự tăng tối thiểu hàm lượng kim loại hoá trị hai, phù hợp với cấu trúc phức chất ON chelat được bộc lộ trên Fig. 15. Những kết quả này cũng minh họa các kết hợp khác nhau của dung dịch muối canxi, magiê, sắt (2+) và canxi/magiê hỗn hợp mà có thể được sử dụng để điều chế phức chất ON chelat và thể hiện rằng dung dịch hoặc hỗn hợp của dung dịch muối kim loại hoá trị hai bất kỳ của kim loại muối hoá trị hai có thể được sử dụng tương tự để điều chế phức chất ON chelat.

Do vậy, phức chất ON chelat có thể được điều chế từ các ON mà được phosphorothioat hóa hoàn toàn hoặc không, chứa số lượng liên kết được phosphorothioat hóa bất kỳ, chứa ít nhất một cải biến 2' riboza hoặc được cải biến 2' riboza hoàn toàn hoặc không chứa cải biến 2' riboza. Các ON có thể là ARN hoặc ADN hoặc thể lai chứa ARN và ADN. Muối kim loại được sử dụng trong chế phẩm của phức chất ON chelat bao gồm, nhưng không giới hạn ở, muối canxi, muối magiê, muối sắt, muối kim loại hoá trị hai bất kỳ khác.

Ví dụ VII

Chế phẩm của phức chất ON chelat ổn định trong nước muối thông thường

Với việc chứng minh được bản chất bảo toàn chung của sự tạo thành phức chất ON chelat và chế phẩm với các kim loại hoá trị hai khác nhau trong Ví dụ II và III, chế phẩm phức chất canxi ON chelat ổn định, tan, được kiểm tra trong nước muối thông thường, tá được thích hợp hơn để sử dụng phức chất ON chelat cho đối tượng. Đối với thử nghiệm này, 200 mg/ml dung dịch muối natri của REP 2006 trong nước muối thông thường được sử dụng làm nguồn ON. Nguồn canxi là dung dịch CaCl_2 10% trong WFI (100 mg/ml CaCl_2). Các phức chất chelat canxi REP 2006 khác nhau sử dụng nồng độ canxi và REP 2006 khác nhau được điều chế trong 1 ml dung dịch ở nhiệt độ trong phòng (xem Bảng 5) theo quy trình sau: 1) cho REP 2006 vào lọ nhỏ, 2) thêm nước muối thông thường và trộn

và 3) thêm CaCl_2 và trộn. Dung dịch chelat canxi REP 2006 được quan sát về bề ngoài của kết tủa qua 36 ngày (xem Bảng 6).

Bảng 5

Các điều kiện để điều chế các phức chất chelat canxi REP 2006 khác nhau.

[REP2006] (mg/ml)	CaCl ₂ (mg / 100 mg REP 2006)					
	15	20	25	30	35	40
100	500 ul REP 2006 + 350 ul NS + 150 ul CaCl ₂	500 ul REP 2006 + 300 ul NS + 200 ul CaCl ₂	500 ul REP 2006 + 250 ul NS + 250 ul CaCl ₂	500 ul REP 2006 + 200 ul NS + 300 ul CaCl ₂	500 ul REP 2006 + 150 ul NS + 350 ul CaCl ₂	500 ul REP 2006 + 100 ul NS + 400 ul CaCl ₂
50	250 ul REP 2006 + 675 ul NS + 75 ul CaCl ₂	250 ul REP 2006 + 650 ul NS + 100 ul CaCl ₂	250 ul REP 2006 + 625 ul NS + 125 ul CaCl ₂	250 ul REP 2006 + 600 ul NS + 150 ul CaCl ₂	250 ul REP 2006 + 575 ul NS + 175 ul CaCl ₂	250 ul REP 2006 + 550 ul NS + 200 ul CaCl ₂
25	125 ul REP 2006 + 837,5 ul NS + 37,5 ul CaCl ₂	125 ul REP 2006 + 825 ul NS + 50 ul CaCl ₂	125 ul REP 2006 + 812,5 ul NS + 62,5 ul CaCl ₂	125 ul REP 2006 + 800 ul NS + 75 ul CaCl ₂	125 ul REP 2006 + 787,5 ul NS + 87,5 ul CaCl ₂	125 ul REP 2006 + 775 ul NS + 100 ul CaCl ₂

Bảng 6

Sự tạo thành kết tủa trong phức chất chelat canxi REP 2006 ở các nồng độ ON và canxi khác nhau

Thời gian	[REP 2006] (mg/ml)	CaCl ₂ (mg / 100mg NAP					
		15	20	25	30	35	40
1 giờ	100	-	+	++	+++	+++	++++
	50	-	-	-	-	-	+
	25	-	-	-	-	-	-
24 giờ	100	-	+/	+++++	+++++	+++++	+++++
	50	-	-	-	-	+	+++++
	25	-	-	-	-	-	-
7 ngày	100	-	+/	+++++	+++++	+++++	+++++
	50	-	-	-	-	+++++	+++++
	25	-	-	-	-	-	-
36 ngày	100	+/	+/	+++++	+++++	+++++	+++++
	50	+/	+/	+/	+/	+++++	+++++
	25	-	-	-	-	-	-

- dung dịch sạch, trong suốt

+ lượng rất nhỏ kết tủa trắng ở đáy lọ nhỏ

++ kết tủa dạng keo mịn, hơi mờ

+++ kết tủa dạng keo mịn, đục

++++ kết tủa chủ yếu là ở đáy của ống nghiệm nhưng có mặt keo còn dư

+++++ kết tủa ở đáy, dung dịch còn lại là sạch và trong suốt

Trong tất cả các trường hợp, dung dịch chelat canxi REP 2006 đã chứng minh sức căng bề mặt giảm và độ nhớt tăng lên so với dung dịch REP 2006 khi vẩn mặt canxi (ở tất cả các nồng độ được thử nghiệm), như được thấy rõ bởi thấu kính mặt khum rõ ràng hơn trong lọ nhỏ và trong đặc tính dung dịch nhớt khi các lọ nhỏ đều được xoay ngược nhẹ nhàng. Đặc tính dung dịch này là phù hợp với sự tạo thành của phức multime lớn tan (phức chất chelat) như được biểu thị trên các Fig. 15 A-C. Ngay cả trong các lọ nhỏ trong đó kết tủa được tạo thành, dung dịch còn lại vẫn thể hiện sự tăng đặc trưng sức căng bề mặt và độ nhớt này. Có thể là chất kết tủa được tạo thành trong dung dịch này làm cho cấu trúc ON chelat bão hòa (và không tan) như được minh họa trên Fig. 15D phù hợp với ON không kết tủa còn lại và canxi vẫn tạo thành chelat tan trong dung dịch. Các đặc tính này được mong đợi là đại diện chung cho đặc tính phức chất ON chelat bất kỳ, không kể đến chiều dài ON, hóa học, cấu trúc (sợi đơn hoặc sợi đôi) hoặc kim loại hoá trị hai có mặt. Hơn nữa, các thử nghiệm này còn chứng tỏ rằng mặc dù nồng độ ON và canxi cao hơn có thể ban đầu tạo thành phức chất tan hoàn toàn, các phức chất này có thể không ổn định về mặt động học và chuyển tiếp dần từ phức chất chelat tan (như trên các Fig. 15 A-C) thành phức chất chelat không tan (Fig. 15D). Do đó, có thể mong muốn điều chế phức chất ON chelat ở nồng độ ON và kim loại như được thể hiện trong bảng 5 mà có phức chất ON chelat tan ổn định trong dung dịch. Với các hỗn hợp ON và kim loại khác nhau, nồng độ ON và kim loại tối ưu dẫn đến phức chất ON chelat tan mà vẫn tan được trong dung dịch theo thời gian có thể thay đổi từ các nồng độ này được thể hiện đối với REP 2006 và canxi trong bảng 5.

Ví dụ VI và VII mô tả các dạng kết hợp khác nhau của các nồng độ ON và muối kim loại hoá trị hai trong các tá dược khác nhau mà có thể là hữu dụng trong việc điều chế phức chất ON chelat và mô tả dạng kết hợp của ON và muối kim loại hoá trị hai hoặc hỗn hợp của các muối kim loại hoá trị hai mà tạo ra dung dịch phức chất ON chelat hoặc kết

tủa nhanh, hoặc kết tủa chậm hoặc tan hoàn toàn trong nước muối thông thường trong khoảng thời gian kéo dài. Có thể thuận lợi khi sử dụng dung dịch ON chelat có đặc điểm bất kỳ trong số các đặc điểm về độ ổn định này.

Do vậy, phức chất ON chelat có thể được điều chế sử dụng muối ON bất kỳ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, muối natri ON hoặc muối ON amoni hoặc hỗn hợp muối natri/amoni ON. Lý tưởng là, muối ON được hòa tan trong tá dược chứa nước bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nước để tiêm hoặc nước muối thông thường. Nguồn kim loại hoá trị hai được sử dụng để tạo thành ON chelat có thể là muối clorua, muối sulfat hoặc muối được dùng bất kỳ khác bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, muối gluconat, muối xitrat, muối lactat, muối malat, muối aspartat, muối fumarat, muối ascorbat, muối benzoat, muối erythorbat, và/hoặc muối propionat. Muối này có thể gồm cation kim loại bất kỳ trong số các cation kim loại hoá trị hai sau đây: canxi, magiê, sắt (2+), mangan, đồng và/hoặc kẽm. Ngoài ra, hỗn hợp của nhiều hơn một muối kim loại có thể được sử dụng. Muối kim loại này có thể được sử dụng trực tiếp ở dạng bột mà tốt hơn nếu được điều chế ở dạng dung dịch nước trong cùng tá dược khi ON được hòa tan vào. Muối kim loại có thể được điều chế ở nồng độ bất kỳ để hạn chế khả năng hòa tan muối kim loại trong tá dược. Tốt hơn nếu phức chất ON chelat được điều chế bằng cách bổ sung từ từ dung dịch muối kim loại vào dung dịch ON đồng thời trộn liên tục để ngăn ngừa sự tích tụ kết tủa ON chelat trong quá trình bổ sung dung dịch muối. Phụ thuộc vào nồng độ của ON và muối kim loại được sử dụng, dung dịch ON chelat có thể từ từ tạo thành kết tủa ON chelat theo thời gian hoặc vẫn tan hoàn toàn (xem Ví dụ VII).

Ví dụ VIII

Sự chelat hóa canxi huyết thanh bởi ON gây ra tác dụng chống đông máu.

Tác dụng chống đông của các ON cụ thể đã được mô tả trước đó nhưng để chứng minh tác dụng chống đông của phức chất ON chelat trong sáng chế này, ON không được đánh dấu FITC được điều chế ở dạng muối natri độ tinh khiết cao để tương thích về mặt sinh học. Các ON này là REP 2004, REP 2006, REP 2107 và REP 2031 (SEQ ID NO:4), đây là phiên bản chưa được đánh dấu của các ON được bộc lộ trong Ví dụ 1. Các ON này ở các nồng độ khác nhau (trong 500µl nước muối thông thường) được thêm vào 5ml toàn

bộ máu tươi của người được thu gom trong ống xitrat. Thời gian prothrombin (thông số được chấp nhận đối với trạng thái đông máu) trong điều kiện có mặt các ON này được đánh giá sử dụng phương pháp lâm sàng phòng thí nghiệm được chấp nhận và được so sánh với thời gian prothrombin trong điều kiện có mặt các thể tích bằng nhau của nước muối thông thường. Tác dụng tương đối đến sự đông tụ được biểu hiện dưới dạng tỷ số ($PTT_{oligo}:PTT_{nước\ muối\ thông\ thường}$) và được báo cáo dưới dạng tỷ lệ chuẩn (NR). NR bằng 1 chỉ tình trạng đông máu bình thường và NR lớn hơn 1 chỉ máu chống đông. Kết quả của các thử nghiệm này được minh họa trong Fig. 27. Với tất cả các ON được đánh giá, có sự tăng tác dụng chống đông phụ thuộc liều lượng.

REP 2055 (SEQ ID NO:6) là ON được phosphorothioat hóa 40mer với trình tự (AC)₂₀. Ảnh hưởng của việc bổ sung 2,5 mM muối natri của REP 2055 đến tình trạng đông máu được đánh giá như được nêu trên đây. Để xác định tác dụng chống đông có phải là do sự chelat hóa canxi từ máu hay không, tác dụng của các lượng bổ sung canxi (dưới dạng canxi clorua) khác nhau đến sự chống đông bị kích ứng bởi REP 2055 (SEQ ID NO:6) được quan sát. Các kết quả của thử nghiệm này được minh họa trên Fig. 28. Như được mong đợi từ các kết quả trên Fig. 27, REP 2055 2,5 mM (SEQ ID NO:6) gây ra tác dụng chống đông máu đáng kể. Tác dụng chống đông này bị ức chế một cách hiệu quả bằng cách bổ sung canxi và có thể được đảo ngược hoàn toàn ở nồng độ canxi clorua lớn hơn 2,25 mM. Những kết quả này đặc biệt gợi ý rằng tác dụng chống đông của oligonucleotit được điều tiết bởi sự tạo thành phức chất ON chelat trong máu sau khi sử dụng ON dẫn đến sự chelat hóa canxi như được nêu trong các ví dụ trên đây. Hơn nữa, những kết quả này còn xác định phương pháp ngăn ngừa tác dụng chống đông máu bởi ON mà làm trung hòa tác dụng chelat hóa ON được sử dụng bằng cách điều chế ON dưới dạng phức chất chelat canxi. Bước trung hòa sự chelat hóa canxi cũng có thể thu được với phức chất ON chelat được điều chế sử dụng muối của kim loại hoá trị hai khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở: magiê, mangan, sắt (2+), đồng, và/hoặc kẽm. Các phương pháp ức chế tác dụng chống đông được điều tiết bởi oligonucleotit này có thể được mong đợi là hữu hiệu với oligonucleotit được đưa vào đối tượng là người hoặc không phải người bằng con đường IV hoặc các con đường sử dụng khác.

Kết quả của các thử nghiệm này đưa ra vấn đề về bản chất các tương tác của ON với các protein huyết thanh. Giả thuyết trước đó về bản chất của sự chống đông ON là các ON tương tác trực tiếp với các protein của tầng đông tụ nhưng các tác giả sáng chế lưu ý rằng phần lớn các protein này là các protein liên kết canxi hoặc các protein có liên quan đến tầng đông tụ phụ thuộc canxi (Sheerhan và Lan, 1998, Blood 92: 1617). Thực tế rằng tác dụng chống đông máu của ON có thể được trung hoà bằng cách bổ sung canxi và thực tế rằng các ON đóng vai trò làm chất chelat hóa canxi gợi ý các điều sau:

- Protein ON liên kết liên quan đến tác dụng chống đông có thể là cần nhưng không đủ cho tác dụng chống đông - việc loại bỏ canxi khỏi các protein phụ thuộc canxi qua sự chelat hóa của nó bởi ON có thể là cơ chế mà nhờ đó các ON thể hiện hoạt tính chống đông.
- Các tương tác protein ON với các thành phần của tầng đông có thể tự nó là phụ thuộc canxi.

Albumin, protein chủ yếu trong máu, cũng liên kết với canxi và là một phần của cơ chế điều hòa canxi huyết thanh. Albumin cũng đã được biết là tương tác với ON và có thể đóng vai trò chính trong chu kỳ bán rã tuần hoàn của ON trong máu. Từ các kết quả của thử nghiệm chống đông trên đây, có vẻ là số lượng lớn các tương tác protein trong máu có thể được xúc tác phần lớn bởi chức năng chelat hóa canxi của ON. Do vậy, để giảm tương tác protein huyết thanh cũng như có thể có tác dụng làm giảm chu kỳ bán rã tuần hoàn của ON và cải thiện khả năng dung nạp của chúng khi sử dụng ngoài đường tiêu hóa, ON có thể được sử dụng cho đối tượng dưới dạng phức chất ON chelat. Các phức chất này có thể được điều chế từ muối canxi nhưng cũng có thể được điều chế từ muối kim loại thích hợp khác để làm trung hòa xu hướng chelat hóa canxi đối với ON khi được dùng. Phức chất này đã có hoạt tính chelat hóa của chúng được trung hoà và do đó được mong đợi là có sự tương tác với các protein huyết thanh được giảm đáng kể. Các ưu điểm từ việc tương tác protein huyết thanh giảm này là khả năng dung nạp ON được sử dụng (dưới dạng phức chất chelat) được cải thiện và chu kỳ bán rã ngắn hơn của ON tự do trong máu.

Ví dụ IX

Sự phát triển và ngăn ngừa giảm canxi huyết ở đối tượng là người với việc điều trị bằng ON thường xuyên

Để kiểm tra thêm xem sự chelat hóa cation kim loại hoá trị hai bởi ON được bọc lộ trong các ví dụ trên đây có tương quan sinh học ở đối tượng là người hay không, tác dụng của việc sử dụng ON thường xuyên đến canxi huyết thanh được kiểm tra ở bệnh nhân mắc bệnh gan mãn tính. Các đối tượng này là đặc biệt phù hợp để kiểm tra tác dụng sinh học (nếu có) của sự chelat hóa ON khi họ được thể hiện là mắc chứng thiếu vitamin D mà thường đi kèm với các rối loạn chuyển hóa khoáng chất và mật độ khoáng chất trong xương bị thấp (Arteh và các đồng tác giả, 2010, *Dig. Dis. Sci.*, 55: 2624-2628 và George và các đồng tác giả, 2009 *World J Gastroenterol.*, 15: 3516-3522). Như vậy, nếu tác dụng chelat hóa ON được sử dụng thường xuyên làm thay đổi tính nội cân bằng của kim loại hoá trị hai (như canxi) trong đối tượng là người, tác dụng làm thay đổi này sẽ được quan sát một cách dễ dàng nhất ở các bệnh nhân này khi họ ít có khả năng chống lại bất kỳ sự mất cân bằng kim loại trong huyết thanh nào nếu nó xảy ra. Bệnh nhân bị nhiễm viêm gan B mãn tính (với bệnh gan mãn tính được chẩn đoán) được điều trị một lần một tuần bằng ON REP 2055 (SEQ ID NO:6) (dưới dạng muối natri mức GMP) bằng cách truyền IV chậm trong nước muối thông thường. Tổng mức canxi huyết thanh được theo dõi ở các đối tượng bởi các phương pháp phòng thí nghiệm lâm sàng được chấp nhận. Hai đối tượng đầu tiên nhận sự điều trị bằng ON tiến triển chứng giảm canxi huyết đáng kể trong 12 tuần điều trị (Fig. 29A). Sự giảm canxi huyết này thay đổi về mức độ nghiêm trọng nhưng vẫn giữ nguyên sau trong 13 tuần sau điều trị. Các đối tượng sau nhận sự điều trị ON thường xuyên với REP 2055 (SEQ ID NO:6) được cho sử dụng chất khoáng bổ sung (cung cấp canxi, magiê và kẽm) để chống lại tác dụng chelat hóa của việc điều trị ON. Không đối tượng nào nhận khoáng chất bổ sung tiến triển chứng giảm canxi huyết trong khi điều trị bằng ON (Fig. 29B). Những kết quả này chứng minh hoạt tính chelat hóa của ON xuất hiện ở đối tượng là người. Điều này được quan sát trực tiếp với canxi huyết thanh nhưng cũng có thể xảy ra với các cation kim loại hoá trị hai có tương quan sinh học khác như magiê, kẽm và đồng). Ngoài ra, các thiếu hụt kim loại gây ra bởi tác dụng chelat hóa ON có thể được sửa chữa bằng sự bổ sung khoáng chất và cũng có thể được giảm bằng cách sử dụng ON dưới dạng phức chất chelat.

Vì ON đã được thể hiện là chelat hóa cation kim loại hoá trị hai ở đối tượng là người, việc sử dụng ON chưa được chelat hóa có thể hữu dụng để chelat hóa các kim loại nặng có hại ở đối tượng như thủy ngân, cadimi, chì hoặc thậm chí cả crom (6+). Phương pháp này sẽ bao gồm bước sử dụng muối ON được dụng trong tá dược thích hợp, ON này được thiết kế để không có tính năng phụ thuộc trình tự (như, nhưng không giới hạn ở, các ON có trình tự cụ thể được bộc lộ trong Ví dụ III), tốt hơn nếu là bằng con đường sử dụng IV, nhưng cũng có thể bằng các con đường ngoài đường tiêu hóa khác. Bệnh nhân có chức năng gan bình thường sẽ được mong đợi là có thể chống lại sự chelat hóa canxi có thể xảy ra, tuy nhiên sự bổ sung khoáng chất có thể được đưa ra (như trong Ví dụ IX) để đảm bảo ngăn chặn được sự cạn kiệt cation hoá trị hai quan trọng về mặt sinh học trong huyết thanh. Các ON chưa được chelat hóa sẽ tách các kim loại nặng có mặt trong máu, làm giảm hoặc loại bỏ ngay lập tức tác dụng có hại của các kim loại này và cũng thúc đẩy hiệu quả sự loại bỏ chúng khỏi đối tượng đang nói đến.

Vì đã chứng minh được rằng ON sợi đôi cũng có thể tạo thành phức chất ON chelat (và do vậy cũng tách các kim loại hoá trị hai), được dự định rằng việc sử dụng axit nucleic sợi đôi bất kỳ (ví dụ siARN) cũng sẽ được mong đợi là có ít nhất một vài trong số các tác dụng chelat hóa được mô tả cho ON sợi đơn trong ví dụ trên đây. Do vậy, có thể là có lợi khi điều chế ON sợi đôi dưới dạng phức chất chelat trước khi sử dụng.

Ví dụ X

Phức chất ON chelat có thể ức chế phản ứng tại vị trí tiêm của oligonucleotit được cấp dưới da

Phản ứng tại vị trí tiêm (ISR) với oligonucleotit được đưa vào qua đường dưới da ở người bệnh là phổ biến, ngay cả với oligonucleotit được cải biến mức độ cao để làm giảm đến mức tối thiểu các tính chất kích thích miễn dịch của chúng. Vì việc sử dụng dưới da gồm tiêm oligonucleotit độ đậm đặc cao (thường > 100mg/ml), tác dụng chelat hóa (thích hợp nhất là canxi nhưng cũng có thể là các kim loại hoá trị hai khác như magiê) được định vị xung quanh vị trí tiêm cần phải lớn và có thể góp phần vào ISR được quan sát thông thường. Để kiểm tra giả thuyết này, REP 2055 (SEQ ID NO:6) hoặc REP 2139 (SEQ ID NO: 13, REP 2055 chất tương tự có tất cả các ribosa 2' O metyl hóa và tất cả các

xytosin bazơ 5' được metyl hóa) được cấp bằng con đường sử dụng dưới da cho bệnh nhân là người. Cả hai dung dịch được điều chế vô trùng trong nước muối thông thường, hoặc ở dạng muối natri hoặc ở dạng phức chất chelat canxi (xem Bảng 7 và 8 và theo quy trình trong Ví dụ VIII). Để kiểm soát sự thay đổi giữa người bệnh này với người bệnh khác, cả hai chế phẩm của mỗi ON được đánh giá tính phản ứng tiêm trong cùng đối tượng người. Các đối tượng được theo dõi ISR ở từng vị trí tiêm trong 12 giờ sau khi sử dụng REP 2055 (SEQ ID NO:6) và trong 72 giờ sau khi sử dụng REP 2139 (SEQ ID NO:13). Các kết quả thử nghiệm được trình bày trong bảng 7 và 8.

Bảng 7

Sự ức chế tính phản ứng tại vị trí tiêm của REP 2055 (SEQ ID NO:6) bởi chế phẩm của nó dưới dạng phức chất chelat canxi (1cc tiêm nhanh 1 liều, 20mg CaCl₂ / 100mg ON)

Đối tượng người	Phản ứng tại vị trí tiêm 25mg REP 2055 (SEQ ID NO:6); 12 giờ sau khi tiêm		
	25 mg REP 2055 (muối natri)	25 mg REP 2055 (<u>Ca</u> chelat)	100 mg REP 2055 (<u>Ca</u> chelat)
1	Chai cứng: +++ Viêm: +++ Nhạy cảm đau: ++ Đau: ++	Chai cứng: không Viêm: không Nhạy cảm đau: không Đau: không	Chai cứng: + Viêm: không Nhạy cảm đau: không Đau: không
2	Chai cứng: +++ Viêm: +++ Nhạy cảm đau: +++ Đau: +++	Không được đánh giá	Chai cứng: + Viêm: ++ Nhạy cảm đau: không Đau: không

Bảng 8

Sự ức chế tính phản ứng tại vị trí tiêm của REP 2139 (SEQ ID NO:13) bởi chế phẩm của nó dưới dạng phức chất chelat canxi (2cc tiêm nhanh 1 liều, 30mg CaCl₂ / 100mg ON)

Đối tượng người	Phản ứng tại vị trí tiêm 100mg REP 2139 (SEQ ID NO:13)			
	Tác dụng	24 giờ	48 giờ	72 giờ

	phụ ISR	Muối natri	Chelat canxi	Muối natri	Chelat canxi	Muối natri	Chelat canxi
1	Chai cứng	++	-	++	-	+	-
	Viêm	++	+	++	-	+	-
	Nhạy cảm đau	+	-	+	-	-	-
	Đau	+	-	-	-	-	-
2	Chai cứng	++	+	++	+/-	+	-
	Viêm	+++	+	++	+/-	+	-
	Nhạy cảm đau	+	-	+/-	-	-	-
	Đau	+	-	+/-	-	+/-	-

Những kết quả này chứng tỏ rằng việc sử dụng ON ở dạng phức chất chelat canxi về cơ bản là làm giảm hoặc loại bỏ ISR với hai ON được đưa vào dưới da khác nhau. Những kết quả này còn chứng tỏ rằng sự chelat hóa canxi (và các kim loại hoá trị hai có thể khác) bởi ON đóng vai trò trong sự biểu hiện các ISR thường có liên quan đến ON sử dụng dưới da. Ngoài ra, những kết quả này xác định phương pháp ngăn ngừa ISR với ON được cấp dưới da bất kỳ bằng cách thực hiện việc cấp ON dưới dạng phức chất chelat. Trong các ví dụ này, canxi được sử dụng làm chất dẫn thuốc để tạo thành phức chất chelat nhưng sự làm dịu ISR cũng sẽ được mong đợi là xảy ra với phức chất ON chelat mà được điều chế với kim loại hoá trị hai thích hợp khác canxi. Phức chất ON kim loại chelat bất kỳ sẽ được mong đợi là xu hướng chelat hóa canxi được trung hoà mà sẽ là cơ chế ưu tiên cho khả năng dung nạp SC của ON được cải thiện khi được dùng dưới dạng phức chất chelat. Khả năng ức chế các ISR bị kích ứng bởi oligonucleotit của phức chất ON chelat được dự định là hữu hiệu với bất kỳ ON có trình tự cụ thể nào và hoặc cải biến hoặc ON sợi đơn hoặc sợi đôi vì bản chất được bảo toàn rộng của sự tạo thành phức chất ON chelat được nêu trong các ví dụ trong bản mô tả. Khi sử dụng canxi làm kim loại hoá trị hai mẫu trong ví dụ này, các muối canxi khác có thể được sử dụng trong chế phẩm phức chất ON chelat và được mong đợi là tạo thành phức chất ON chelat có cùng tác dụng ức chế lên

ISR được điều tiết bởi oligonucleotit với việc sử dụng dưới da bao gồm, nhưng không giới hạn ở, canxi gluconat, canxi xitrat, canxi lactat, canxi malat, canxi aspartat, canxi fumarat, canxi ascorbat, canxi benzoat, canxi erythorbat, và/hoặc canxi propionat. Phức chất ON chelat có thể được điều chế với muối của cation kim loại hoá trị hai khác như nhưng không giới hạn ở: magiê, mangan, sắt, đồng, kẽm.

Trong việc điều chế các phức chất ON chelat, có thể mong muốn sử dụng các cation khác mà không phải là nguyên tử hoá trị hai mà có thể ngăn ngừa tương tự tác dụng chelat hóa của oligonucleotit. Phức chất ON chelat được điều chế với các cation này cũng có thể được sử dụng trong chế phẩm để ức chế tác dụng chống đông bởi ON hoặc ức chế phản ứng tại vị trí tiêm với ON khi được dùng dưới da hoặc để ngăn ngừa sự tách kim loại hoá trị hai quan trọng về mặt sinh học sau khi sử dụng ON. Các ion trái dấu này có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở: nguyên tử có trạng thái điện tích 3+ hoặc lớn hơn hoặc các cation hữu cơ.

Trong quy trình điều chế phức chất ON chelat, có thể tốt hơn là điều chế ON chelat sử dụng hỗn hợp cation hoá trị hai (tức là với muối canxi và magiê). Các hỗn hợp ON chelat này có thể dễ dàng sản xuất hơn và có khả năng hòa tan lớn hơn so với các chelat được điều chế với cation hoá trị hai đơn và do đó sẽ thích hợp hơn với các ứng dụng ở nồng độ cao.

Dựa vào các ví dụ được đưa ra trên đây sử dụng các trình tự ON khác nhau, với các cải biến khác nhau và ở trạng thái sợi đơn hoặc sợi đôi và sử dụng các kim loại hoá trị hai khác nhau, sự tạo thành của phức chất ON chelat có thể được xem là dấu hiệu chung của bất kỳ và tất cả các ON mà có mạch chính phosphodiester (dù được phosphorothioat hóa hoặc không), không quan tâm đến các cải biến khác. Như vậy, sự tạo thành các phức chất ON chelat trong máu hoặc khoảng dưới da là dấu hiệu thông thường sử dụng ON bất kỳ khi ON được cấp dưới dạng muối (thường là muối natri), dẫn đến sự tách cation kim loại hóa trị hai mặc dù tác dụng thứ cấp của sự chelat hóa này có thể là không có triệu chứng ở tập hợp đối tượng cụ thể nhận ON đang nói đến. Quan trọng là, có một số ví dụ về ON (PRO-051/GSK2402968 - Goemans và các đồng tác giả, 2011 New England J. Med., 364: 1513-1522 và ISIS 301012 (mipomersen) - Viser và các đồng tác giả, 2010,

Curr. Opin. Lipidol. 21 : 319-323) thể hiện rõ phản ứng ISR với việc sử dụng dưới da (dưới dạng muối natri) mà là tương tự với ISR quan sát được trong Ví dụ IX và do đó là chẩn đoán về sự tạo thành phức chất ON chelat sau khi sử dụng.

Mặc dù cả hai ON có các trình tự khác nhau và các cải biến 2' ribosa khác nhau, chúng đều có mạch chính phosphodiester (trong cả hai trường hợp được phosphorothioat hóa) và vì vậy có thể tạo thành phức chất ON chelat và tách kim loại hóa trị hai từ môi trường khu trú (trong trường hợp này là khoảng dưới da). Hơn nữa, cả hai ON được thể hiện là có thể gây ra tác dụng sinh học của chúng mặc dù sự chelat hóa ON phải xảy ra, do vậy phức chất ON chelat trong hệ sinh học không can thiệp vào hoạt tính sinh học của ON.

Được chấp nhận rộng rãi và đã được chứng minh rõ trong lĩnh vực rằng tất cả ON được phosphorothioat hóa (không kể trình tự nucleotit) thường nhận được nồng độ thuốc cao nhất ở thận và gan. Về mặt lịch sử, việc sử dụng thường xuyên nhiều ON được phosphorothioat hóa khác nhau liên quan đến rối loạn chức năng gan hoặc thận dạng nhẹ. Mặc dù nguyên nhân của các rối loạn chức năng không được giải thích rõ ràng, căn cứ vào tác dụng chelat hóa được bảo toàn của ON nhìn chung, có thể là sự chelat hóa kim loại hóa trị hai trong gan và thận là đáng kể khi sử dụng ON thường xuyên bởi hoạt tính chelat hóa có thể là nổi bật nhất trong các cơ quan này do có mặt nồng độ cao của ON. Sử dụng ON dưới dạng phức chất chelat sẽ không làm thay đổi sự phân bố sinh học trong cơ quan (hoặc ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học như được thể hiện trên đây) nhưng có thể có vai trò ngăn ngừa các thiếu hụt kim loại trong gan và thận mà có tác động đến chức năng bình thường của các cơ quan này.

Coi rằng phức chất ON chelat dẫn đến sự tạo thành của phức chất ON multimer trong dung dịch, các phức chất này là có thể tính kháng lớn hơn với sự phân rã nucleaza và có khả năng thủy phân và các phosphorothioat ON cũng có thể kháng tốt hơn với sự oxy hóa. Do vậy, việc lưu giữ ON bất kỳ dưới dạng phức chất chelat có thể làm tăng đáng kể độ ổn định của nó trong dung dịch nước mà không làm thay đổi đáng kể hoạt tính sinh học của nó khi được dùng cho đối tượng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phức chất oligonucleotit chelat chứa hai hoặc nhiều hơn hai oligonucleotit được liên kết bởi cation đa hóa trị trong đó ít nhất một oligonucleotit của phức chất này có ít nhất một liên kết phosphorothioat.
2. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm 1, trong đó cation đa hóa trị là cation kim loại hóa trị hai.
3. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm 2, trong đó cation đa hóa trị là kim loại kiềm thổ có trạng thái điện tích 2+.
4. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm 2, trong đó cation kim loại hóa trị hai là kim loại chuyển tiếp có trạng thái điện tích 2+.
5. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm 2, trong đó cation kim loại hóa trị hai là kim loại họ lanthan có trạng thái điện tích 2+.
6. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm 2, trong đó cation kim loại hóa trị hai là kim loại sau chuyển tiếp có trạng thái điện tích 2+.
7. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm 2, trong đó cation kim loại hóa trị hai là canxi, magie, coban, sắt (2+), mangan, đồng hoặc kẽm.
8. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó phức chất chelat này chứa hai hoặc nhiều hơn hai cation kim loại hóa trị hai khác nhau.
9. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó phức chất chelat này chứa ít nhất một oligonucleotit sợi đôi.
10. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó phức chất chelat này chứa ít nhất một oligonucleotit phosphorothioat hóa hoàn toàn.
11. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó phức chất chelat này chứa ít nhất một oligonucleotit có một ribosa được biến đổi ở vị trí 2'.
12. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó phức chất chelat này chứa ít nhất một oligonucleotit có mỗi ribosa được 2' O-metyl

hóa.

13. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12 được làm cho phù hợp với việc sử dụng qua đường dưới da.

14. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12 được làm thích hợp với ít nhất một trong số các con đường sử dụng sau đây: trong mắt, ăn vào qua miệng, qua ruột, xông, tiêm qua da, tiêm trong tĩnh mạch, tiêm trong bụng, tiêm nội tủy mạc, truyền nội tủy mạc, trong khí quản, tiêm trong tĩnh mạch, truyền trong tĩnh mạch, tiêm trong hộp sọ, truyền trong hộp sọ và tại chỗ.

15. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm 14, trong đó con đường sử dụng qua đường xông là phun sương.

16. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó phức chất chelat này chứa oligonucleotit được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 3 đến 14.

17. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó phức chất chelat này chứa oligonucleotit được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 3 đến 14 và trong đó oligonucleotit này được phosphorothioat hóa hoàn toàn.

18. Chế phẩm oligonucleotit để sử dụng dưới da, chế phẩm này chứa phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17.

19. Dược phẩm chứa phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17 hoặc chế phẩm oligonucleotit theo điểm 18 và chất mang.

20. Phương pháp điều chế phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, chế phẩm oligonucleotit theo điểm 18 hoặc dược phẩm theo điểm 19, phương pháp này gồm bước hòa tan muối natri oligonucleotit bất kỳ trong tá dược chứa nước được dụng, và thêm từ từ dung dịch muối kim loại hóa trị hai vào oligonucleotit đã hòa tan này sao cho phức chất oligonucleotit chelat thu được vẫn có khả năng hòa tan.

21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó nồng độ oligonucleotit hòa tan nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100mg/ml trước khi bổ sung muối kim loại.

22. Phương pháp theo điểm 20, trong đó tỷ lệ muối kim loại được bổ sung vào oligonucleotit hòa tan nằm trong khoảng từ 0,1 đến 40mg muối hóa trị hai với mỗi 100mg oligonucleotit.
23. Phương pháp theo điểm 20, trong đó nồng độ oligonucleotit cuối nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mg/ml.
24. Phương pháp theo điểm 20, trong đó muối kim loại là ít nhất một trong số các muối clorua, muối gluconat, muối xitrat, muối lactat, muối malat, muối aspartat, muối fumarat, muối ascorbat, muối benzoat, muối erythorbat và muối propionat.
25. Phương pháp theo điểm 20, trong đó dung dịch muối kim loại chứa ít nhất một trong số các kim loại canxi, magie, coban, sắt (2+), mangan, đồng và kẽm.
26. Phương pháp làm ổn định oligonucleotit trong dung dịch nước gồm bước điều chế oligonucleotit này dưới dạng phức chất chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, chế phẩm oligonucleotit theo điểm 18 hoặc được phẩm theo điểm 19.
27. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 20 đến 26, trong đó phức chất chelat này là phức chất canxi chelat.
28. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 20 đến 26, trong đó phức chất chelat này là phức chất magie chelat.
29. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 20 đến 26, trong đó phức chất chelat này là hỗn hợp phức chất magie/canxi chelat.
30. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó phức chất này gồm phức chất oligonucleotit canxi chelat.
31. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, gồm phức chất oligonucleotit magie chelat.
32. Phức chất oligonucleotit chelat theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, gồm phức chất oligonucleotit canxi/magie chelat.

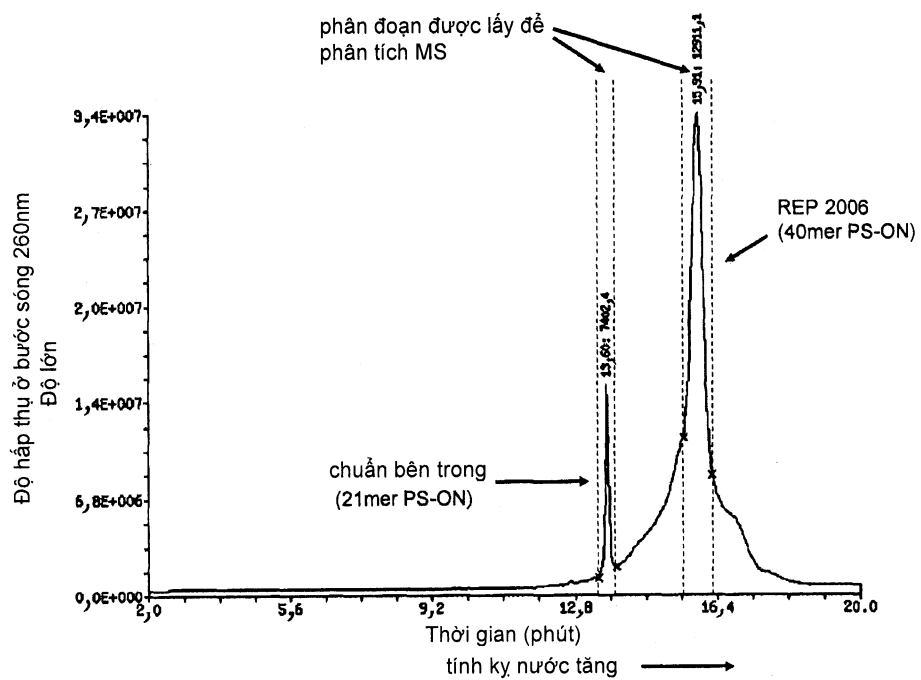


Fig. 1A

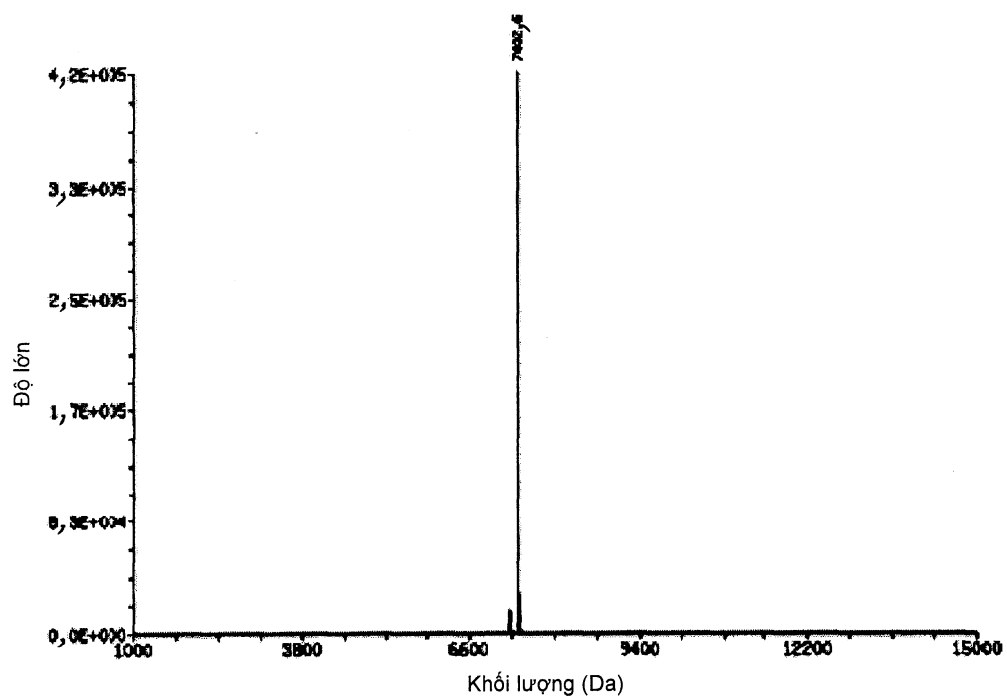


Fig. 1B

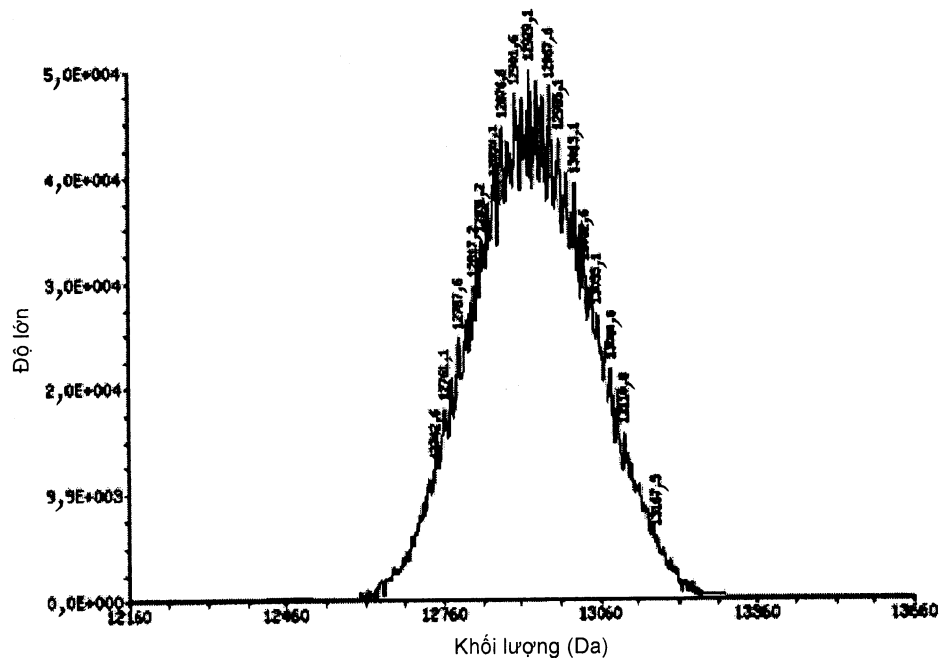


Fig. 1C

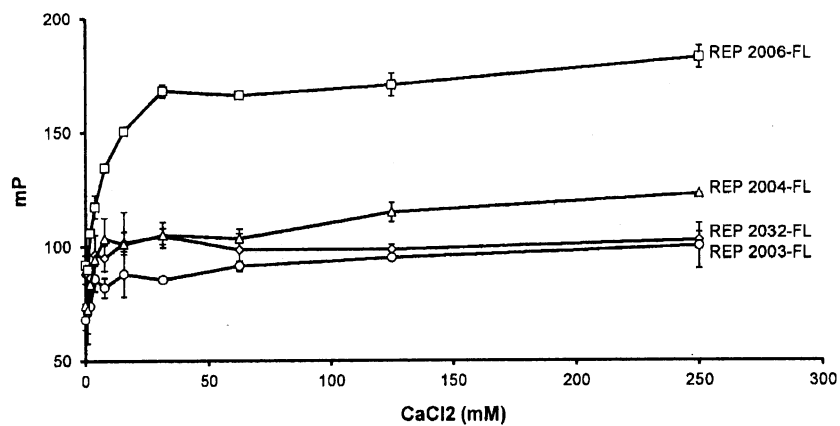


Fig. 2A

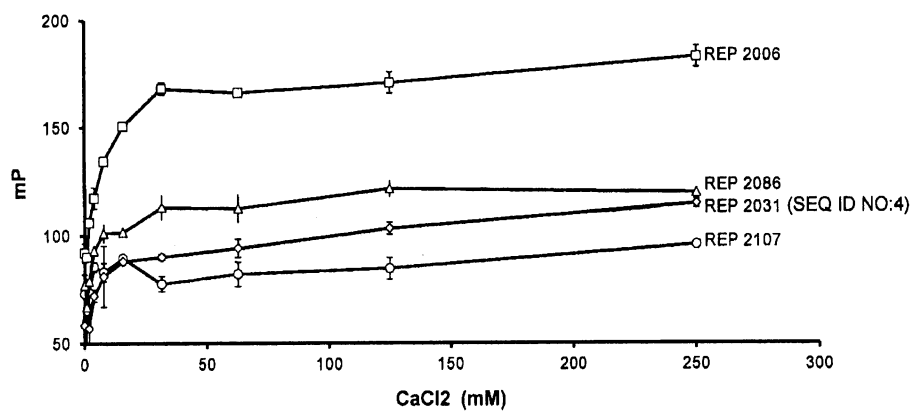


Fig. 2B

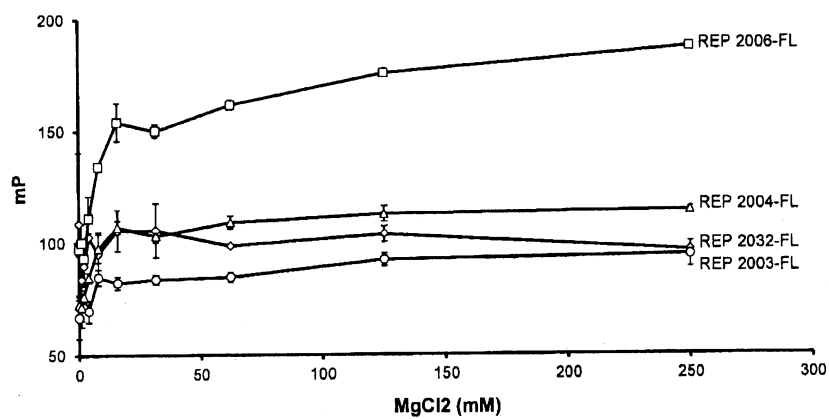


Fig. 3A

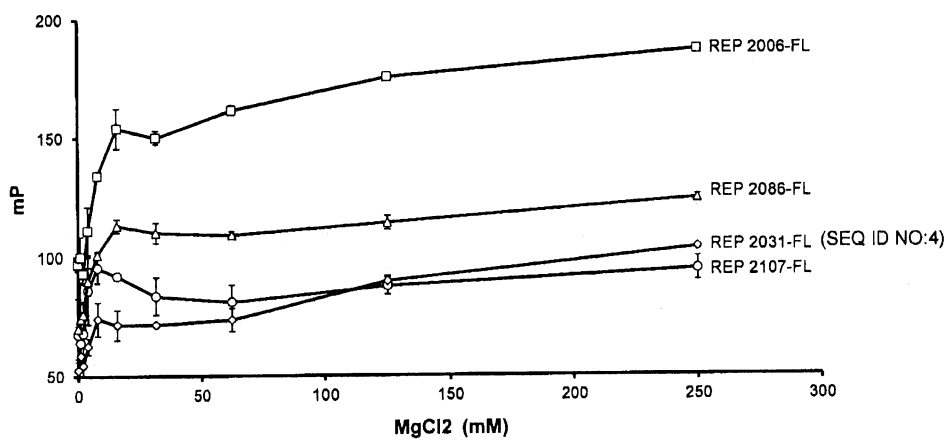


Fig. 3B

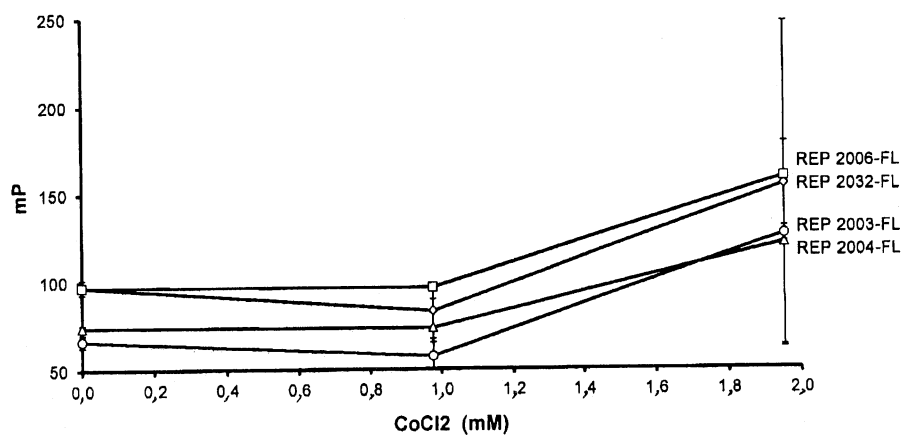


Fig. 4A

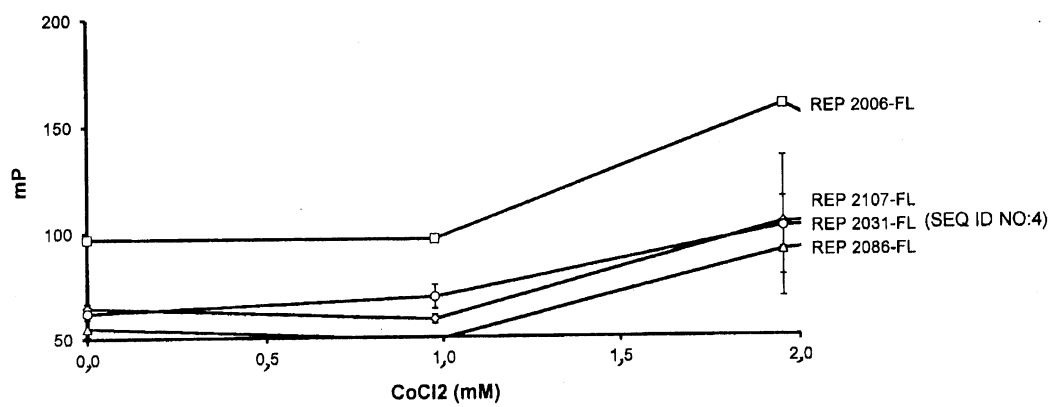


Fig. 4B

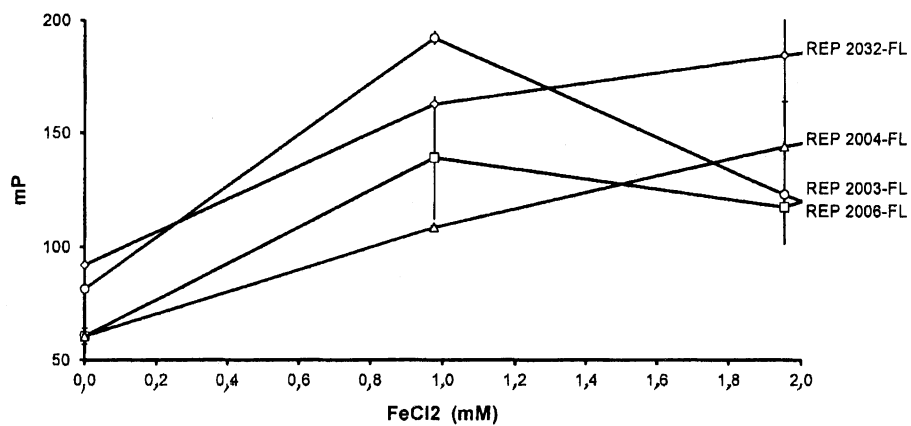


Fig. 5A

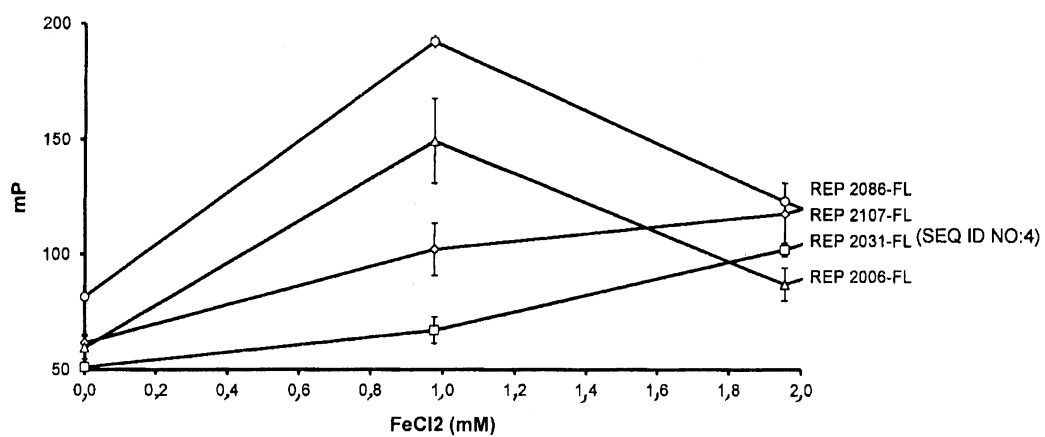


Fig. 5B

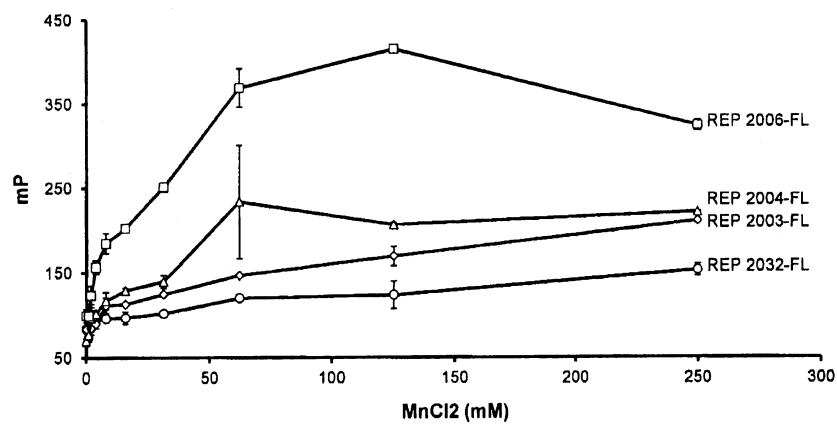


Fig. 6A

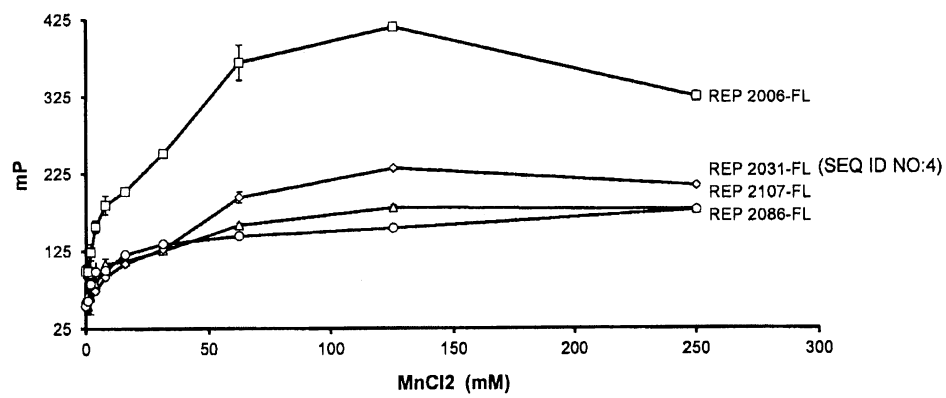


Fig. 6B

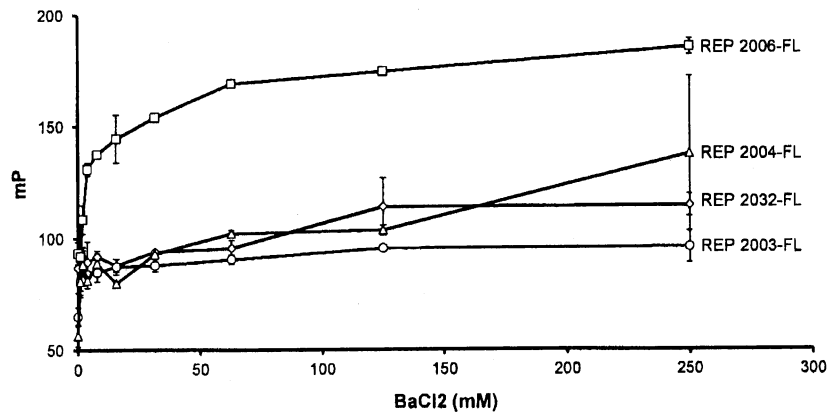


Fig. 7A

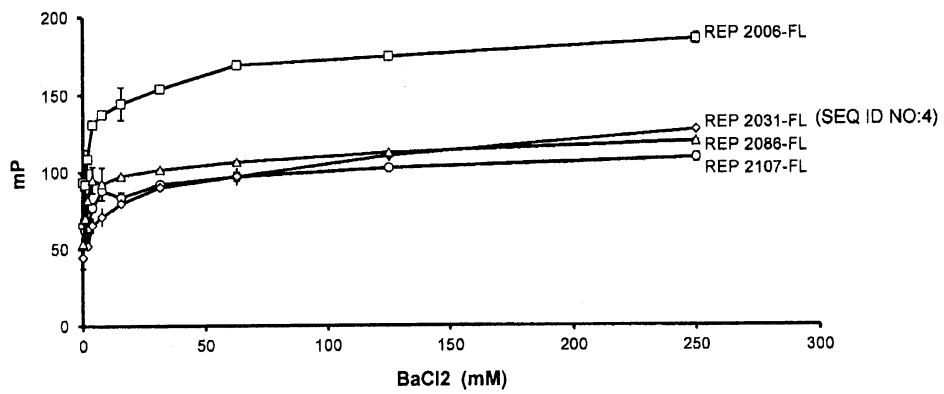


Fig. 7B

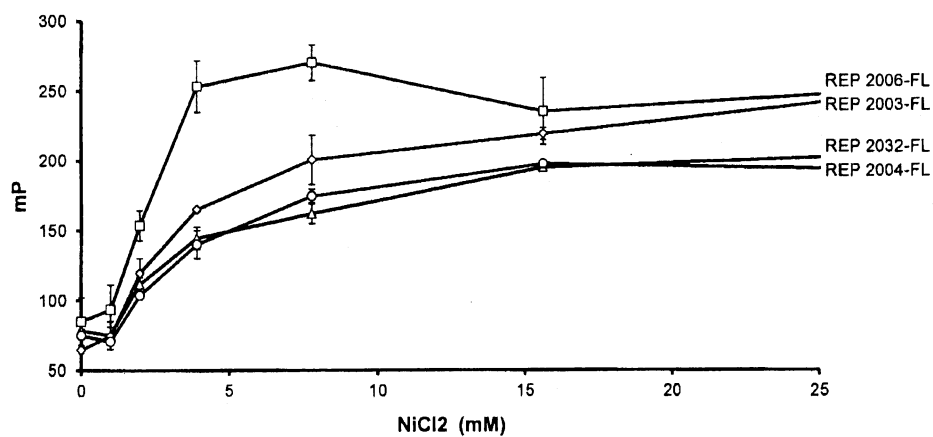


Fig. 8A

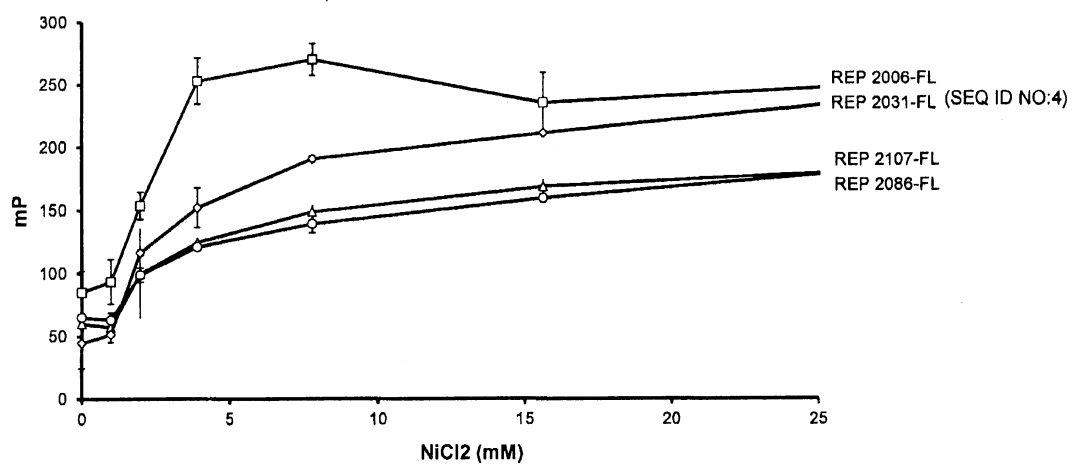


Fig. 8B

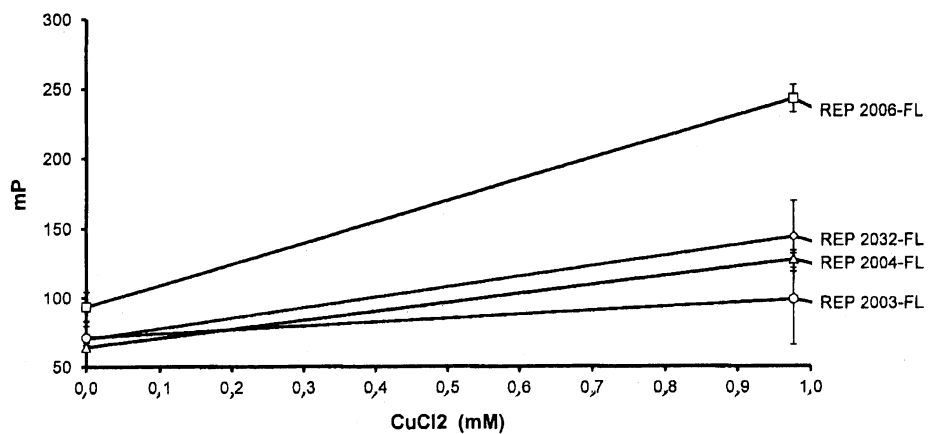


Fig. 9A

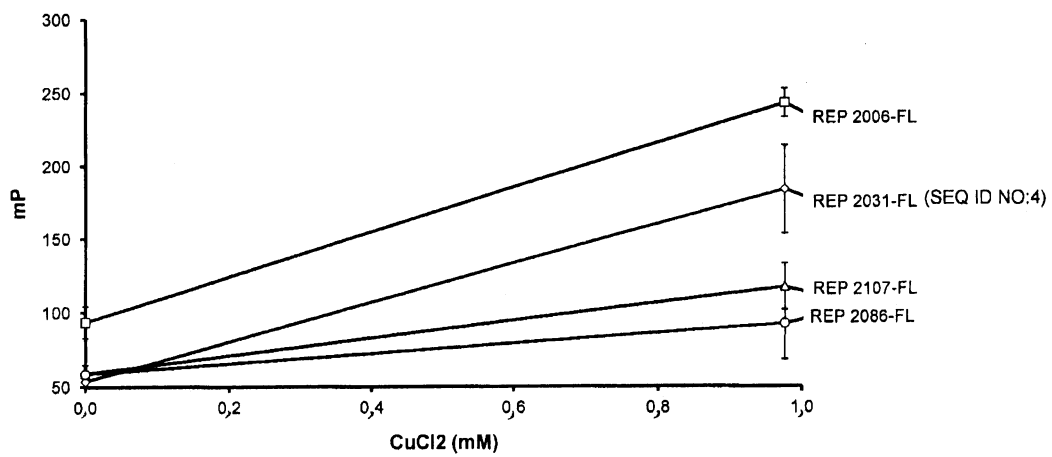


Fig. 9B

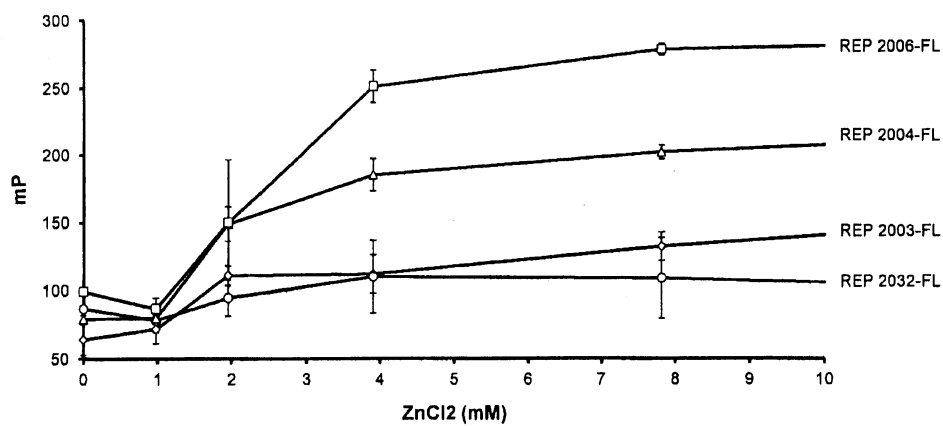


Fig. 10A

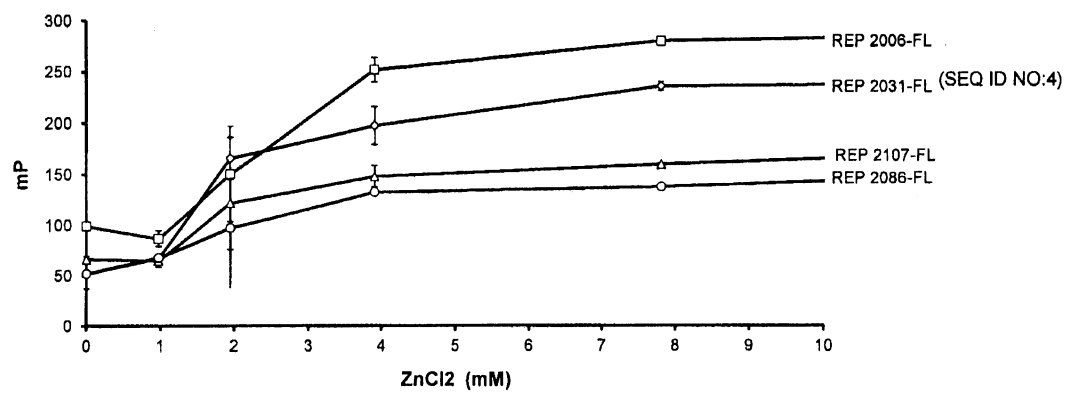


Fig. 10B

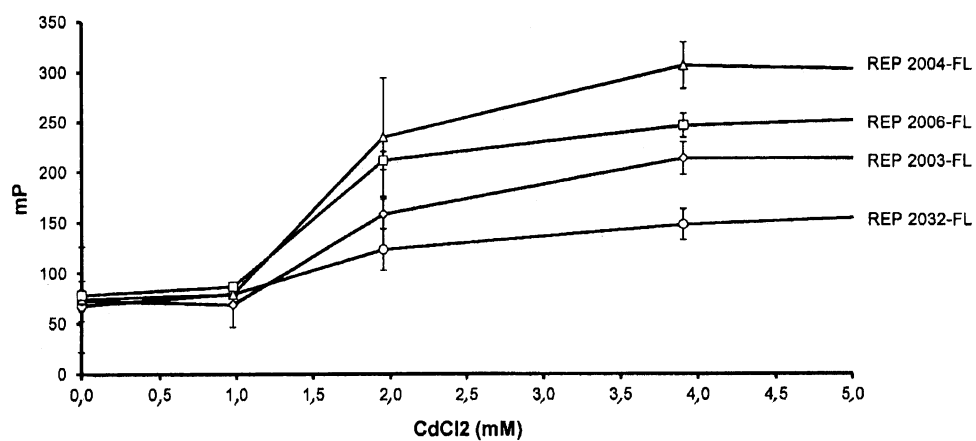


Fig. 11A

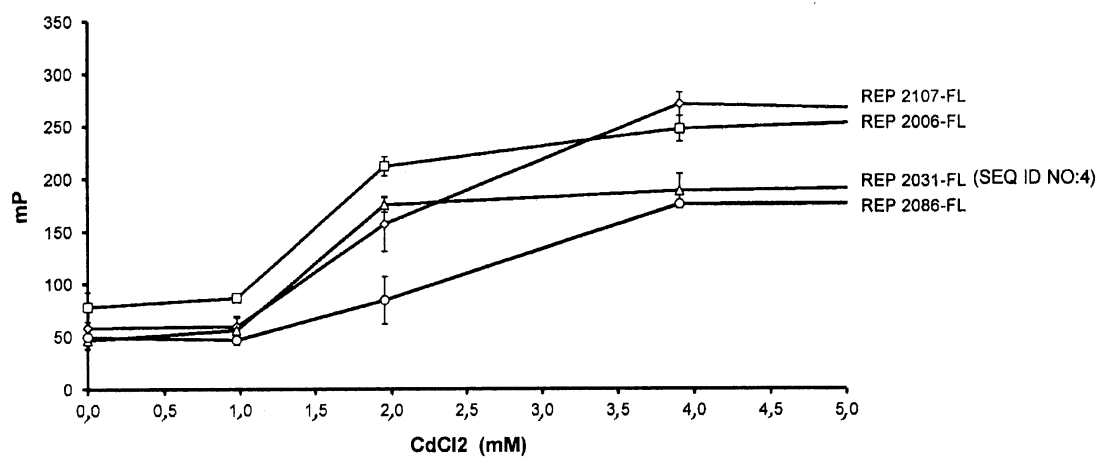


Fig. 11B

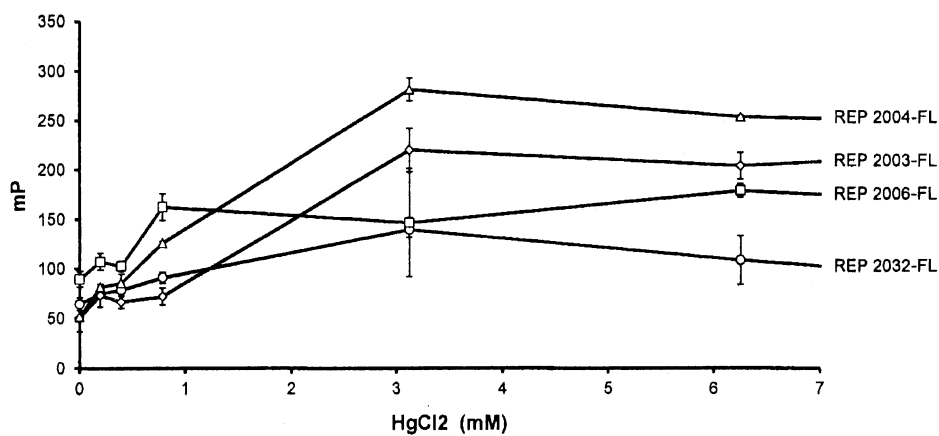


Fig. 12A

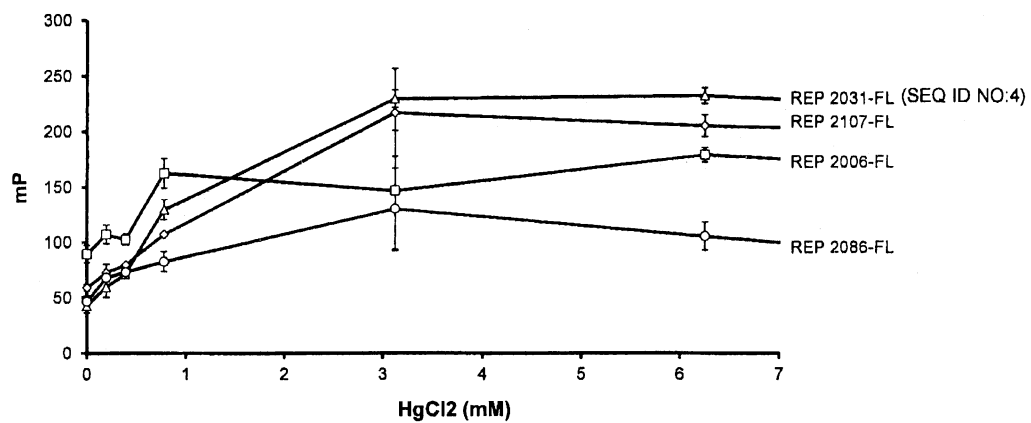


Fig. 12B

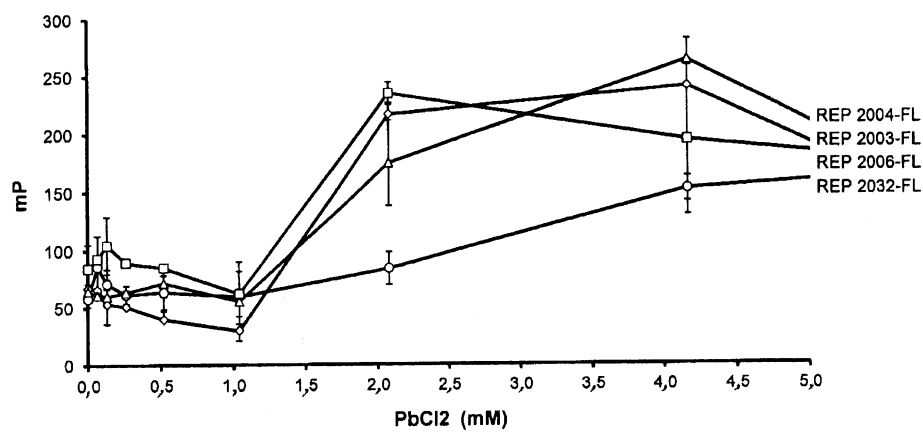


Fig. 13A

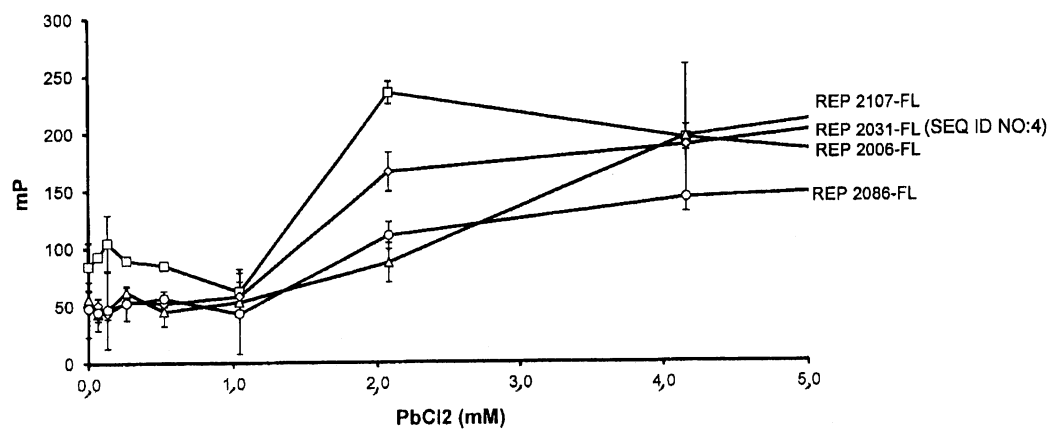


Fig. 13B

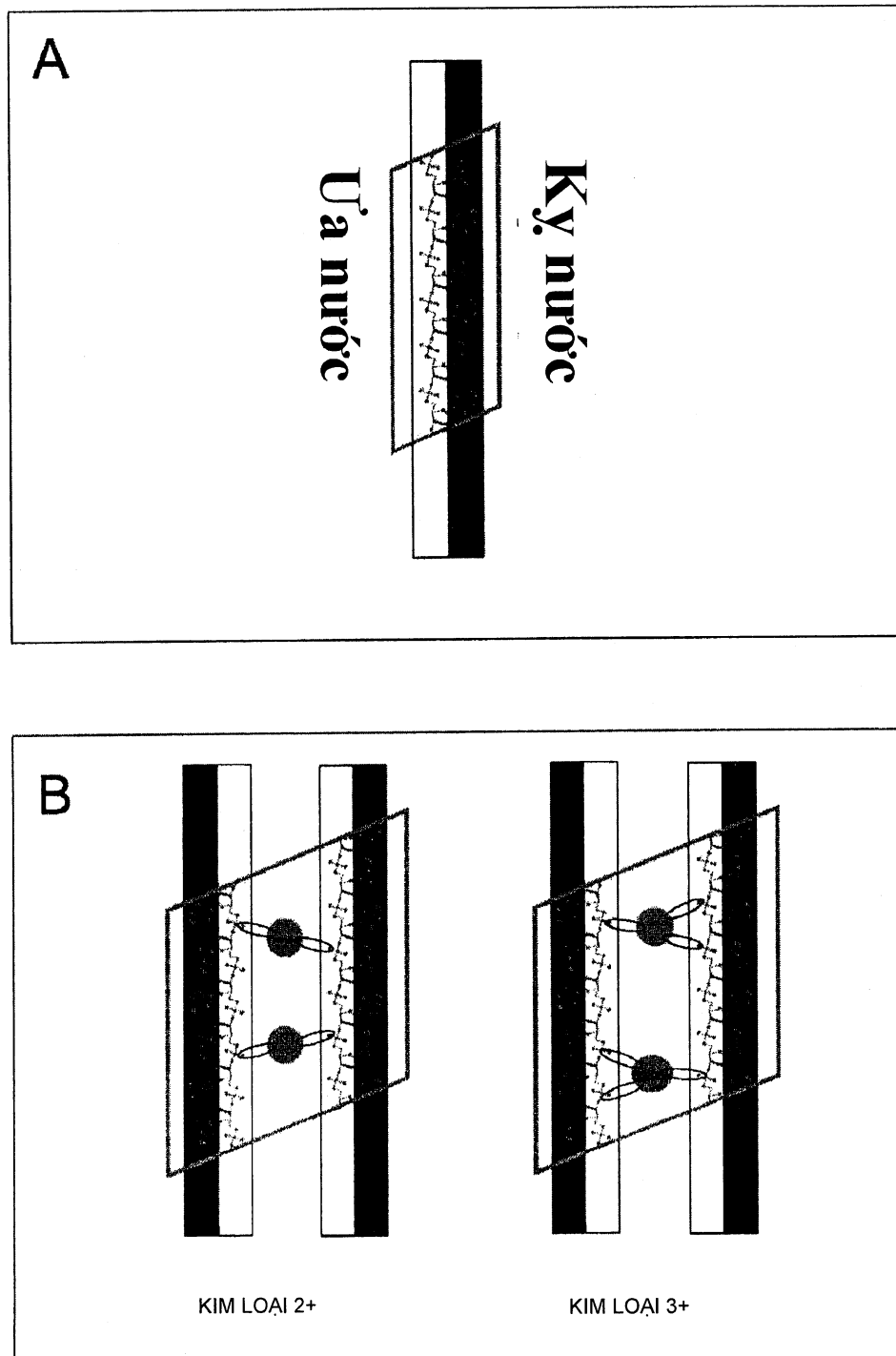


Fig. 14

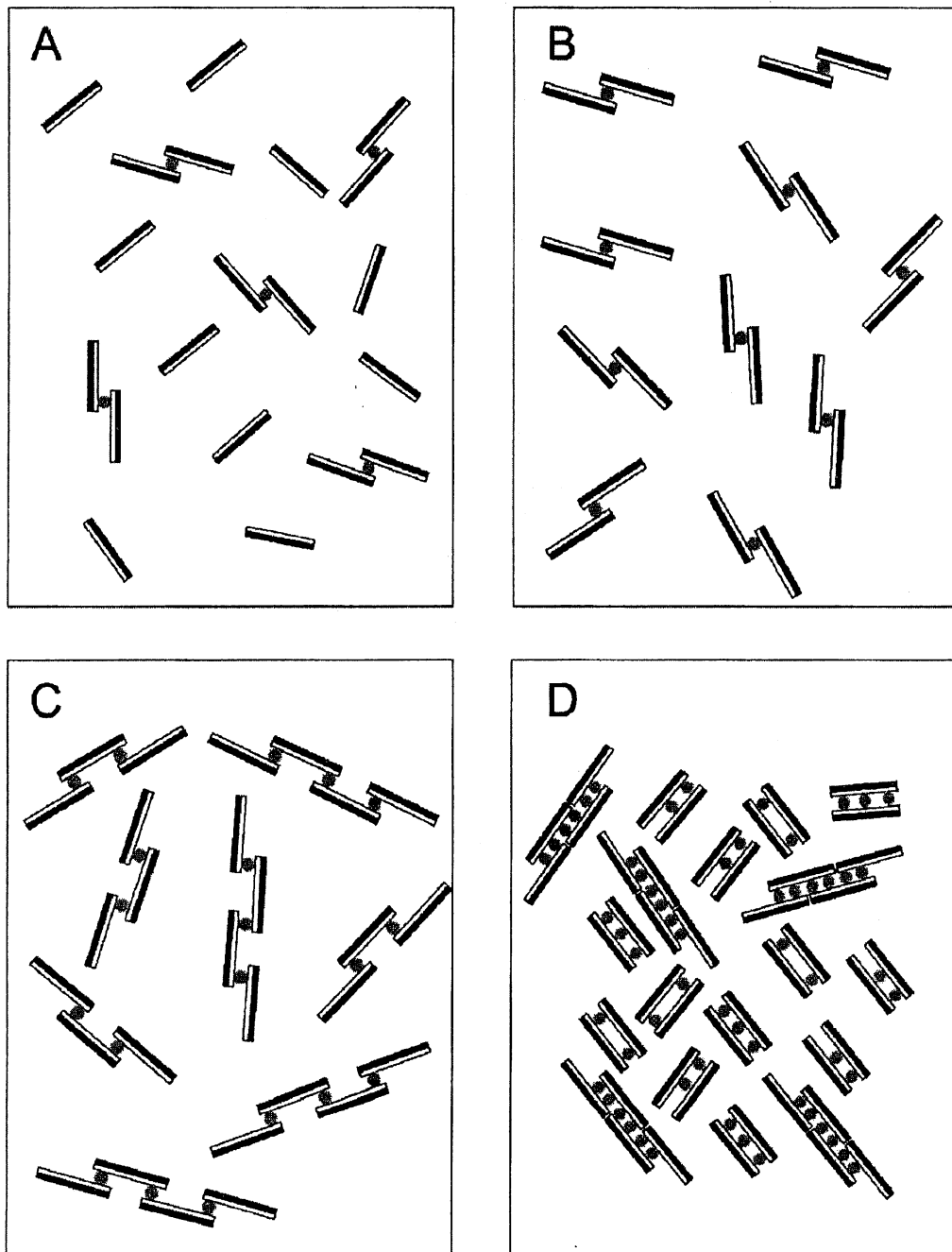


Fig. 15

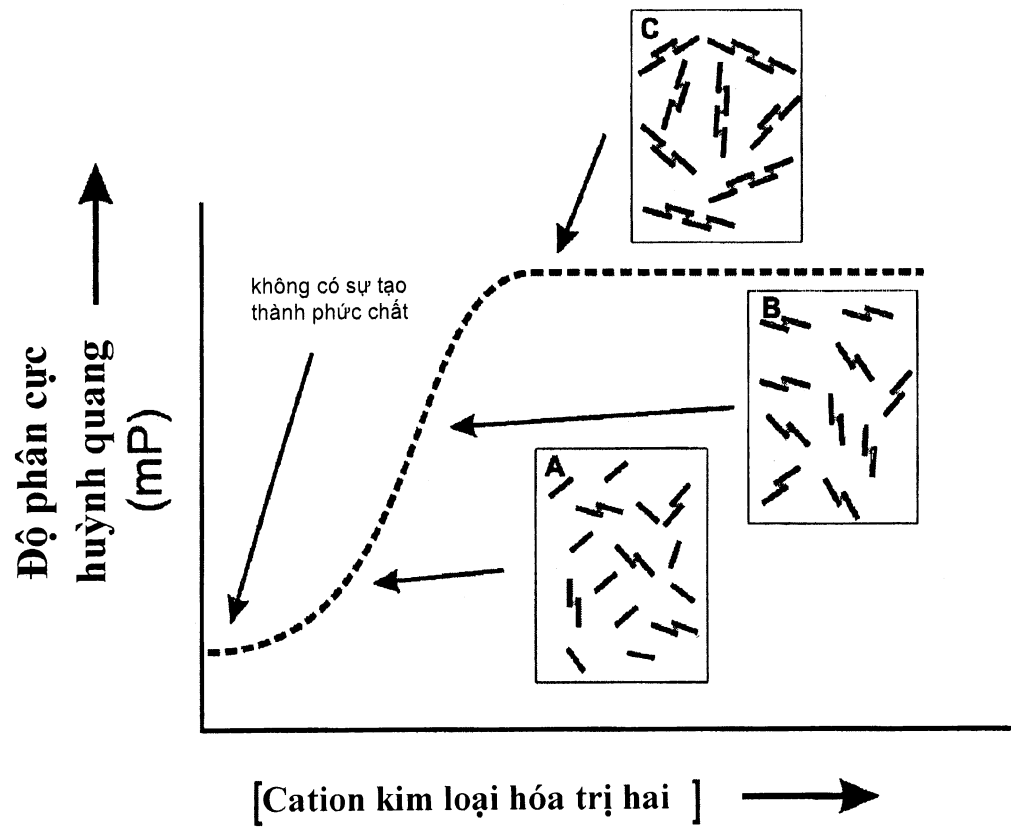


Fig. 16

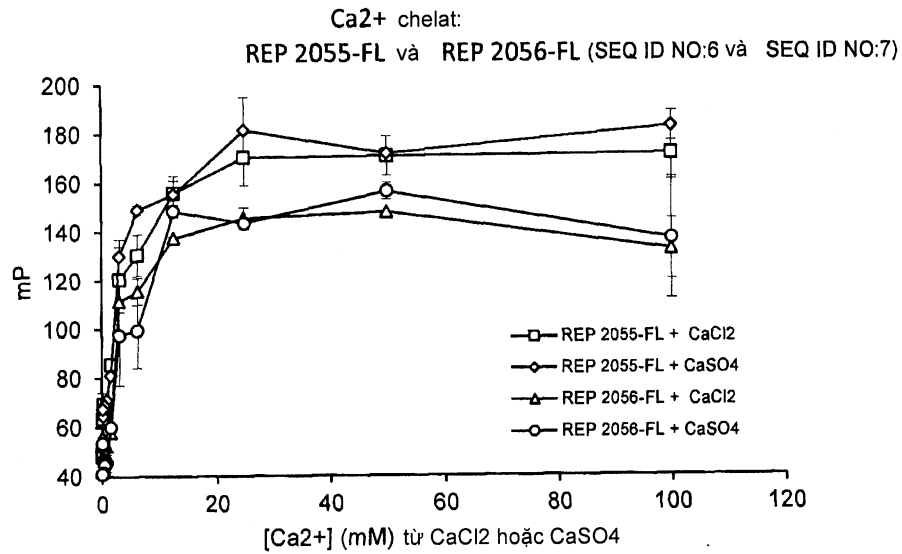


Fig. 17A

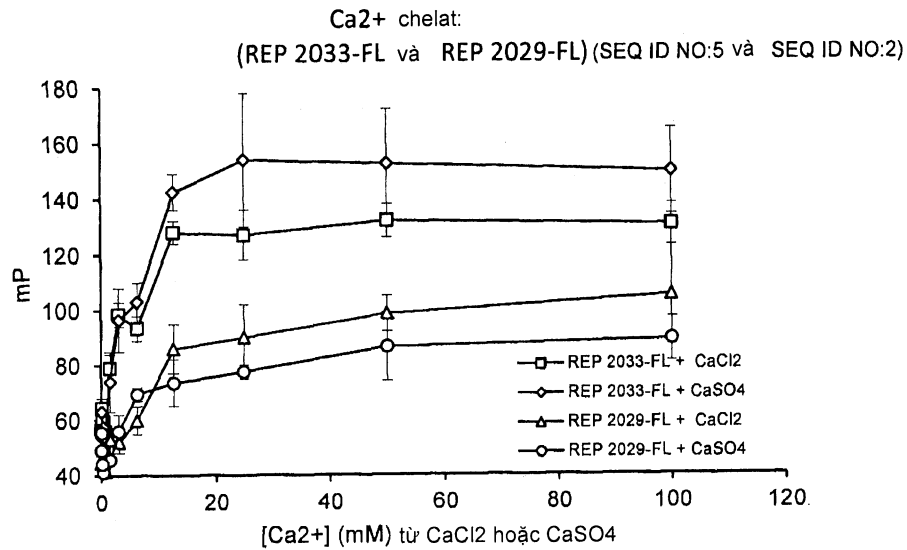


Fig. 17B

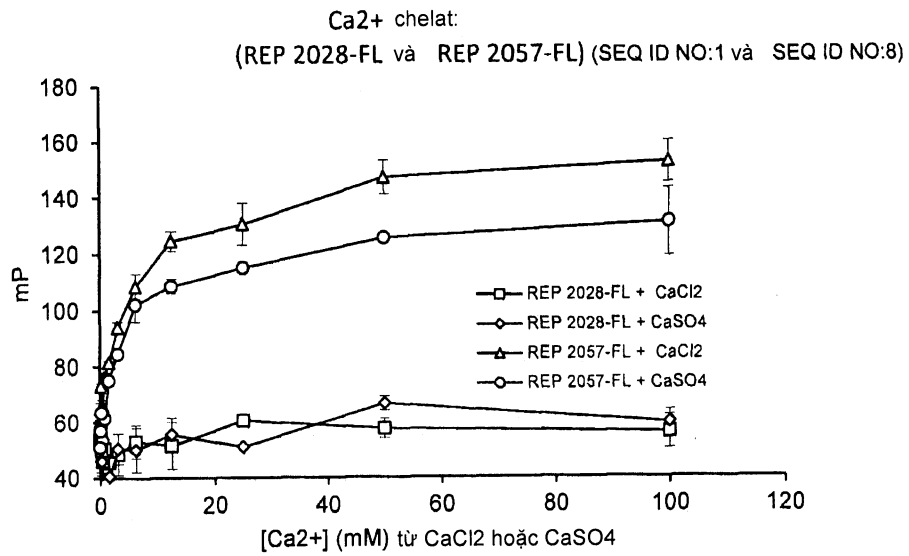


Fig. 18A

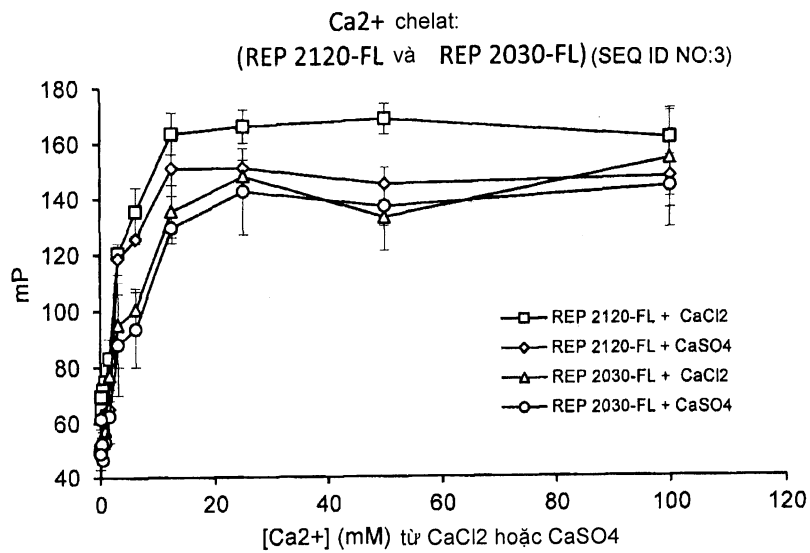


Fig. 18B

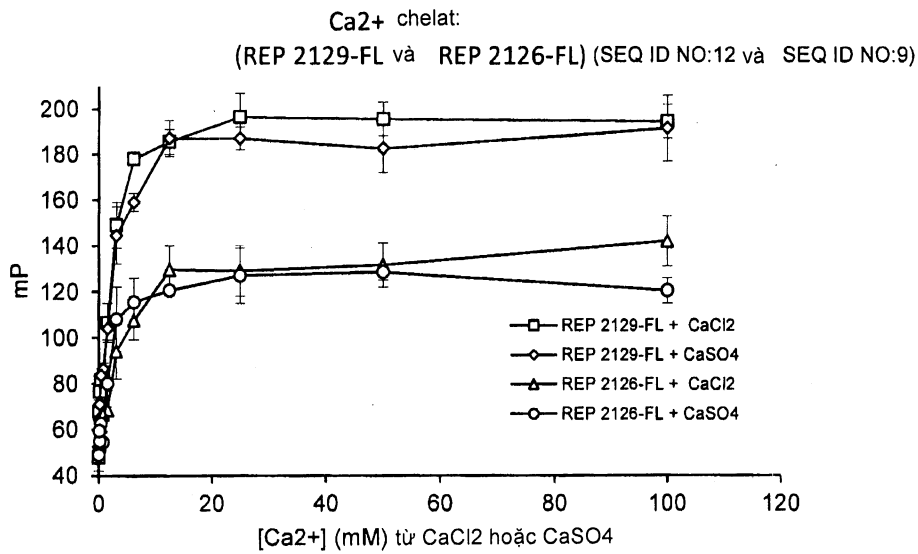


Fig. 19A

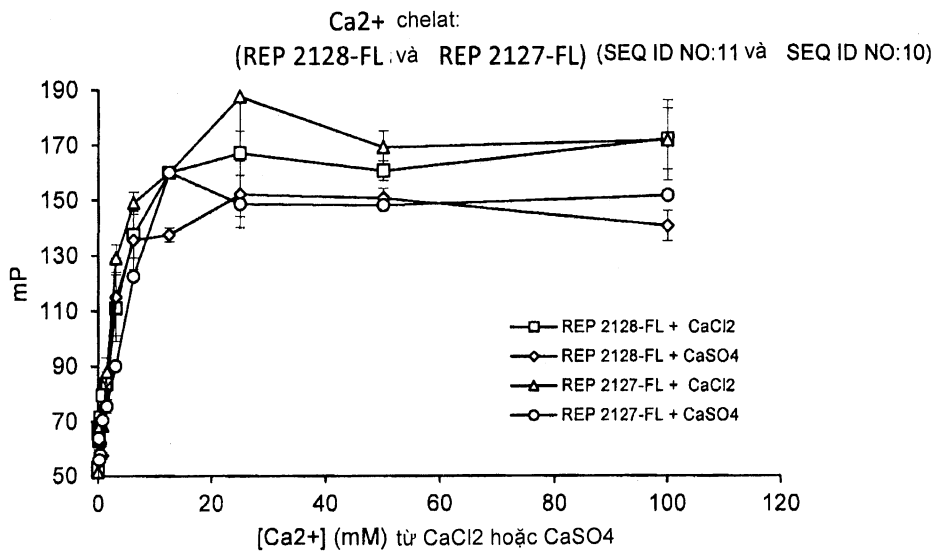


Fig. 19B

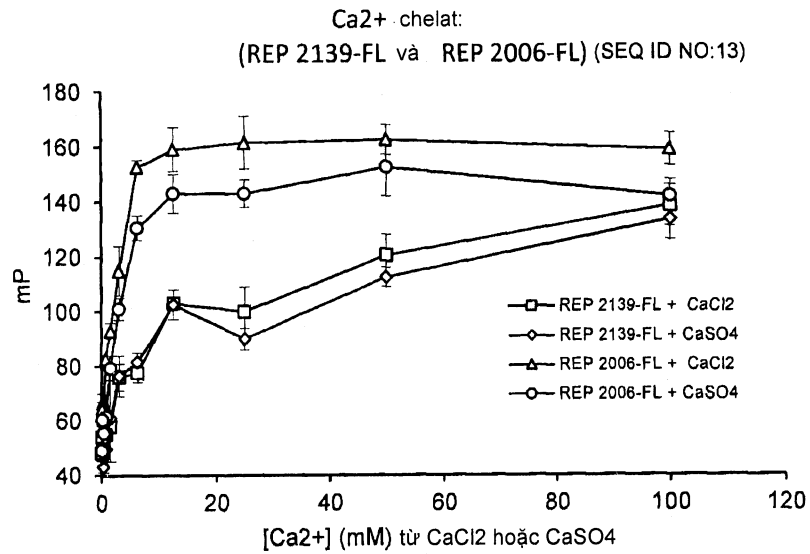


Fig. 20A

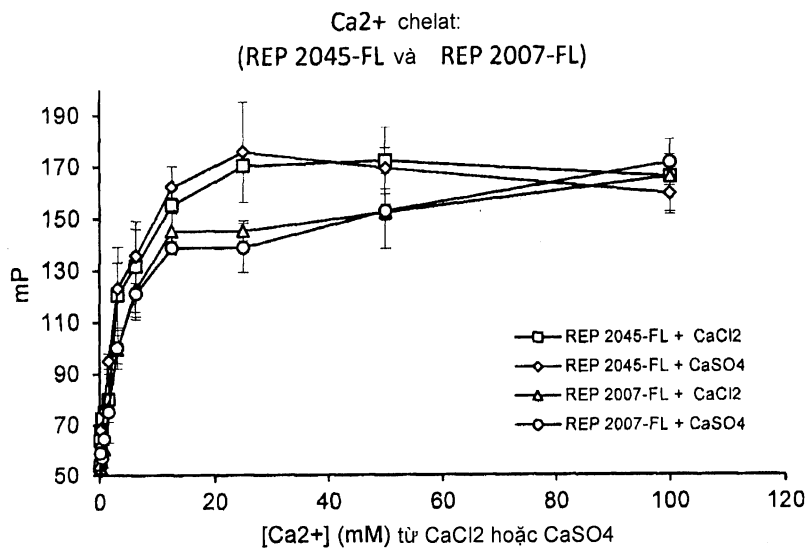
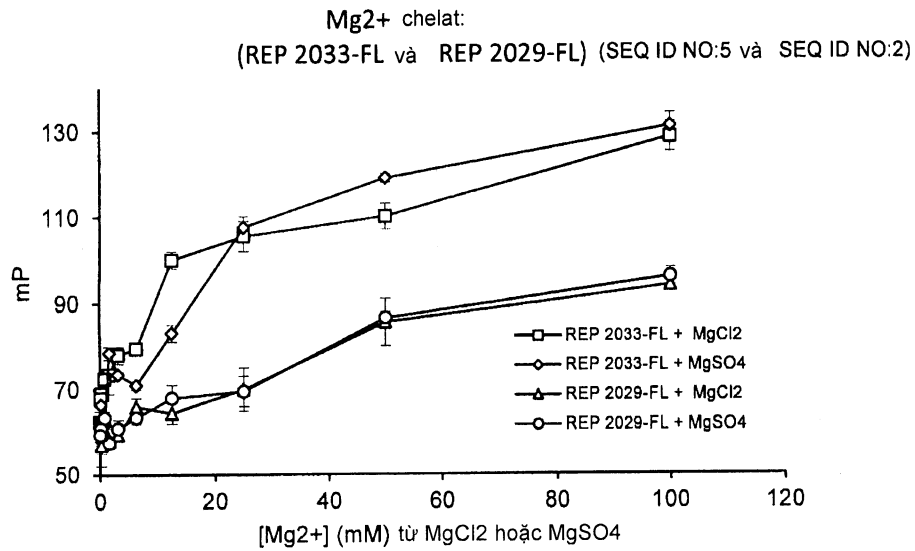
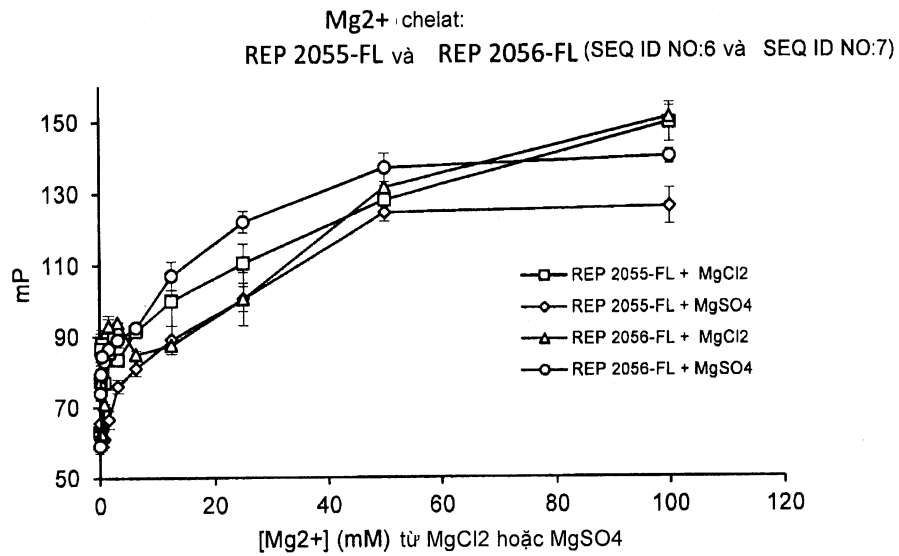


Fig. 20B



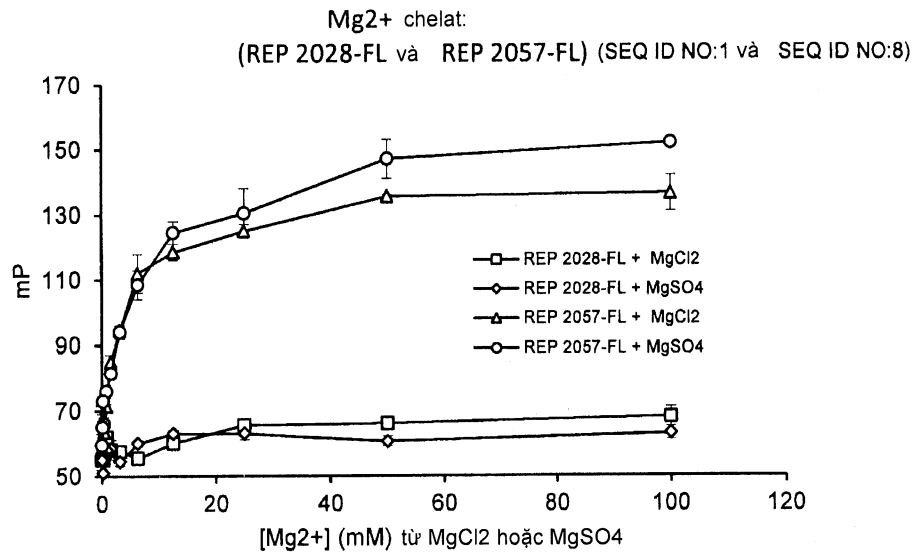


Fig. 22A

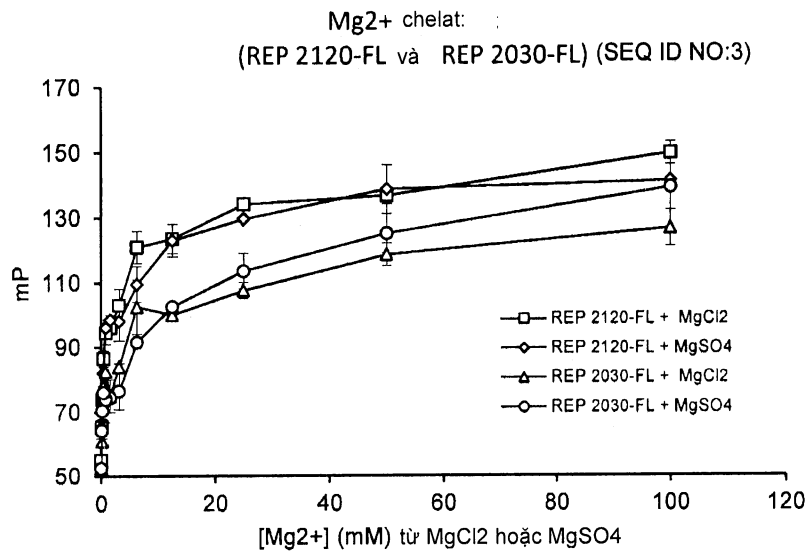


Fig. 22B

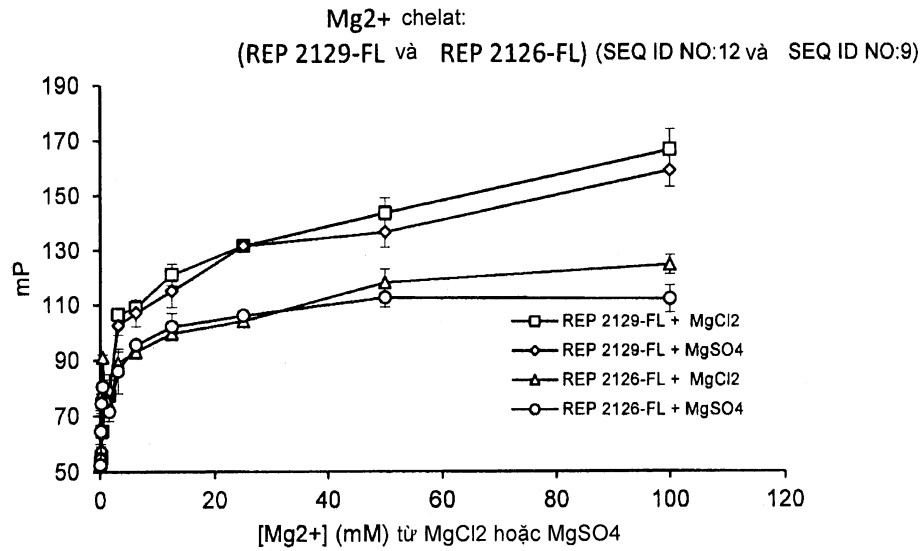


Fig. 23A

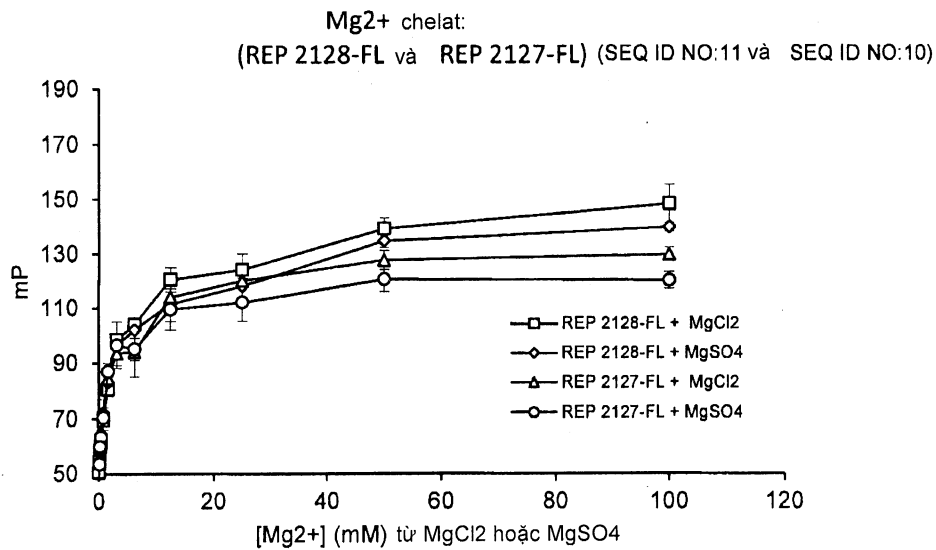


Fig. 23B

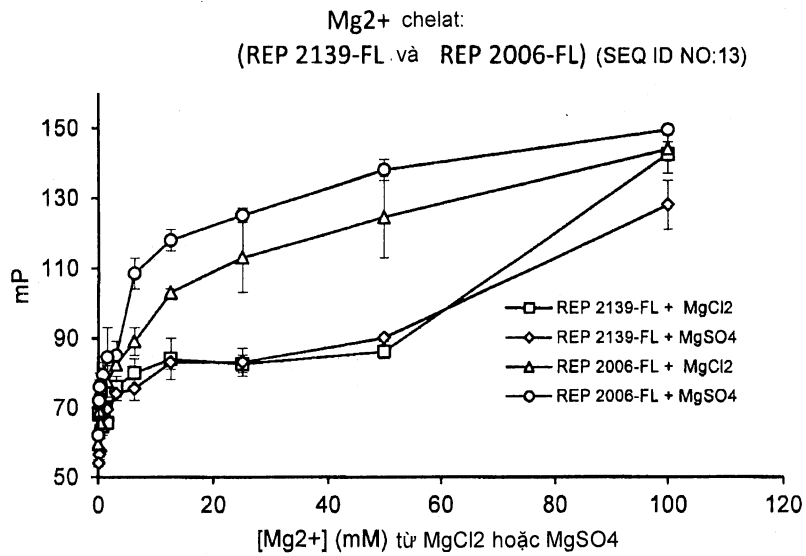


Fig. 24A

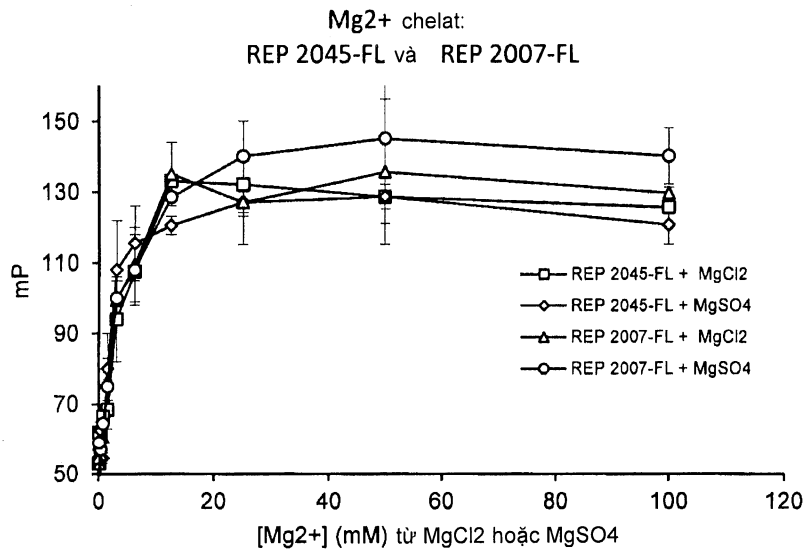


Fig. 24B

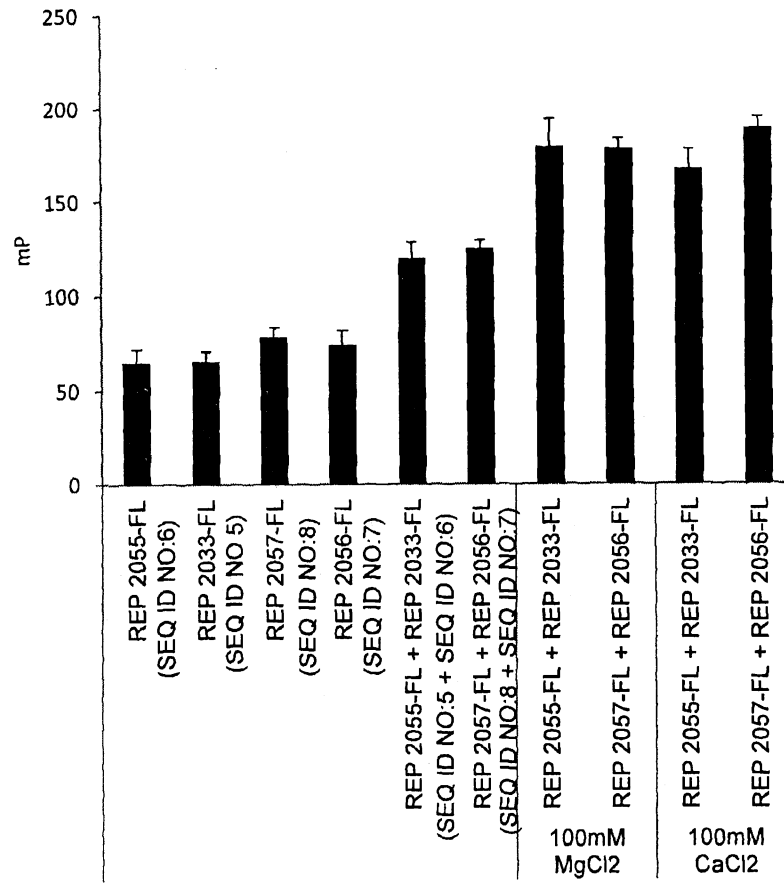


Fig. 25

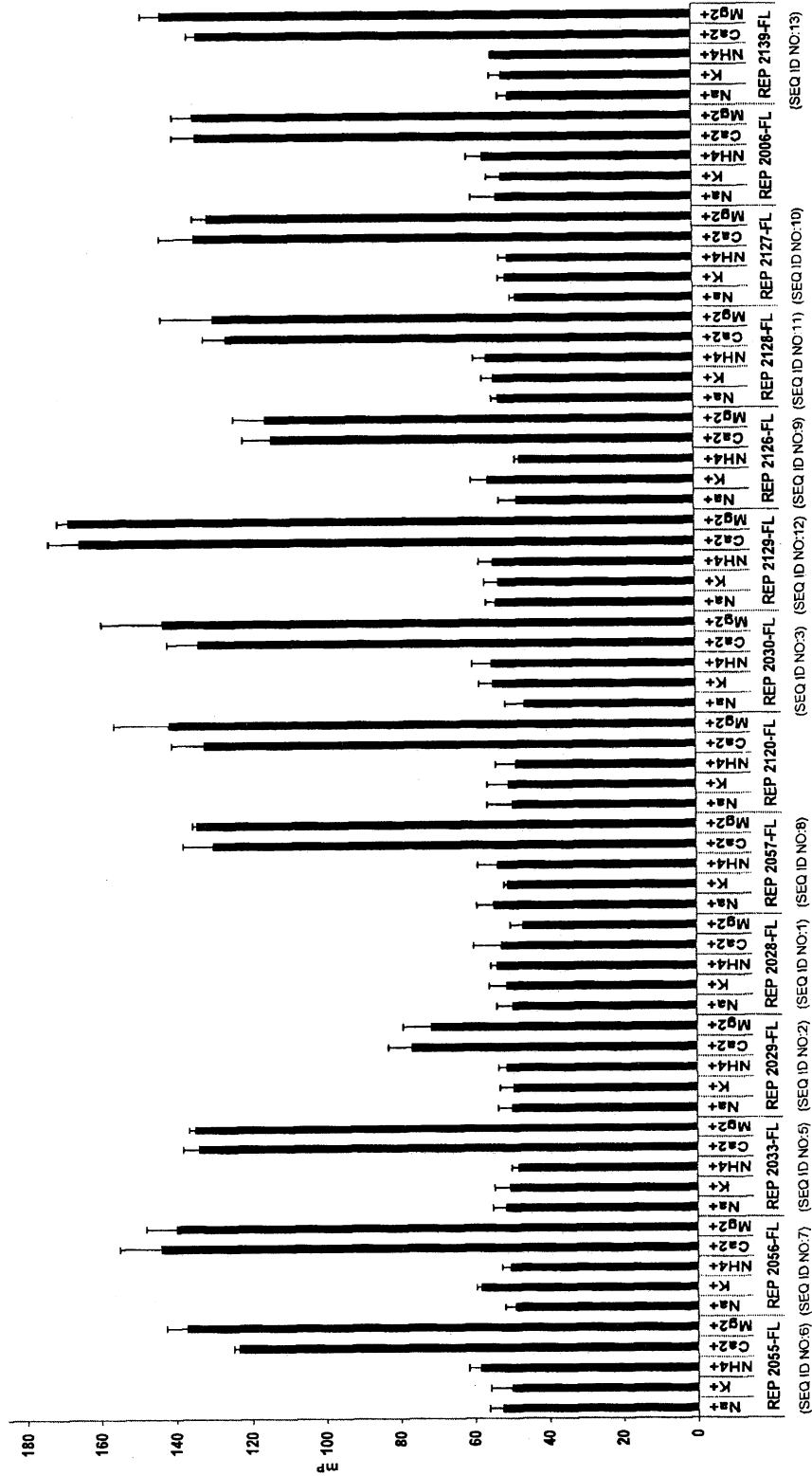


Fig. 26

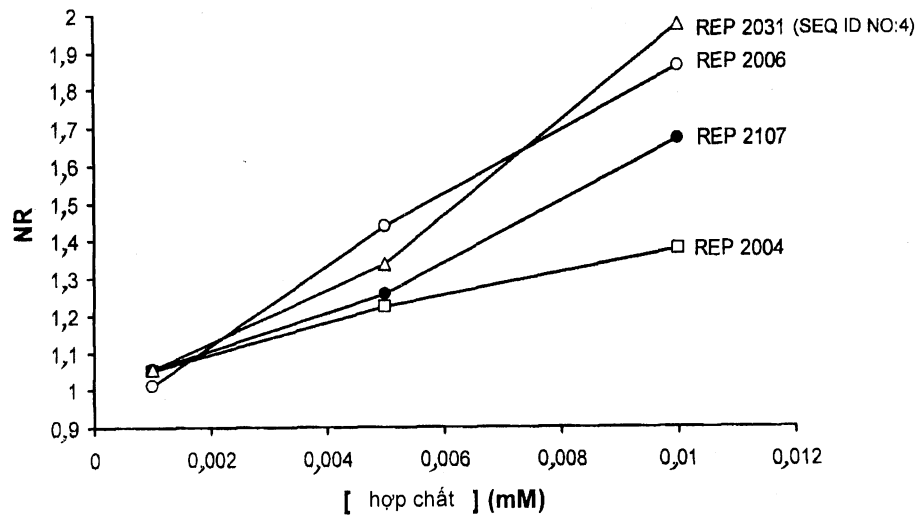


Fig. 27

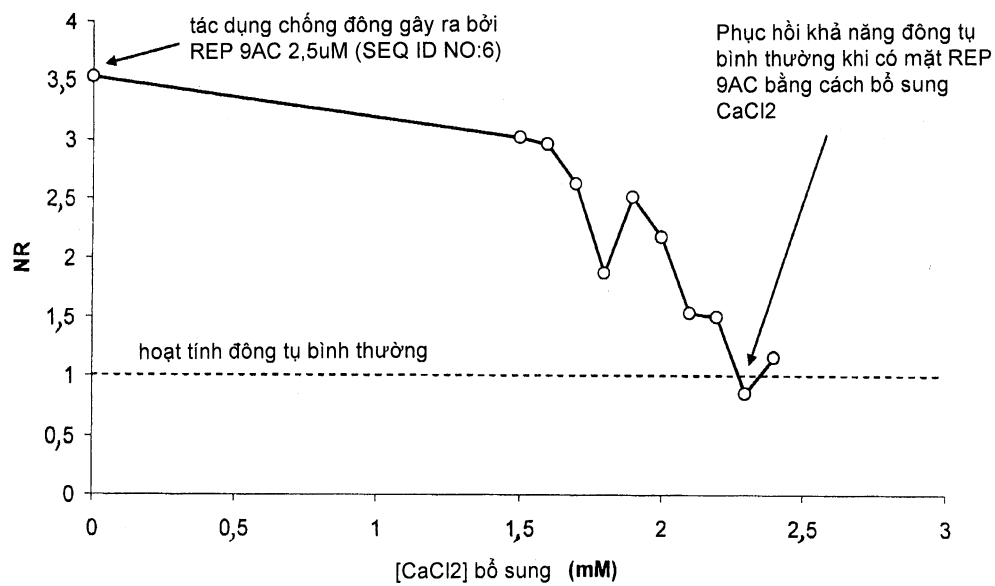


Fig. 28

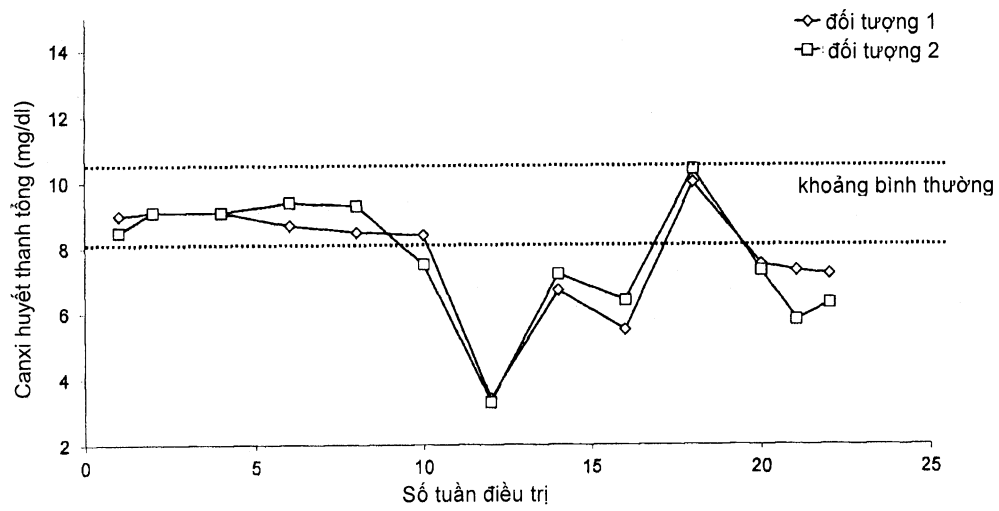


Fig. 29A

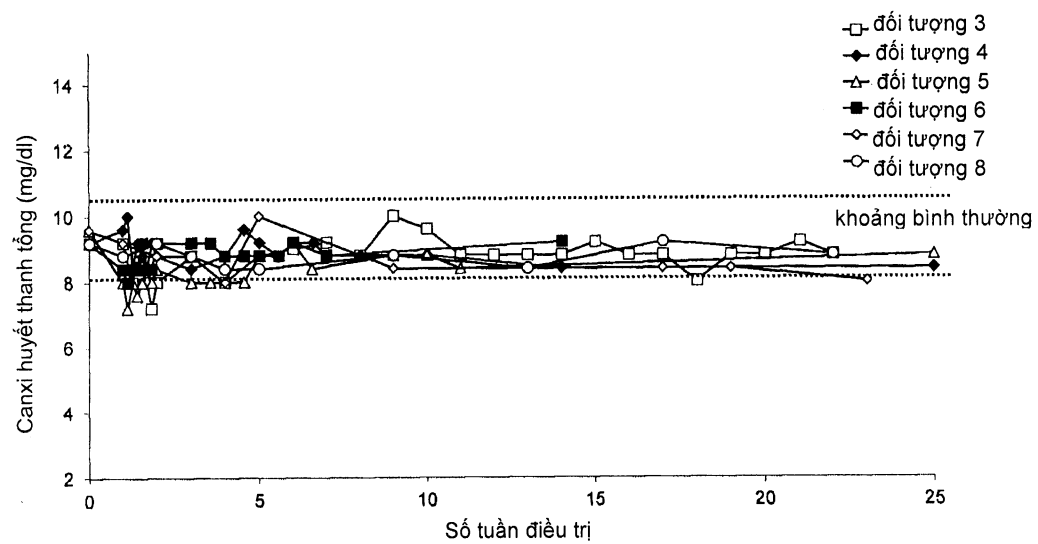


Fig. 29B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> REPLICOR INC.
 Andrew VAILLANT
 Michel BAZINET

<120> PHỨC CHẤT OLIGONUCLEOTIT CHELAT, ĐƯỢC PHÂN CHỨA PHỨC CHẤT VÀ
 PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ PHỨC CHẤT NÀY

<130> 05016051-32PCT

<150> US 61/375257
 <151> 2010-08-20

<160> 14

<170> FastSEQ for windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> REP 2028, phosphorothioat đầy đủ

<400> 1
 gggggggggg gggggggggg gggggggggg gggggggggg 40

<210> 2
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> REP 2029, phosphorothioat đầy đủ

<400> 2
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 40

<210> 3
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> REP 2030, phosphorothioat đầy đủ

<400> 3
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 40

<210> 4
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> REP 2031, phosphorothioat đầy đủ

<400> 4
 cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc 40

<210> 5
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> REP 2033, phosphorothioat đầy đủ
 <400> 5
 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 40
 <210> 6
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> REP 2055, phosphorothioat đầy đủ
 <400> 6
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 40
 <210> 7
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> REP 2056, phosphorothioat đầy đủ
 <400> 7
 tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc 40
 <210> 8
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> REP 2057, phosphorothioat đầy đủ
 <400> 8
 agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 40
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> REP 2126, phosphorothioat đầy đủ
 <400> 9
 cccccccccc cccccccccc 20
 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> REP 2127, phosphorothioat đầy đủ
 <400> 10
 cccccccccc cccccccccc cccccccccc 30
 <210> 11
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> REP 2128, phosphorothioat đầy đủ

 <400> 11
 cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc 50

 <210> 12
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> REP 2129, phosphorothioat đầy đủ

 <400> 12
 cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc 60

 <210> 13
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> REP 2139, phosphorothioat đầy đủ, 2' O methyl riboza đầy đủ,
 C = 5' methylcytidin

 <400> riboza
 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 40

 <210> 14
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> REP 2138; 2' O methyl đầy đủ

 <400> 14
 cccccccccc cccccccccc cccccccccc cccccccccc 40