



(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)



1-0031145

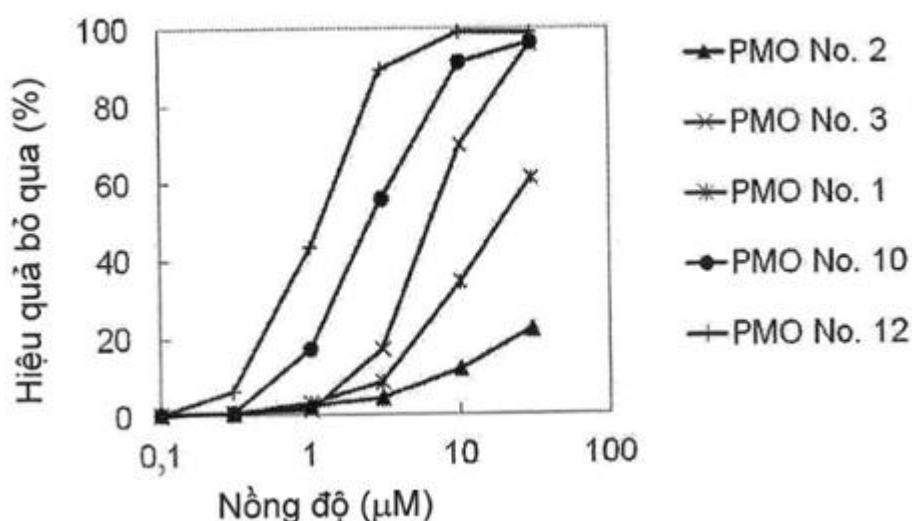
(51)⁷ C12N 15/113; A61K 31/7125; A61P
21/04; A61K 31/712; A61K 48/00

(13) B

- (21) 1-2016-05085 (22) 16/06/2015
(86) PCT/JP2015/067238 16/06/2015 (87) WO2015/194520 23/12/2015
(30) 2014-124157 17/06/2014 JP
(45) 25/02/2022 407 (43) 27/03/2017 348A
(73) 1. NIPPON SHINYAKU CO., LTD. (JP)
14, Kisshoin Nishinosho Monguchicho, Minami-ku, Kyoto-shi, Kyoto 601-8550, Japan
2. NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY (JP)
1-1, Ogawahigashi-cho 4-chome, Kodaira-shi, Tokyo 187-8551, Japan
(72) WATANABE Naoki (JP); TONE Yuuichirou (JP); TAKEDA Shin'ichi (JP);
NAGATA Tetsuya (JP).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) OLIGOME ĐỐI NGHĨA VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA OLIGOME NÀY

(57) Sáng chế đề xuất oligome đối nghĩa trong đó hai hoặc nhiều trình tự hướng đích của các oligome đơn vị là không nối tiếp hoặc gồi lên nhau trong cùng exon được liên kết. Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa oligome đối nghĩa theo sáng chế và phương pháp sản xuất và phương pháp sàng lọc oligome đối nghĩa này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến oligome đối nghĩa để bỏ qua exon, bao gồm trình tự nucleotit hỗ trợ cho hai hoặc nhiều trình tự khác nhau ở exon đích. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến oligome đối nghĩa gây ra sự bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người, và được phẩm chứa oligome.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chứng loạn dưỡng cơ Duchenne (Duchenne Muscular Dystrophy - DMD) là dạng phổ biến nhất của chứng loạn dưỡng cơ tăng tiến do di truyền ảnh hưởng đến khoảng 3500 trẻ trai mới sinh. Mặc dầu các chức năng vận động là hiếm khi dị biệt ở người khỏe mạnh ở giai đoạn vị thành niên và thơ ấu, sự yếu cơ quan sát thấy ở trẻ từ 4 đến 5 tuổi. Sau đó, sự yếu cơ tiến triển đến mất khả năng đi lại khi khoảng 12 tuổi và chết do sự thiếu năng hô hấp và tim khi vào gian đoạn tuổi giữa 20 và 29. DMD là chứng rối loạn nghiêm trọng. Hiện nay, không có phương pháp điều trị nào hiệu quả cho DMD, và có mong muốn rất lớn đối với việc phát triển tác nhân điều trị mới.

DMD được biết là gây ra bởi sự đột biến trong gen dystrophin. Gen dystrophin nằm trên nhiễm sắc thể X và là gen rất lớn bao gồm 2,2 triệu cặp nucleotit của ADN. ADN được phiên mã thành các tiền thân mARN, và các intron được loại bỏ bằng sự cắt bỏ để tổng hợp mARN với khoảng 13,993 bazơ, trong đó 79 exon được kết hợp cùng nhau. mARN được dịch mã thành 3.685 axit amin để tạo thành protein dystrophin. Protein dystrophin liên quan đến sự duy trì sự ổn định màng trong các tế bào cơ và cần để giúp các tế bào cơ ít bị phá hủy. Gen dystrophin ở bệnh nhân mắc DMD có đột biến và do đó, protein dystrophin, là protein chức năng ở tế bào cơ hiếm khi được biểu hiện. Do đó, cấu trúc của các tế bào cơ không thể được duy trì trong cơ thể của bệnh nhân mắc DMD, dẫn đến sự tràn lượng lớn của các ion canxi vào các tế bào cơ. Hậu quả là, đáp ứng dạng viêm xảy ra để thúc đẩy sự xơ hóa khiến các tế bào

cơ chỉ có thể được tạo ra với trở ngại.

Chứng loạn dưỡng cơ Becker (Becker Muscular Dystrophy - BMD) cũng được gây ra bởi sự đột biến trong gen dystrophin. Các hội chứng liên quan đến sự yếu cơ nhưng thường có tiến trình yếu cơ nhẹ và chậm, khi so với DMD. Trong nhiều trường hợp, sự khởi phát của bệnh là ở người trưởng thành. Các khác biệt trong các hội chứng lâm sàng giữa DMD và BMD được xem là thuộc về việc liệu khung đọc của các axit amin trong quá trình dịch mã của mARN dystrophin thành protein dystrophin có bị ngắt quãng bởi sự đột biến hay không (tài liệu phi sáng chế 1). Cụ thể hơn, trong DMD, sự có mặt của đột biến dịch chuyển khung đọc axit amin khiến cho sự biểu hiện của protein dystrophin chức năng bị hủy bỏ, trong khi trong MBD, protein dystrophin đóng vai trò chức năng, mặc dù thiếu sót, được sản xuất vì khung đọc axit amin là bảo thủ, trong khi một phần của các exon bị xóa bỏ do sự đột biến.

Sự bỏ qua exon được mong đợi là đóng vai trò làm phương pháp điều trị DMD. Phương pháp này liên quan đến sự biến đổi việc cắt nối để khôi phục khung đọc axit amin của mARN dystrophin và gây cảm ứng sự biểu hiện của protein dystrophin có chức năng được khôi phục một phần (tài liệu phi sáng chế 2). Phần trình tự axit amin, là đích để bỏ qua exon, sẽ bị mất. Vì lý do này, protein dystrophin được biểu hiện bằng điều trị này trở nên ngắn hơn so với protein bình thường nhưng vì khung đọc axit amin được duy trì, chức năng để ổn định tế bào cơ được giữ lại một phần. Hậu quả là, được mong đợi rằng sự bỏ qua các exon sẽ dẫn DMD đến các hội chứng tương tự với các hội chứng của BMD, là nhẹ hơn. Phương pháp bỏ qua các exon đã trải qua các thử nghiệm trên động vật sử dụng chuột và chó và hiện nay đang được đánh giá trong các thử nghiệm lâm sàng ở bệnh nhân là người mắc DMD.

Sự bỏ qua exon có thể được cảm ứng bằng cách liên kết các axit nucleic đối nghĩa hướng đích là vị trí cắt nối đầu 5' hoặc 3' hoặc cả hai vị trí, hoặc vị trí các exon bên trong. Exon sẽ chỉ được bao gồm trong mARN khi cả hai vị trí cắt nối của nó

được nhận diện bởi phức spliceosome. Do vậy, sự bỏ qua exon có thể được cảm ứng bằng cách hướng đích các vị trí cắt nối với các axit amin đối nghĩa. Ngoài ra, sự liên kết của protein SR mà giàu serin và arginin, với vùng trình tự tăng cường cắt nối trong exon (Exonic Splicing Enhancer - ESE) được xem là cần thiết cho exon để được nhận diện bởi cơ chế cắt nối. Do đó, sự bỏ qua exon có thể được giảm đi bằng cách hướng đích ESE.

Vì sự đột biến của gen dystrophin có thể thay đổi phụ thuộc vào bệnh nhân mắc DMD, các axit nucleic đối nghĩa cần được thiết kế dựa trên vị trí hoặc loại đột biến gen tương ứng. Đã có vài nghiên cứu về các axit nucleic đối nghĩa mà gây ra sự bỏ qua exon với một trình tự tiên tiếp làm đích cho exon đơn tron gen dystrophin (Tài liệu sáng chế số 1 đến 6 và Tài liệu phi sáng chế 1 và 2). Cũng như vậy, đã được báo cáo rằng hai loại axit nucleic đối nghĩa hướng đích cùng exon trong gen dystrophin là được trộn với nhau và cho phép hoạt động (hướng đích kép), hoạt động bỏ qua có thể được tăng cường khi so với việc sử dụng mỗi axit nucleic đối nghĩa một mình (Tài liệu sáng chế 7).

Tuy nhiên, không có nghiên cứu nào trước đây thể hiện axit nucleic đối nghĩa ở dạng mạch đơn được liên kết (loại được liên kết) hướng đích hai hoặc nhiều vị trí trong cùng exon thể hiện hoạt tính bỏ qua (Tài liệu sáng chế 1).

Các tài liệu về tình trạng kỹ thuật

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Công bố đơn quốc tế WO 2004/048570

Tài liệu sáng chế 2: Công bố đơn quốc tế WO 2009/139630

Tài liệu sáng chế 3: Công bố đơn quốc tế WO 2010/048586

Tài liệu sáng chế 4: US 2010/0168212

Tài liệu sáng chế 5: Công bố đơn quốc tế WO 2011/057350

Tài liệu sáng chế 6: Công bố đơn quốc tế WO 2006/000057

Tài liệu sáng chế 7: Công bố đơn quốc tế WO 2007/135105

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Annemieke Aartsma-Rus et al., (2002) Neuromuscular Disorders 12: S71–S77

Tài liệu phi sáng chế 2: Wilton S. D., et al., Molecular Therapy 2007: 15: p. 1288-96

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần phải được giải quyết bởi sáng chế

Trong các trường hợp này, đối tượng chính của sáng chế là để cung cấp oligome đối nghĩa loại được liên kết mới, oligome này gây ra sự bỏ qua exon bằng cách hướng đích hai trình tự nucleotit khác nhau trong cùng exon ở gen dystrophin, và tác nhân điều trị chứng loạn dưỡng cơ chứa oligome này.

Phương tiện giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu sâu rộng về nội dung các kỹ thuật được mô tả trong các tài liệu mô tả trên đây về cấu trúc của gen dystrophin gen, v.v., và kết quả là đã thấy rằng oligome đối nghĩa thu được bằng cách liên kết các oligome hướng đích hai vị trí khác nhau trong exon 44 ở gen dystrophin của người có thể gây ra sự bỏ qua exon này. Dựa trên phát hiện này, các tác giả sáng chế đã hoàn thiện sáng chế.

Đó là, sáng chế là như sau.

[1]

Oligome đối nghĩa có chiều dài là 15 đến 30 bazơ trong đó

(a) oligome đơn vị thứ nhất chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit thứ nhất gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp trong exon đích; và

(b) oligome đơn vị thứ hai chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit thứ hai gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp trong exon đích được liên kết, trong đó

trình tự nucleotit thứ nhất và trình tự nucleotit thứ hai là không nối tiếp hoặc gối lên nhau, và

oligome đối nghĩa gây ra sự bỏ qua exon đích, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[2]

Oligome đối nghĩa theo [1], trong đó oligome đơn vị thứ nhất và/hoặc oligome đơn vị thứ hai chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho một phần trình tự nucleotit của intron gần kề với exon đích, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[3]

Oligome đối nghĩa theo [1] hoặc [2], trong đó exon đích exon trong gen dystrophin của người, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[4]

Oligome đối nghĩa theo [1] hoặc [2], trong đó trình tự nucleotit thứ nhất là trình tự nucleotit gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp được chọn từ trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 1, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[5]

Oligome đối nghĩa theo bất kỳ một trong số các điểm từ [1] đến [3], trong đó trình tự nucleotit thứ hai là trình tự nucleotit gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp được chọn từ trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[6]

Oligome đối nghĩa theo [1] hoặc [2], trong đó hai oligome đơn vị được chọn từ nhóm bao gồm từ nhóm từ (c) đến (e) được liên kết:

(c) oligome đơn vị chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp được chọn từ trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 3;

(d) oligome đơn vị chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp được chọn từ trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4; và

(e) oligome đơn vị chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp được chọn từ trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 5, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[7]

Oligome đối nghĩa theo [1] hoặc [2], bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID No: 6 đến 9, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[8]

Oligome đối nghĩa theo điểm bất kì trong số các điểm từ [1] đến [7], là oligonucleotit, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[9]

Oligome đối nghĩa theo [8], trong đó gốc đường và /hoặc vùng liên kết với phosphat của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit được cải biến, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[10]

Oligome đối nghĩa theo [8] hoặc [9], trong đó gốc đường của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit là riboza trong đó nhóm 2'-OH được thay bằng nhóm bất kỳ trong số các nhóm bao gồm OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br và I (trong đó R là alkyl hoặc aryl và R' là alkylen), hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[11]

Oligome đối nghĩa theo điểm bất kỳ trong số các điểm [8] đến [10], trong đó vùng liên kết với phosphat của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit là nhóm bất kỳ trong số các nhóm bao gồm liên kết phosphorothioat, liên kết

Phương pháp điều trị chứng loạn dưỡng cơ, bao gồm cho bệnh nhân mắc chứng loạn dưỡng cơ sử dụng oligome đối nghĩa, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [12] hoặc được phẩm theo [1] hoặc [16].

[18]

Phương pháp điều trị theo [17], trong đó bệnh nhân mắc chứng loạn dưỡng cơ có (các) đột biến được hướng đích là để bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin.

[19]

Phương pháp điều trị theo [17] hoặc [18], trong đó bệnh nhân là người.

[20]

Sử dụng oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [14] trong sản xuất được phẩm để điều trị chứng loạn dưỡng cơ.

[21]

Oligome đối nghĩa, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số [1] đến [14], được áp dụng để điều trị chứng loạn dưỡng cơ.

[22]

Oligome đối nghĩa, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo [21] trong đó bệnh nhân mắc chứng loạn dưỡng cơ trong điều trị này có (các) đột biến được hướng đích là để bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin.

[23]

Oligome đối nghĩa theo [21] hoặc [22], hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó, trong đó bệnh nhân là người.

[24]

Phương pháp sản xuất oligome đối nghĩa theo [1], bao gồm các bước

Liên kết

(a) oligome đơn vị thứ nhất chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit thứ nhất gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp trong exon đích; và

(b) oligome đơn vị thứ hai chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit thứ hai gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp trong exon đích

để tạo thành oligome đối nghĩa có chiều dài là 15 đến 30 bazơ, trong đó

trình tự nucleotit thứ nhất và trình tự nucleotit thứ hai là không nối tiếp hoặc gối lên nhau.

[25]

Phương pháp theo [24], phương pháp còn bao gồm các bước:

đo hiệu quả bỏ qua bởi oligome đối nghĩa thu được; và

lựa chọn oligome đối nghĩa có hiệu quả bỏ qua vượt quá giá trị tham chiếu.

[26]

Phương pháp sàng lọc oligome đối nghĩa, bao gồm các bước:

(a) lựa chọn

(i) oligome đơn vị thứ nhất chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit thứ nhất gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp trong exon đích; và

(ii) oligome đơn vị thứ hai chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit thứ hai gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp trong exon đích, trong đó trình tự nucleotit thứ nhất và trình tự nucleotit thứ hai là không nối tiếp hoặc gối lên nhau;

(b) liên kết oligome đơn vị thứ nhất và oligome đơn vị thứ hai để tạo thành oligome đối nghĩa có chiều dài là 15 đến 30 bazơ;

(c) đo hiệu quả bỏ qua bởi oligome đối nghĩa thu được trong bước (b); và

(d) lựa chọn oligome đối nghĩa có hiệu quả bỏ qua vượt quá giá trị tham chiếu.

Hiệu quả của sáng chế

Oligome đối nghĩa theo sáng chế có thể gây ra sự bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người với hiệu quả cao. Tương tự, các triệu chứng của chứng loạn dưỡng cơ Duchenne có thể được làm giảm một cách có hiệu quả bằng cách dùng được phẩm theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện hiệu quả của sự bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở dòng tế bào tế bào sarcoma cơ vân (dòng tế bào RD).

Fig. 2 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 3 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 4 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 5 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 6 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 7 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 8 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các

tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 9 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 10 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 11 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 12 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 13 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 14 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 15 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 16 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 17 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 18 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 19 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 20 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 21 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 22 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 23 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 24 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

Fig. 25 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các

oligome.

Fig. 26 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) ở các nồng độ tương ứng của các oligome.

FIG. 27 thể hiện sự so sánh về hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) giữa dạng được liên kết và hỗn hợp của hai oligome đơn vị hướng đích các vị trí khác nhau.

FIG. 28 thể hiện sự so sánh về hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) giữa dạng được liên kết và hỗn hợp của hai oligome đơn vị hướng đích các vị trí khác nhau.

FIG. 29 thể hiện sự so sánh về hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) giữa dạng được liên kết và hỗn hợp của hai oligome đơn vị hướng đích các vị trí khác nhau.

FIG. 30 thể hiện sự so sánh về hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) giữa mỗi dạng riêng lẻ, dạng được liên kết và hỗn hợp của hai oligome đơn vị hướng đích các vị trí khác nhau.

FIG. 31 thể hiện sự so sánh về hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sacom cơ vân người (các tế bào RD) giữa mỗi dạng riêng lẻ, dạng được liên kết và hỗn hợp của hai oligome đơn vị hướng đích các vị trí khác nhau.

Fig. 32 thể hiện hiệu quả bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người trong các nguyên bào sợi từ bệnh nhân DMD là người với sự xóa exon 45.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết. Các phương án được mô tả dưới đây nhằm để được thể hiện bằng cách ví dụ chỉ để mô tả sáng chế mà không giới hạn sáng

chế ở các phương án này. Sáng chế có thể được thực hành theo nhiều cách khác nhau, mà không chệch khỏi bản chất của sáng chế.

Tất cả các công bố, đơn sáng chế được công bố, các patent và các tài liệu khác được trích dẫn ở trong bản mô tả này là được kết hợp toàn bộ vào đây để tham khảo. Bản mô tả này kết hợp bằng các tham chiếu nội dung của bản mô tả và các hình vẽ trong đơn patent Nhật Bản (số 2014-124157) nộp ngày 17/06/2014, sáng chế yêu cầu hưởng quyền ưu tiên từ đơn này.

1. Oligome đối nghĩa

Sáng chế đề xuất oligome đối nghĩa có chiều dài là 15 đến 30 bazơ trong đó

(a) oligome đơn vị thứ nhất chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit thứ nhất gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp trong exon đích; và

(b) oligome đơn vị thứ hai chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit thứ hai gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp trong exon đích được liên kết, trong đó trình tự nucleotit thứ nhất và trình tự nucleotit thứ hai là không nối tiếp hoặc gối lên nhau, và oligome đối nghĩa gây ra sự bỏ qua exon đích, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

Sau đây, “oligome đối nghĩa, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó” có thể được gọi chung là “oligome đối nghĩa”.

Oligome đối nghĩa được mô tả trên đây có thể được sản xuất bằng phương pháp để sản xuất bao gồm bước liên kết

(a) oligome đơn vị thứ nhất chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit thứ nhất gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp trong exon đích; và

(b) oligome đơn vị thứ hai chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit thứ hai gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp trong exon đích

để tạo thành oligome đối nghĩa có chiều dài là 15 đến 30 bazơ, trong đó

trình tự nucleotit thứ nhất và trình tự nucleotit thứ hai là không nối tiếp hoặc gối lên nhau.

Phương pháp sản xuất có thể bao gồm thêm:

bước đo hiệu quả bỏ qua bởi oligome đối nghĩa thu được; và

bước thứ hai là lựa chọn oligome đối nghĩa có hiệu quả bỏ qua vượt quá giá trị tham chiếu.

Trong bước thứ hai của phương pháp sản xuất mô tả trên đây, hiệu quả bỏ qua có thể được xác định như sau. mARN cho gen chứa exon đích được thu từ các tế bào thử nghiệm; trong mARN, mức polynucleotit "A" của sợi trong đó exon đích được bỏ qua và mức polynucleotit "B" của sợi trong đó exon đích không được bỏ qua được đo. Sử dụng các giá trị đo "A" và "B", hiệu quả được tính toán theo phương trình sau:

$$\text{Hiệu quả bỏ qua (\%)} = A/(A + B) \times 100$$

Theo cách khác, để tính toán hiệu quả bỏ qua, công bố đơn quốc tế WO2012/029986 có thể được tham khảo.

Trong bước thứ hai, hiệu quả bỏ qua used làm giá trị tham chiếu là 10% hoặc lớn hơn, 20% hoặc lớn hơn, 30% hoặc lớn hơn, 40% hoặc lớn hơn, 50% hoặc lớn hơn, 60% hoặc lớn hơn, 70% hoặc lớn hơn, 80% hoặc lớn hơn hoặc 90% hoặc lớn hơn.

Bằng cách liên kết nhiều oligome đơn vị như đề cập trên đây, oligome đối nghĩa có hoạt tính bỏ qua được cải thiện có thể thu được thậm chí khi mỗi oligome đơn vị có hoạt tính bỏ qua thấp (hoặc không có hoạt tính bỏ qua).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc oligome đối nghĩa, bao gồm:

(a) lựa chọn

(i) oligome đơn vị thứ nhất chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit thứ nhất gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp trong exon đích; và

(ii) oligome đơn vị thứ hai chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit thứ hai gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp trong exon đích, trong đó trình tự nucleotit thứ nhất và trình tự nucleotit thứ hai là không nối tiếp hoặc gối lên nhau;

(b) liên kết oligome đơn vị thứ nhất và oligome đơn vị thứ hai để tạo thành oligome đối nghĩa có chiều dài là 15 đến 30 bazơ;

(c) đo hiệu quả bỏ qua bởi oligome đối nghĩa thu được trong bước (b); và

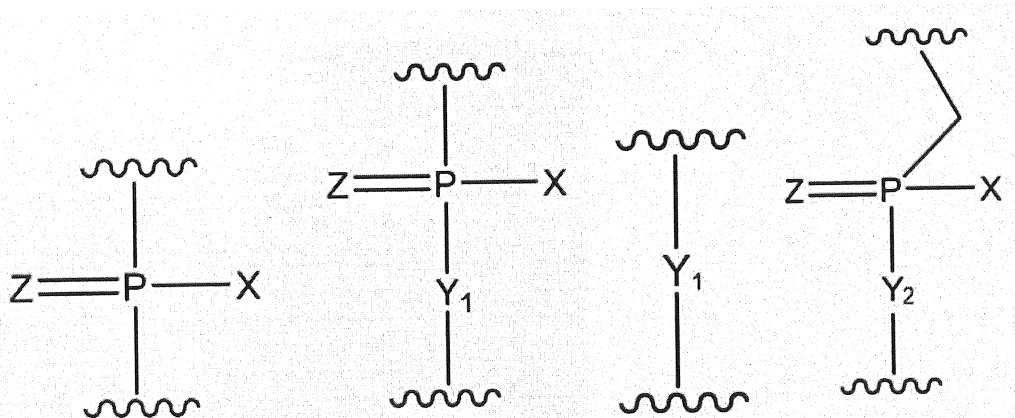
(d) lựa chọn oligome đối nghĩa có hiệu quả bỏ qua vượt quá giá trị tham chiếu.

Trong oligome đối nghĩa được mô tả trên đây, các oligome đơn vị thứ nhất và oligome đơn vị thứ hai có thể được liên kết theo cách trong đó một trong số các oligome đơn vị thứ nhất và oligome đơn vị thứ hai nằm ở phía đầu 5' hoặc 3' so với oligome kia. Theo một phương án, oligome đơn vị thứ nhất là nằm phía đầu 5', và oligome đơn vị thứ hai là nằm phía đầu 3' cho việc liên kết.

Tương tự, oligome đối nghĩa có thể bao gồm oligome đơn vị thứ ba chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit thứ ba gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp trong exon đích.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "liên kết" đề cập đến thuật ngữ trong đó hai oligome đơn vị được liên kết trực tiếp với nhau hoặc thuật ngữ trong đó hai oligome đơn vị được liên kết với nhau thông qua cầu liên kết. Khi hai oligome đơn vị được liên kết trực tiếp với nhau, sau đó đầu 3' của oligome đơn vị nằm phía đầu 5' và đầu 5' của oligome đơn vị khác nằm phía đầu 3' tạo thành liên kết phosphat hoặc nhóm thể hiện dưới đây. Ví dụ về cầu liên kết bao gồm (mạch) axit nucleic gồm 1 đến 5 gốc cũng như cầu liên kết đã biết thường được sử dụng để liên kết các axit nucleic hoặc các dẫn xuất axit nucleic morpholino, như 3-aminopropyl, succinyl, 2,2'-diethanolsulfonyl và alkylamino mạch dài (LCAA).

Công thức 2



trong đó X biểu diễn -OH, $-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{NR}^2\text{R}^3$ hoặc F ;

R^1 biểu diễn H hoặc alkyl ;

R^2 và R^3 , có thể giống nhau hoặc khác nhau, mỗi gốc biểu diễn H, alkyl, xycloalkyl hoặc aryl;

Y_1 biểu diễn O, S, CH_2 hoặc NR^1 ;

Y_2 biểu diễn O, S hoặc NR^1 ;

Z biểu diễn O hoặc S.

Oligome đơn vị thứ nhất và/hoặc oligome đơn vị thứ hai có thể chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho một phần trình tự nucleotit của intron gần kề với exon đích. Theo phương án trong đó, ví dụ, các oligome đơn vị thứ nhất và oligome đơn vị thứ hai được liên kết với nhau theo cách trong đó oligome đơn vị thứ nhất là nằm phía đầu 5' và oligome đơn vị thứ hai là nằm phía đầu 3', phía đầu 5' của oligome đơn vị thứ nhất có thể bao gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit ở gần với đầu 3' của intron gần kề phía đầu 5' của exon đích, và/hoặc phía đầu 3' của oligome đơn vị thứ hai có thể chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit ở gần đầu 5' của intron gần kề với phía đầu 3' của exon đích.

Oligome đơn vị thứ nhất và/hoặc oligome đơn vị thứ hai có thể chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho một phần trình tự nucleotit của vùng trình tự tăng cường cắt nối trong exon (Exonic Splicing Enhancer - ESE) của exon đích.

Exon đích không bị giới hạn một cách cụ thể. Theo một phương án, exon đích là exon trong gen người và ngoài ra là exon trong gen dystrophin của người.

Cụ thể hơn, exon đích là exon 44 trong gen dystrophin của người.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất oligome đối nghĩa gây ra sự bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người (sau đây được đề cập là "oligome theo sáng chế"). Sau đây, cấu trúc của oligome đối nghĩa theo sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Exon 44 trong gen dystrophin của người

Trong sáng chế, thuật ngữ "gen" nhằm có nghĩa là gen thuộc bộ gen và cũng bao gồm cDNA, tiền mRNA và mRNA. Tốt hơn là, gen là tiền mRNA, đó là pre-mRNA.

Trong hệ gen người, gen dystrophin của người nằm ở locus Xp21.2. Gen dystrophin của người có kích thước là 3,0 Mbp và là gen lớn nhất trong số các gen người đã biết. Tuy nhiên, các vùng mã hóa của gen dystrophin của người chỉ là 14kb, phân bố thành 79 exon trong suốt gen dystrophin của người (Roberts, RG, et al., Genomics, 16: 536-538 (1993)). Pre-mRNA, là đoạn phiên mã của gen dystrophin của người, trải qua việc cắt nối để tạo thành mRNA cuối là 14 kb. Trình tự nucleotit của gen dystrophin kiểu đại của người là đã biết (GenBank Accession No. NM_004006).

Trình tự nucleotit của exon 44 trong gen dystrophin kiểu đại của người được thể hiện bởi SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án, oligome theo sáng chế được thiết kế để gây ra sự bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người, nhờ đó cải biến protein được mã hóa bởi loại gen dystrophin của DMD thành loại protein dystrophin của BMD. Do đó, exon 44 trong gen dystrophin là đích của sự bỏ qua exon bởi oligome đối nghĩa theo sáng chế bao gồm cả dạng đại và dạng đột biến.

Cụ thể là, các đột biến exon 44 của gen dystrophin của người bao gồm các polynucleotit được xác định trong (I) hoặc (II) dưới đây.

(I) Polynucleotit lai được trong các điều kiện nghiêm ngặt với polynucleotit chứa trình tự nucleotit bổ sung với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 10; và,

(II) Polynucleotide bao gồm trình tự nucleotit có ít nhất 90% độ đồng nhất với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 10.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "polynucleotit" có dụng ý chỉ ADN hoặc ARN.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "polynucleotit mà lai được trong các điều kiện nghiêm ngặt" đề cập đến, ví dụ, polynucleotit thu được bằng cách lai khuôn lặc, lai vết tan, lai Southern hoặc kỹ thuật lai tương tự, sử dụng làm đoạn dò, toàn bộ hoặc một phần polynucleotit chứa trình tự nucleotit bổ sung với trình tự nucleotit của, *ví dụ*, SEQ ID NO: 10. Phương pháp lai có thể được sử dụng bao gồm các phương pháp được mô tả trong, ví dụ, "Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001," "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997," v.v.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "trình tự nucleotit bổ sung" không chỉ giới hạn ở các trình tự nucleotit mà tạo thành các cặp Watson-Crick với các trình tự nucleotit đích, mà cũng nhằm để bao gồm các trình tự nucleotit mà tạo thành các cặp bazơ Wobble. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ cặp Watson-Crick đề cập đến cặp nucleobazơ trong đó các liên kết hydro được tạo thành giữa adenin-thymin, adenin-uraxil hoặc guanin-xytosin, và thuật ngữ cặp bazơ Wobble đề cập đến cặp nucleobazơ trong đó các liên kết hydro được tạo thành giữa guanin-uraxil, inosin-uraxil, inosin-adenin hoặc inosin-xytosin. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "trình tự nucleotit bổ sung" không chỉ đề cập đến trình tự nucleotit 100% bổ trợ cho trình tự nucleotit đích mà còn đề cập đến trình tự nucleotit bổ sung mà có thể bao gồm, ví dụ, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc một nucleotide không bổ sung cho trình tự nucleotit đích.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” có thể là bất kỳ trong số các điều kiện nghiêm ngặt thấp, các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải hoặc các điều kiện nghiêm ngặt cao. Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt thấp” là, ví dụ, 5x SSC, 5x dung dịch Denhardt, SDS 0,5%, formamit 50% ở 32°C. Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải” là, ví dụ, 5x SSC, 5x dung dịch Denhardt, SDS 0,5%, formamit 50% ở 42°C, hoặc 5x SSC, SDS 1%, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), formamit 50% ở 42°C. Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt cao” là, ví dụ, 5x SSC, 5x dung dịch Denhardt, SDS 0,5%, formamit 50% ở 50°C hoặc 0,2 x SSC, SDS 0,1% ở 65°C. Trong các điều kiện này, polynucleotit với độ tương đồng cao hơn được mong đợi là thu được một cách hiệu quả ở các nhiệt độ cao hơn, mặc dù nhiều yếu tố liên quan đến sự nghiêm ngặt để lại bao gồm nhiệt độ, đoạn dò concentration, nồng độ đoạn dò, độ mạnh ion, thời gian, nồng độ muối và các yếu tố khác, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể lựa chọn một cách thích hợp các yếu tố này để đạt được sự nghiêm ngặt tương tự.

Khi các kit có bán trên thị trường được sử dụng để lại, ví dụ, an Alkphos Direct Labeling và Detection System (GE Healthcare) có thể được sử dụng. Trong trường hợp này, theo phương pháp kèm theo, sau khi nuôi cấy với mẫu dò được dán nhãn qua đêm, màng được rửa bằng đệm rửa sơ bộ chứa 0,1% (khối lượng/thể tích) SDS ở 55°C, nhờ đó phát hiện các polynucleotit được lai. Theo cách khác, trong sản xuất mẫu dò dựa trên toàn bộ hoặc một phần trình tự nucleotit hỗ trợ cho trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 10, việc lai có thể được phát hiện với kit dò axit nucleic DIG (Roche Diagnostics) khi mẫu dò được gắn nhãn với digoxigenin (DIG) sử dụng thuốc thử có sẵn trên thị trường (ví dụ, PCR Labeling Mix (Roche Diagnostics), v.v.).

Ngoài các polynucleotit được mô tả trên đây, các polynucleotit khác có thể được lai bao gồm các polynucleotit có 90% hoặc cao hơn, 91% hoặc cao hơn, 92% hoặc cao hơn, 93% hoặc cao hơn, 94% hoặc cao hơn, 95% hoặc cao hơn, 96% hoặc

cao hơn, 97% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, 99% hoặc cao hơn, 99,1% hoặc cao hơn, 99,2% hoặc cao hơn, 99,3% hoặc cao hơn, 99,4% hoặc cao hơn, 99,5% hoặc cao hơn, 99,6% hoặc cao hơn, 99,7% hoặc cao hơn, 99,8% hoặc cao hơn hoặc 99,9% hoặc cao hơn độ đồng nhất với polynucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2, như được tính toán bởi phần mềm tìm kiếm sự đồng nhất BLAST sử dụng các thông số mặc định.

Độ đồng nhất giữa các trình tự nucleotit có thể được xác định sử dụng thuật toán BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) bởi Karlin và Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873, 1993). Các chương trình BLASTN và BLASTX dựa trên thuật toán BLAST đã được phát triển (Altschul SF, et al: J. Mol. Biol. 215: 403, 1990). Khi trình tự nucleotit được đọc trình tự sử dụng BLASTN, các thông số là, ví dụ, điểm số=100 và độ dài chuỗi ký tự=12. Khi BLAST và Gapped BLAST được sử dụng, các thông số mặc định trong mỗi chương trình có thể được sử dụng.

Oligome theo sáng chế cụ thể là oligome đối nghĩa có chiều dài là 15 đến 30 bazơ trong đó hai oligome đơn vị được chọn từ nhóm bao gồm (a) và (b) sau đây được liên kết:

(a) oligome đơn vị chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp được chọn từ trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 1; và

(b) oligome đơn vị chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp được chọn từ trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2.

Ví dụ, trình tự nucleotit thứ nhất có thể là trình tự nucleotit gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp được chọn từ trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 1,

và/hoặc trình tự nucleotit thứ hai có thể là trình tự nucleotit gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp được chọn từ trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 2.

Tốt hơn là, oligome theo sáng chế là oligome đối nghĩa có chiều dài là 15 đến 30 bazơ trong đó hai oligome đơn vị được chọn từ nhóm bao gồm oligome từ (c) đến (e) dưới đây được liên kết:

(c) oligome đơn vị chứa trình tự bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp được chọn từ trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 3;

(d) oligome đơn vị chứa trình tự bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp được chọn từ trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 4; và

(e) oligome đơn vị chứa trình tự bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 15 bazơ nối tiếp được chọn từ trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 5.

Ở đây, các trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NOs: 1 và 2 là các trình tự tương ứng gồm các bazơ từ thứ nhất đến thứ 44 và bazơ từ 58 đến 115 từ đầu 5' của trình tự nucleotit của exon 44 (SEQ ID NO: 10) trong gen dystrophin kiểu đại của người.

Trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO: 3 là trình tự gồm các bazơ từ 18 đến 34 từ đầu 5' của trình tự nucleotit của exon 44 (SEQ ID NO: 10) trong gen dystrophin kiểu đại của người. Tương tự, các trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NOs: 4 và 5 là các trình tự tương ứng gồm bazơ thứ 61 đến 77 và bazơ thứ 88 đến 104.

Kích thước của mỗi oligome đơn vị từ (a) đến (e) (sau đây được gọi một cách đơn giản là "các đơn vị") là chiều dài gồm 7 đến 15 bazơ và tốt hơn là chiều dài gồm 8 đến 15 bazơ, chiều dài gồm 9 đến 15 bazơ, chiều dài gồm 10 đến 15 bazơ, chiều dài gồm 10 đến 14 bazơ, chiều dài gồm 10 đến 13 bazơ hoặc chiều dài gồm 11 đến 13 bazơ. Các đơn vị từ (a) đến (e) có thể có cùng kích thước hoặc có các kích thước khác nhau.

Để lựa chọn hai oligome đơn vị từ nhóm bao gồm (a) và (b), hai oligome đơn vị có thể là tổ hợp của các oligome đơn vị giống nhau hoặc có thể là tổ hợp của các oligome đơn vị khác nhau. Cụ thể là, hai oligome đơn vị có thể là tổ hợp của (a) và (a) hoặc tổ hợp của (b) và (b) hoặc có thể là tổ hợp của (a) và (b).

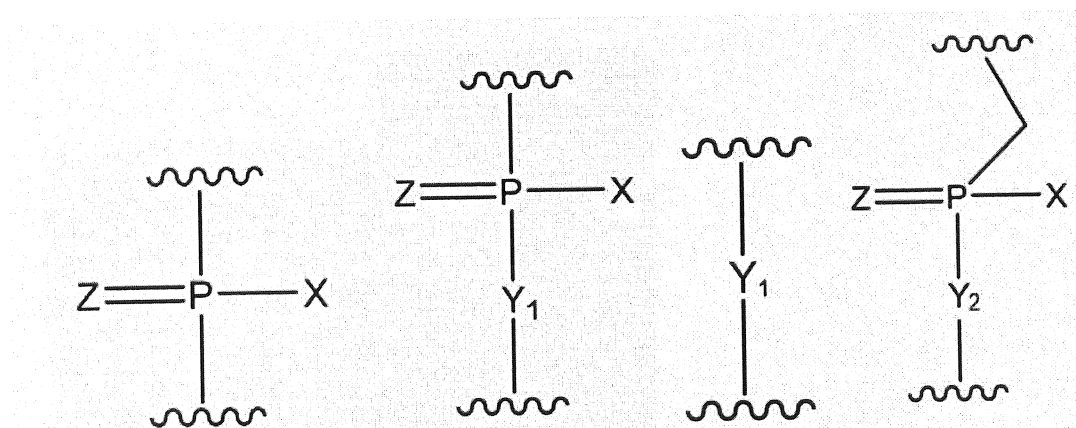
Để lựa chọn hai oligome đơn vị từ nhóm bao gồm (c) và (e), hai oligome đơn vị có thể là tổ hợp của các oligome đơn vị giống nhau hoặc có thể là tổ hợp của các oligome đơn vị khác nhau. Tốt hơn là, hai đơn vị là được lựa chọn một cách tương ứng từ các loại khác nhau. Khi, ví dụ, (c) được lựa chọn là một đơn vị, đơn vị khác tốt hơn là (d) hoặc (e). Tương tự, khi (d) được chọn là một đơn vị, đơn vị khác tốt hơn là (c) hoặc (e). Tương tự, khi (e) được chọn là một đơn vị, đơn vị khác tốt hơn là (c) hoặc (d).

Khi các đơn vị (a) và (b) được lựa chọn, một trong hai đơn vị được chọn có thể nằm phía đầu 5'. Khi các đơn vị (a) và (b) được lựa chọn, đơn vị (a) tốt hơn là được liên kết ở phía đầu 3'.

Khi hai đơn vị được lựa chọn từ (c) đến (e), một trong hai đơn vị được chọn có thể nằm phía đầu 5'. Khi các đơn vị (c) và (d) được lựa chọn, đơn vị (c) tốt hơn là được liên kết ở phía đầu 3'. Khi các đơn vị (d) và (e) được lựa chọn, đơn vị (d) tốt hơn là được liên kết ở phía đầu 3'. Khi các đơn vị (c) và (e) được lựa chọn, đơn vị (c) tốt hơn là được liên kết ở phía đầu 3'.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "liên kết" đề cập đến việc liên kết trực tiếp của hai đơn vị được chọn từ (a) và (b) hoặc hai đơn vị được chọn từ (c) đến (e). Cụ thể là, thuật ngữ "khi hai đơn vị được liên kết" có nghĩa là đầu 3' của đơn vị nằm phía đầu 5' và đầu 5' của đơn vị nằm phía đầu 3' tạo thành liên kết phosphat hoặc nhóm được thể hiện dưới đây.

Công thức 3



trong đó X biểu diễn $-\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{NR}^2\text{R}^3$ hoặc F;

R^1 biểu diễn H hoặc alkyl ;

R^2 và R^3 , có thể giống nhau hoặc khác nhau, mỗi gốc biểu diễn H, alkyl, xycloalkyl hoặc aryl;

Y_1 biểu diễn O, S, CH_2 hoặc NR^1 ;

Y_2 biểu diễn O, S hoặc NR^1 ;

Z biểu diễn O hoặc S.

Thuật ngữ "gây ra sự bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người" nhằm có nghĩa rằng bằng cách liên kết oligome theo sáng chế đến vị trí tương ứng với exon 44 của sản phẩm phiên mã (ví dụ, pre-mARN) của gen dystrophin của người, ví dụ, do đó dẫn đến sự tạo thành mARN trưởng thành mà không có sự dịch chuyển khung codon, trình tự nucleotit tương ứng với đầu 5' của exon 46 được cắt nối ở trình tự nucleotit tương ứng với đầu 3' của exon 43 trong các bệnh nhân DMD với sự xóa exon 45 khi sản phẩm phiên mã trải qua sự cắt nối.

Ở đây, thuật ngữ "liên kết" được mô tả trên đây nhằm có nghĩa rằng khi oligome theo sáng chế được kết hợp với đoạn phiên mã của gen dystrophin của người, cả hai được lai trong các điều kiện sinh lý để tạo thành axit nucleic sợi đôi. Thuật ngữ "trong các điều kiện sinh lý" đề cập đến các điều kiện thiết lập để bắt chước môi trường *in vivo* về khía cạnh độ pH, thành phần muối và nhiệt độ. Các điều kiện là, ví dụ, 25 đến 40°C, tốt hơn là 37°C, pH 5 đến 8, tốt hơn là pH 7,4 và 150 mM

nồng độ muối natri clorua.

Việc liệu sự bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin của người được gây ra hay không có thể được xác nhận bằng cách đưa oligome theo sáng chế vào tế bào biểu hiện dystrophin (ví dụ, các tế bào sarcoma cơ vân của người), phóng đại vùng xung quanh exon 44 của mARN của gen dystrophin của người từ RNA tổng của tế bào biểu hiện dystrophin bằng PCR theo thời gian thực và thực hiện PCR lồng hoặc phân tích trình tự trên sản phẩm được phóng đại của PCR.

Hiệu quả bỏ qua có thể được xác định như sau. mARN cho gen dystrophin của người được thu từ các tế bào thử nghiệm; trong mARN, mức polynucleotit "A" của sợi trong đó exon 44 được bỏ qua và mức polynucleotit "B" của sợi trong đó exon 44 không được bỏ qua được đo. Sử dụng các giá trị đo "A" và "B", hiệu quả được tính toán theo phương trình sau:

$$\text{Hiệu quả bỏ qua (\%)} = A/(A + B) \times 100$$

Theo cách khác, để tính toán hiệu quả bỏ qua, công bố đơn quốc tế WO2012/029986 có thể được tham khảo.

Tốt hơn là, oligome đối nghĩa theo sáng chế gây ra sự bỏ qua exon đích (ví dụ, exon 44) với hiệu quả bỏ qua là 10% hoặc cao hơn, 20% hoặc cao hơn, 30% hoặc cao hơn, 40% hoặc cao hơn, 50% hoặc cao hơn, 60% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, hoặc 90% hoặc cao hơn.

Oligome đối nghĩa theo sáng chế bao gồm, ví dụ, oligonucleotit, oligome morpholino hoặc oligome peptit axit nucleic (Peptide Nucleic Acid - PNA), có độ dài là 15 đến 30 nucleotit. Chiều dài tốt hơn là từ 16 đến 30, từ 17 đến 30, từ 18 đến 30, từ 19 đến 30, từ 20 đến 30, từ 20 đến 29, từ 20 đến 28, từ 20 đến 27, từ 20 đến 26, từ 21 đến 26, hoặc từ 22 đến 26 bazơ và morpholino các oligome là được ưu tiên.

Các oligonucleotit được mô tả trên đây (sau đây được đề cập là "oligonucleotit theo sáng chế") là oligome theo sáng chế chứa các nucleotit làm các

đơn vị cấu trúc. Các nucleotit này có thể là bất kỳ trong số các ribonucleotit, deoxyribonucleotit và các nucleotit cải biến.

Nucleotit cải biến đề cập đến nucleotit có toàn bộ hoặc một phần các bazơ nitơ được cải biến, các gốc đường và/hoặc các vùng liên kết phosphat, tạo thành ribonucleotit hoặc deoxyribonucleotit.

Bazơ nitơ bao gồm, ví dụ, adenin, guanin, hypoxanthin, xytosin, thymine, uraxil, và các bazơ cải biến của nó. Ví dụ về các bazơ cải biến này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, pseudouracil, 3-methyluracil, dihydrouracil, 5-alkylcytosines (ví dụ, 5-methylcytosine), 5-alkyluracils (ví dụ, 5-ethyluracil), 5-halouracils (5-bromouracil), 6-azapyrimidine, 6-alkylpyrimidines (6-methyluracil), 2-thiouracil, 4-thiouracil, 4-axetylcytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5'-carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-carboxymethylaminomethyluracil, 1-methyladenine, 1-methylhypoxanthine, 2,2-dimethylguanine, 3-methylcytosine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, N6-methyladenine, 7-methylguanine, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, 5-methylaminomethyluracil, 5-methylcarbonylmethyluracil, 5-methylxyuracil, 5-methyl-2-thiouracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, axit uraxil-5-oxaxetic, 2-thiocytosine, purine, 2,6-diaminopurine, 2-aminopurine, isoguanine, indole, imidazole, xanthine, v.v..

Sự cải biến gốc đường có thể bao gồm, ví dụ, các cải biến ở vị trí 2' của đường riboza và các cải biến ở các vị trí khác của đường. Sự cải biến ở vị trí 2' của riboza bao gồm sự thay thế nhóm 2'-OH của riboza với OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br hoặc I, trong đó R là alkyl hoặc aryl và R' là alkylen.

Sự cải biến các vị trí khác của đường bao gồm, ví dụ, sự thay thế của O ở vị trí 4' của riboza hoặc deoxyriboza với S, tạo cầu nối giữa vị trí 2' và 4' của đường, ví dụ, axit nucleic bị khóa (Locked Nucleic Acid - LNA) hoặc các axit nucleic được tạo cầu nối bằng 2'-O,4'-C-etylen (2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids - ENA),

nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Sự cải biến vùng liên kết với phosphat bao gồm, ví dụ, cải biến bằng cách liên kết phosphodiester với liên kết phosphorothioat, liên kết phosphorodithioat, liên kết alkyl phosphonat, liên kết phosphoroamidat hoặc liên kết boranophosphat (Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (cf., ví dụ, các công bố đơn trong nước của Nhật Bản của các đơn PCT số 2006/129594 và 2006/038608).

Alkyl tốt hơn là alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Các ví dụ cụ thể bao gồm metyl, etyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, isobutyl, *sec*-butyl, *tert*-butyl, *n*-pentyl, isopentyl, neopentyl, *tert*-pentyl, *n*-hexyl và isohexyl. Alkyl có thể tùy ý được thế. Ví dụ về các phần tử thế này là halogen, alkoxy, xyano và nitro. Alkyl có thể được thế bằng một đến ba phần tử thế như vậy.

Xycloalkyl tốt hơn là xycloalkyl có 5 đến 12 nguyên tử cacbon. Các ví dụ cụ thể bao gồm cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl, cyclooctyl, cyclodecyl và cyclododecyl.

Halogen bao gồm flo, clo, brom và iot.

Alkoxy là alkoxy mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 1 đến 6 nguyên tử cacbon như metoxy, etoxy, *n*-propoxy, isopropoxy, *n*-butoxy, isobutoxy, *sec*-butoxy, *tert*-butoxy, *n*-pentyloxy, isopentyloxy, *n*-hexyloxy, isohexyloxy, v.v.. Trong số các nhóm khác, alkoxy có 1 đến 3 nguyên tử cacbon là được ưu tiên.

Aryl tốt hơn là aryl có 6 đến 10 nguyên tử cacbon. Các ví dụ cụ thể bao gồm phenyl, α -naphthyl và β -naphthyl. Trong số các nhóm khác, ưu tiên là phenyl. Aryl có thể tùy ý được thế. Ví dụ về các phần tử thế này là alkyl, halogen, alkoxy, xyano và nitro. Aryl có thể được thế bằng một đến ba phần tử thế như vậy.

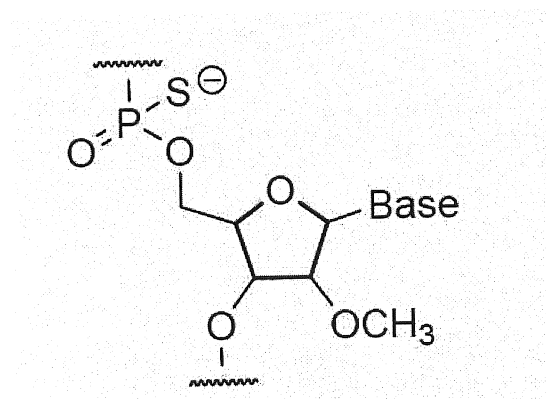
Trong sáng chế này, alkylen tốt hơn là alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh có 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Các ví dụ cụ thể bao gồm metylen, etylene, trimetylen, tetrametylen, pentametylen, hexametylen, 2-(etyl) trimetylen và 1-(metyl)

tetrametylen.

Axyl bao gồm alkanoyl hoặc aroyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Ví dụ về các alkanoyl bao gồm formyl, axetyl, 2-metylaxetyl, 2,2-dimetylaxetyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, pentanoyl, 2,2-dimetylpropionyl, hexanoyl, etc. Ví dụ về aroyl bao gồm benzoyl, toluoyl và naphthoyl. Aroyl có thể tùy ý được thế ở các vị trí có thể thế và có thể được thế bằng (các) alkyl.

Tốt hơn là, oligonucleotit theo sáng chế là oligome theo sáng chế chứa đơn vị cấu trúc được thể hiện bởi công thức chung dưới đây trong đó nhóm -OH ở vị trí 2' của riboza được thế bằng metoxy và vùng liên kết với phosphat là liên kết phosphorothioat:

Công thức 4

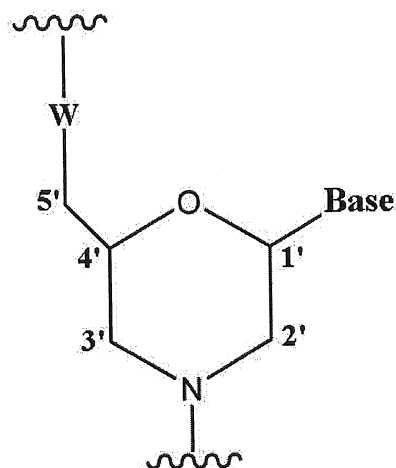


trong đó bazơ thế hiện bazơ nitơ.

Oligonucleotit theo sáng chế có thể dễ dàng được tổng hợp sử dụng các dụng cụ tổng hợp tự động (ví dụ, AKTA oligopilot cộng 10/100 (GE Healthcare)). Theo cách khác, sự tổng hợp cũng có thể được giao cho tổ chức là bên thứ ba (ví dụ, Promega Inc., Takara Co.), v.v..

Oligome morpholino được mô tả trên đây là oligome theo sáng chế chứa đơn vị cấu trúc thể hiện bởi công thức chung dưới đây:

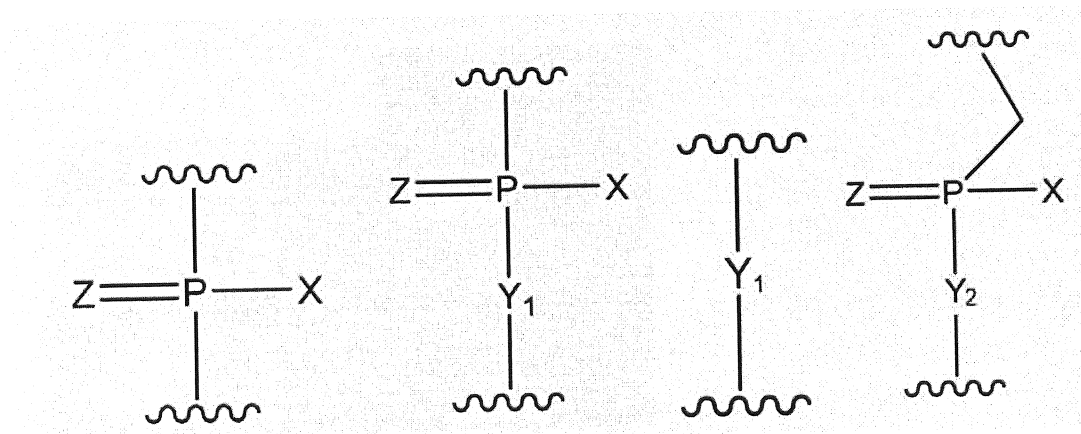
Công thức 5



trong đó bazơ có ý nghĩa như được xác định trên đây, và,

W biểu diễn nhóm được thể hiện bởi bất kỳ một trong số các nhóm sau đây:

Công thức 6



trong đó X biểu diễn $-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{NR}^2\text{R}^3$ hoặc F ;

R^1 biểu diễn H hoặc alkyl ;

R^2 và R^3 , có thể giống nhau hoặc khác nhau, mỗi gốc biểu diễn H, alkyl, xycloalkyl hoặc aryl;

Y_1 biểu diễn O, S, CH_2 hoặc NR^1 ;

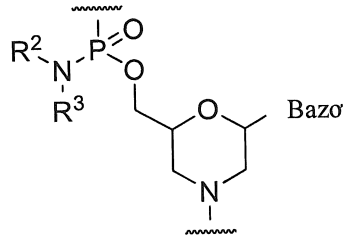
Y_2 biểu diễn O, S hoặc NR^1 ;

Z biểu diễn O hoặc S.

Tốt hơn là, oligome morpholino là oligome chứa đơn vị cấu trúc thể hiện bởi công thức chung dưới đây (phosphorodiamidate oligome morpholino (sau đây được

đề cập là "PMO"))).

Công thức 7



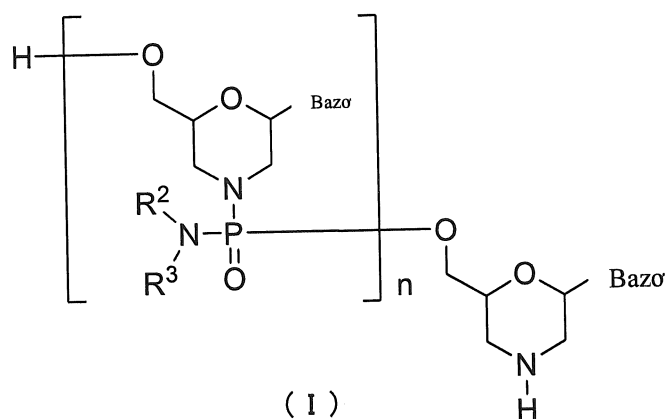
trong đó bazơ, R² và R³ có ý nghĩa như được xác định trên đây.

Oligome morpholino có thể được sản xuất theo, ví dụ, WO 1991/009033 hoặc WO 2009/064471. Cụ thể là, PMO có thể được sản xuất bởi quy trình được mô tả trong WO 2009/064471 hoặc WO2013/100190.

Phương pháp sản xuất PMO

Phương án của PMO là, ví dụ, hợp chất thể hiện bởi công thức chung (I) dưới đây (sau đây gọi là PMO (I)).

Công thức 8



trong đó bazơ, R² và R³ có ý nghĩa như được xác định trên đây; và ,

n là số nguyên từ 1 đến 99, tốt hơn là số nguyên xác định từ 18 đến 28.

PMO (I) có thể được sản xuất theo phương pháp đã biết, ví dụ, có thể được sản xuất bằng cách thực hiện các quy trình theo các bước sau đây.

Các hợp chất và các chất phản ứng được sử dụng trong các bước dưới đây

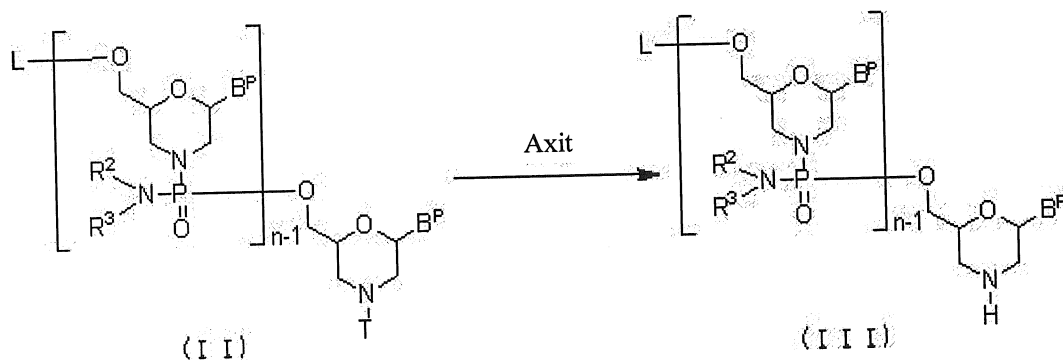
không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là chúng thường được sử dụng để tạo thành PMO.

Tương tự, các bước dưới đây có thể được thực hiện bằng phương pháp pha lỏng hoặc phương pháp pha rắn (sử dụng các dụng cụ tổng hợp pha rắn tự động có bán trên thị trường hoặc các dụng cụ tổng hợp điều khiển bằng tay). Trong sản xuất PMO bằng phương pháp pha rắn, mong muốn là sử dụng các dụng cụ tổng hợp tự động chú ý khía cạnh các quy trình thực hiện đơn giản và sự tổng hợp chính xác.

(1) Bước A:

Hợp chất thể hiện bởi công thức chung (II) dưới đây (sau đây được đề cập là hợp chất (II)) được cho phản ứng với axit để tạo thành hợp chất thể hiện bởi công thức chung (III) dưới đây (sau đây được đề cập là hợp chất (III)):

[Công thức 9]



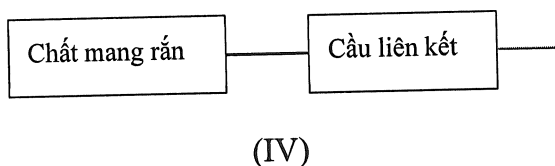
trong đó n, R² và R³ có ý nghĩa như được xác định trên đây;

mỗi B^p độc lập là bazơ nitơ có thể tùy ý được bảo vệ;

T biểu diễn trityl, monomethoxytrityl hoặc dimethoxytrityl; và,

L biểu diễn hydrogen, axyl hoặc nhóm thể hiện bởi công thức chung (IV) dưới đây (sau đây được đề cập là nhóm (IV)).

Công thức 10



"Bazơ nito" của B^P bao gồm "bazơ nito" giống trong bazơ, với điều kiện là nhóm amino hoặc nhóm hydroxy trong bazơ nito được thể hiện bởi B^P có thể được bảo vệ.

Nhóm bảo vệ amino như vậy không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó được sử dụng làm nhóm bảo vệ cho các axit nucleic. Các ví dụ cụ thể bao gồm benzoyl, 4-metoxibenzoyl, axetyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, phenylaxetyl, phenoxyaxetyl, 4-tert-butylphenoxyaxetyl, 4-isopropylphenoxyaxetyl và (dimethylamino)metylen. Các ví dụ cụ thể về nhóm bảo vệ cho nhóm hydroxy bao gồm 2-xyanoetyl, 4-nitrophenetyl, phenylsulfonyl, metylsulfonyl và trimethylsilyl, và phenyl, có thể được thế bằng 1 đến 5 nhóm thu điện tử ở các vị trí thay thế tùy ý, diphenylcarbamoyl, dimethylcarbamoyl, diethylcarbamoyl, methylphenylcarbamoyl, 1-pyrolidinylcarbamoyl, morpholinocarbamoyl, 4-(tert-butylcarboxy) benzyl, 4-[(dimethylamino)carboxy]benzyl và 4-(phenylcarboxy)benzyl, (cũng xem, *ví dụ*, WO 2009/064471).

"Chất mang rắn" không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là chất mang có thể sử dụng cho phản ứng pha rắn của các axit nucleic. Mong muốn đối với chất mang rắn là có các đặc tính sau đây: *Ví dụ*, (i) nó hòa tan một cách hạn chế trong các chất phản ứng mà có thể được sử dụng để tổng hợp các chất dẫn xuất morpholino axit nucleic (*ví dụ*, diclometan, axetonitril, tetrazol, *N*-metylimidazol, pyridin, axetic anhydrit, lutidin, axit trifloaxetic); (ii) nó ổn định về mặt hóa học đối với các chất phản ứng có thể sử dụng để tổng hợp các chất dẫn xuất morpholino axit nucleic; (iii) nó có thể bị biến đổi về mặt hóa học; (iv) nó có thể được mang điện bởi các chất dẫn xuất morpholino axit nucleic; (v) nó có độ mạnh đủ để chịu được áp suất cao qua các xử lý; và (vi) có khoảng đường kính hạt và sự phân bố đồng nhất. Cụ thể là, polystyren có thể phòng được (*ví dụ*, nhựa aminometyl polystyren 1% tạo liên kết chéo với dibenzylbenzen (200-400 lổ) (2,4-3,0 mmol/g) (sản xuất bởi Tokyo

Chemical Industry), nhựa polystyren được aminometylát·HCl [dibenzylbenzen 1%, 100-200 lĩ] (sản xuất bởi Peptide Institute, Inc.)), polystyren không phòng được (ví dụ, Primer Support (sản xuất bởi GE Healthcare)), polystyren được gắn PEG (ví dụ, nhựa NH₂-PEG (sản xuất bởi Watanabe Chemical Co.), nhựa TentaGel), thủy tinh có lỗ được kiểm soát (Controlled Pore Glass- CPG) (sản xuất bởi, ví dụ, CPG), oxalyl-CPG (cũng xem, ví dụ, Alul et al., Nucleic Acids Research, Vol. 19, 1527 (1991)), chất phụ trợ tạo dẫn xuất với aminopolyetylen glycol TentaGel (ví dụ, Wright et al., cf., Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993)), và copolyme của Poros-polystyren/divinylbenzen.

"Chất tạo liên kết" có thể được sử dụng là chất tạo liên kết đã biết, thường được sử dụng để nối các axit nucleic hoặc các dẫn xuất morpholino axit nucleic. Các ví dụ bao gồm 3-aminopropyl, succinyl, 2,2'-diethanolsulfonyl và alkyl amino mạch dài (Long Chain Alkyl Amino -LCAA).

Bước này có thể được thực hiện bằng cách cho hợp chất (II) phản ứng với axit.

"Axit" có thể được sử dụng trong bước này bao gồm, ví dụ, axit trifloaxetic, axit dicloaxetic và axit tricloaxetic. Axit được sử dụng là thích hợp trong khoảng từ, ví dụ, 0,1 mol đương lượng đến 1000 mol đương lượng dựa trên 1 mol hợp chất (II), tốt hơn là nằm trong khoảng 1 mol đương lượng đến 100 mol đương lượng dựa trên 1 mol hợp chất (II).

Amin hữu cơ có thể được sử dụng phối hợp với axit được mô tả trên đây. Amin hữu cơ không bị giới hạn một cách đặc biệt và bao gồm, ví dụ, trietylamin. Lượng amin hữu cơ được sử dụng một cách thích hợp trong khoảng từ, ví dụ, 0,01 mol đương lượng đến 10 mol đương lượng, và tốt hơn là trong khoảng từ 0,1 mol đương lượng đến 2 mol đương lượng, dựa trên 1 mol axit.

Khi muối hoặc hỗn hợp axit và amin hữu cơ được sử dụng trong bước này,

muối hoặc hỗn hợp bao gồm, ví dụ, muối hoặc hỗn hợp của axit trifloaxetic và triethylamin, và cụ thể hơn, hỗn hợp của 1 đương lượng của triethylamin và 2 đương lượng của axit trifloaxetic.

Axit có thể được sử dụng trong bước này cũng có thể được sử dụng ở dạng chất pha loãng với dung môi thích hợp ở nồng độ là 0,1% đến 30%. Dung môi không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là trơ đối với phản ứng, và bao gồm, ví dụ, diclometan, axetonitril, rượu cồn (etanol, isopropanol, trifloetanol, v.v.), nước, hoặc hỗn hợp của nó.

Nhiệt độ phản ứng trong phản ứng được mô tả trên đây tốt hơn là trong khoảng từ, ví dụ, 10°C đến 50°C, tốt hơn nữa là, trong khoảng từ 20°C đến 40°C, và tốt nhất là, trong khoảng từ 25°C đến 35°C.

Thời gian phản ứng có thể thay đổi phụ thuộc vào loại axit sử dụng và nhiệt độ phản ứng, và thích hợp là trong khoảng từ 0,1 phút đến 24 giờ nói chung, và tốt hơn là trong khoảng từ 1 phút đến 5 giờ.

Sau khi hoàn thành bước này, bazơ có thể được thêm vào, nếu cần, để trung hòa axit còn lại trong hệ thống. "Bazo" không bị giới hạn một cách cụ thể và bao gồm, ví dụ, diisopropylamin. Bazơ cũng có thể được sử dụng ở dạng chất pha loãng với dung môi thích hợp ở nồng độ là 0,1% (thể tích/thể tích) đến 30% (thể tích/thể tích).

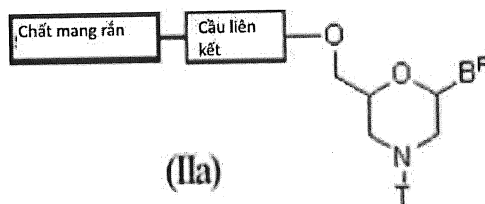
Dung môi được dùng trong bước này không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó trơ với phản ứng, và bao gồm diclometan, axetonitril, rượu cồn (etanol, isopropanol, trifloetanol, v.v.), nước, và hỗn hợp của nó. Nhiệt độ phản ứng tốt hơn là trong khoảng từ, ví dụ, 10°C đến 50°C, tốt hơn nữa là, trong khoảng từ 20°C đến 40°C, và tốt nhất là, trong khoảng từ 25°C đến 35°C.

Thời gian phản ứng có thể thay đổi phụ thuộc vào loại bazơ sử dụng và nhiệt độ phản ứng, và thích hợp là trong khoảng từ 0,1 phút đến 24 giờ nói chung, và tốt

hơn là trong khoảng từ 1 phút đến 5 giờ.

Trong hợp chất (II), hợp chất có công thức chung (IIa) dưới đây (sau đây gọi là hợp chất (IIa)), trong đó n là 1 và L là nhóm (IV), có thể được sản xuất theo quy trình sau đây.

Công thức 11

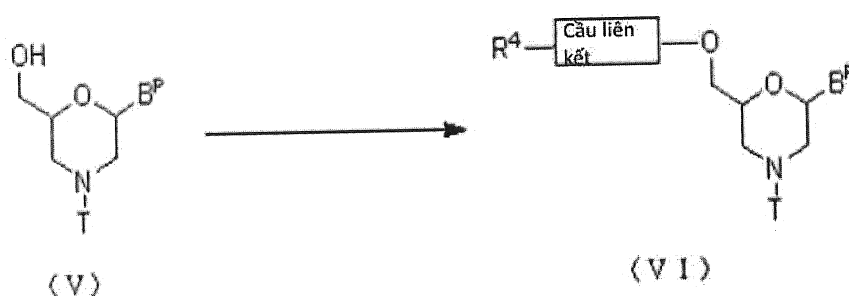


trong đó B^P , T, chất tạo liên kết và chất mang rắn có ý nghĩa như được xác định trên đây.

Bước 1:

Hợp chất thể hiện bởi công thức chung (V) dưới đây được cho phản ứng với tác nhân axyl hóa để tạo thành hợp chất thể hiện bởi công thức chung (VI) dưới đây (sau đây được đề cập là hợp chất (VI)).

Công thức 12



trong đó B^P , T và chất tạo liên kết có ý nghĩa như được xác định trên đây; và,

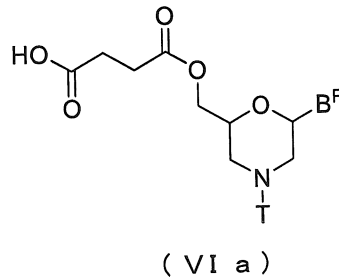
R^4 biểu diễn hydroxy, halogen, nhóm carboxyl hoặc amino.

Bước này có thể được thực hiện bằng các quy trình đã biết để đưa vào các chất tạo liên kết, sử dụng hợp chất (V) làm vật liệu khởi đầu.

Cụ thể, hợp chất thể hiện bởi công thức chung (VIa) dưới đây có thể được sản

xuất bằng cách thực hiện phương pháp đã biết để este hóa, sử dụng hợp chất (V) và anhydrit succinic.

Công thức 13

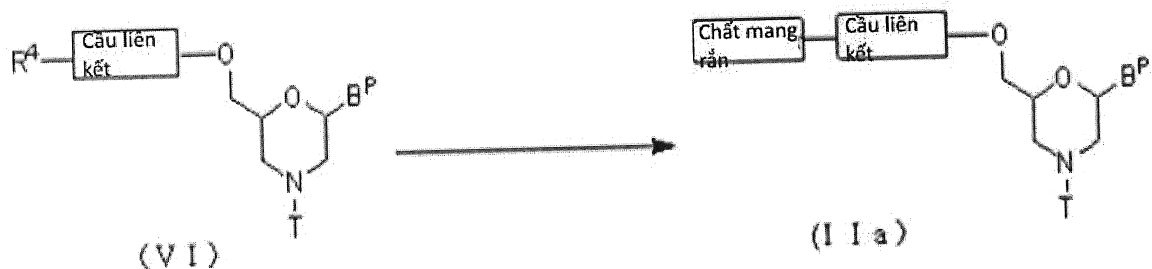


trong đó B^P và T có ý nghĩa như được xác định trên đây.

Bước 2:

Hợp chất (VI) được cho phản ứng với chất mang rắn bằng tác nhân ngưng tụ để tạo thành hợp chất (IIa).

Công thức 14

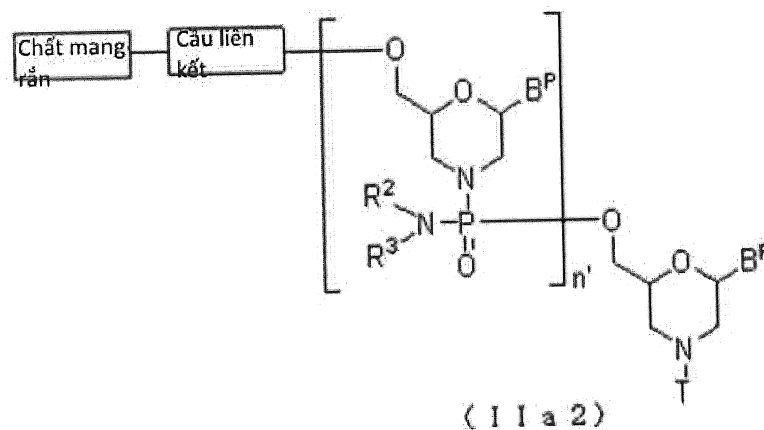


trong đó B^P , R^4 , T, chất tạo liên kết và chất mang rắn có ý nghĩa như được xác định trên đây.

Bước này có thể được thực hiện sử dụng hợp chất (VI) và chất mang rắn theo quy trình đã biết làm phản ứng ngưng tụ.

Trong hợp chất (II), hợp chất thể hiện bởi công thức chung (IIa2) dưới đây trong đó n là từ 2 đến 99 và L là nhóm thể hiện bởi công thức chung (IV) có thể được sản xuất bằng sử dụng hợp chất (IIa) làm vật liệu khởi đầu và lặp lại bước A và bước B của phương pháp sản xuất PMO được mô tả trong bản mô tả về số lần mong muốn.

Công thức 15

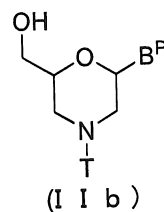


trong đó B^P , R^2 , R^3 , T , chất tạo liên kết và chất mang rắn có ý nghĩa như được xác định trên đây; và ,

n' là từ 1 đến 98.

Trong hợp chất (II), hợp chất có công thức chung (IIb) dưới đây trong đó n là 1 và L là hydro có thể được điều chế bằng quy trình được mô tả trong, ví dụ, WO 1991/009033.

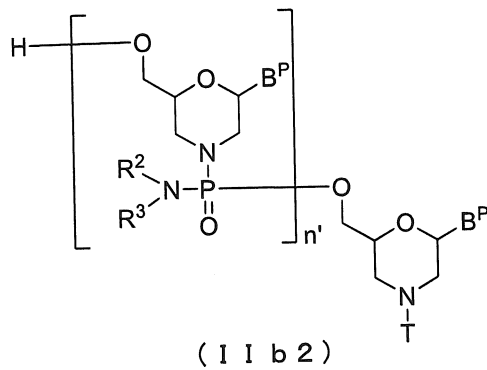
Công thức 16



trong đó B^P và T có ý nghĩa như được xác định trên đây.

Trong hợp chất (II), hợp chất thể hiện bởi công thức chung (IIb2) dưới đây trong đó n là từ 2 đến 99 và L là hydro có thể được sản xuất bằng sử dụng hợp chất (IIb) làm vật liệu khởi đầu và lặp lại bước A và bước B của phương pháp sản xuất PMO được mô tả trong bản mô tả về số lần mong muốn.

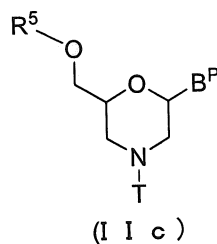
Công thức 17



trong đó B^p, n', R², R³ và T có nghĩa như được xác định trên đây.

Trong hợp chất (II), hợp chất được biểu diễn bởi công thức chung (IIc) dưới đây trong đó n là 1 và L là axyl có thể được điều chế bằng cách thực hiện quy trình đã biết là phản ứng axyl hóa, sử dụng hợp chất (IIb).

Công thức 18

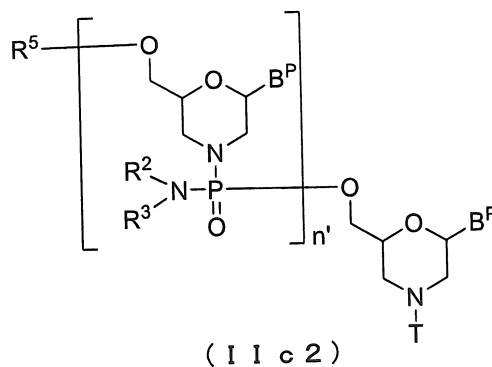


trong đó B^p và T có ý nghĩa giống như được xác định trên đây; và,

R⁵ biểu diễn axyl.

Trong hợp chất (II), hợp chất được biểu diễn bởi công thức chung (IIc2) dưới đây trong đó n là 2 đến 99 và L là axyl có thể được điều chế bằng cách sử dụng hợp chất (IIc) làm vật liệu khởi đầu và lặp lại bước A và bước B của phương pháp sản xuất PMO được mô tả trong bản mô tả về số lần mong muốn.

Công thức 19

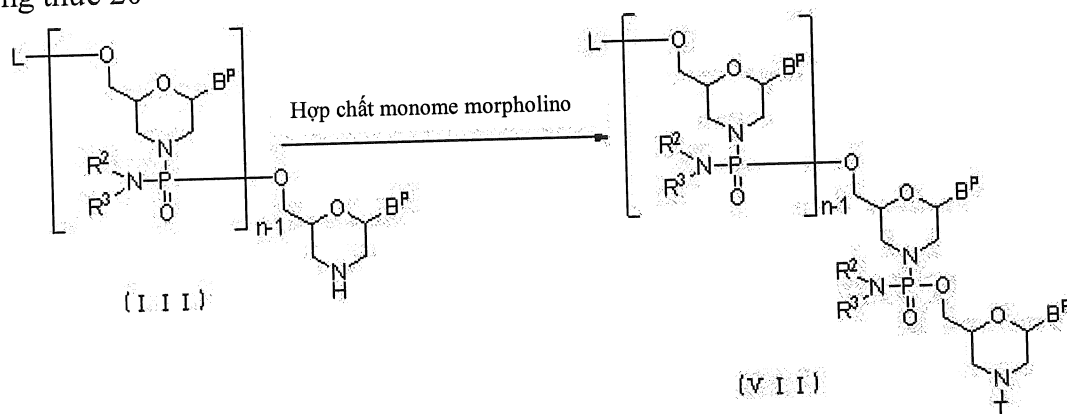


trong đó B^P , n' , R^2 , R^3 , R^5 và T có ý nghĩa giống như được xác định trên đây.

(2) Bước B

Hợp chất (III) được cho phản ứng với hợp chất monome morpholino với sự có mặt của bazơ để tạo thành hợp chất thể hiện bởi công thức chung (VII) dưới đây (sau đây được đề cập là hợp chất (VII)):

Công thức 20

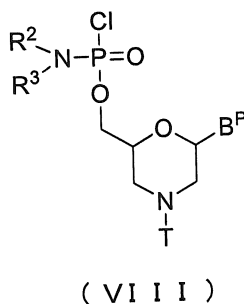


trong đó B^P , L , n , R^2 , R^3 và T có ý nghĩa như được xác định trên đây.

Bước này có thể được thực hiện bằng cách cho hợp chất (III) phản ứng với hợp chất monome morpholino với sự có mặt của bazơ.

Hợp chất monome morpholino bao gồm, ví dụ, các hợp chất thể hiện bởi công thức chung (VIII) dưới đây:

Công thức 21



trong đó B^P , R^2 , R^3 và T có ý nghĩa như được xác định trên đây.

"Bazo" có thể được sử dụng trong bước này bao gồm, ví dụ, diisopropylamin, triethylamin và N-ethylmorpholin. Lượng bazơ được sử dụng thích hợp là trong khoảng từ 1 mol đương lượng đến 1000 mol đương lượng dựa trên 1 mol của hợp chất (III),

tốt hơn là, 10 mol đương lượng đến 100 mol đương lượng dựa trên 1 mol của hợp chất (III).

Hợp chất monome morpholino và bazơ có thể được sử dụng trong bước này cũng có thể được sử dụng làm chất pha loãng với dung môi thích hợp ở nồng độ là 0,1% đến 30%. Dung môi không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó trơ với phản ứng, và bao gồm, ví dụ, N,N-dimetylimidazolidone, N-metylpiperidone, DMF, diclometan, axetonitril, tetrahydrofuran, hoặc hỗn hợp của nó.

Nhiệt độ phản ứng tốt hơn là trong khoảng từ, *ví dụ*, 0°C đến 100°C, và tốt hơn nữa là, trong khoảng từ 10°C đến 50°C.

Thời gian phản ứng có thể thay đổi phụ thuộc vào loại bazơ được sử dụng và nhiệt độ phản ứng, và thích hợp là trong khoảng từ 1 phút đến 48 giờ nói chung, và tốt hơn là trong khoảng từ 30 phút đến 24 giờ.

Ngoài ra, sau khi hoàn thành bước này, tác nhân axyl hóa có thể được thêm vào, nếu cần. "Tác nhân axyl hóa" bao gồm, ví dụ, axetic anhydrit, axetyl clorua và phenoxyaxetic anhydrit. Tác nhân axyl hóa cũng có thể được sử dụng làm chất pha loãng với dung môi thích hợp ở nồng độ là 0,1% đến 30%. Dung môi không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là trơ đối với phản ứng, và bao gồm, ví dụ, diclometan, axetonitril, rượu cồn (etanol, isopropanol, trifloetanol, v.v.), nước, hoặc hỗn hợp của nó.

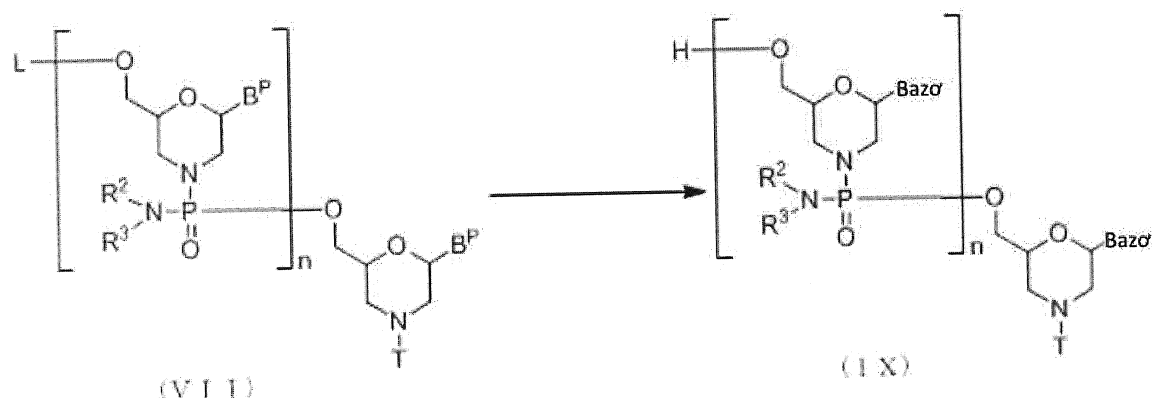
Nếu cần, bazơ như pyridin, lutidin, collidin, trietylamin, diisopropyletylamin, N-etylmorpholin, v.v. cũng có thể được sử dụng phối hợp với tác nhân axyl hóa. Lượng tác nhân axyl hóa thích hợp là trong khoảng từ 0,1 mol đương lượng đến 10000 mol đương lượng, và tốt hơn là trong khoảng từ 1 mol đương lượng đến 1000 mol đương lượng. Lượng bazơ thích hợp là trong khoảng từ, *ví dụ*, 0,1 mol đương lượng đến 100 mol đương lượng, và tốt hơn là trong khoảng từ 1 mol đương lượng đến 10 mol đương lượng, dựa trên 1 mol tác nhân axyl hóa.

Nhiệt độ phản ứng trong phản ứng này tốt hơn là trong khoảng từ 10°C đến 50°C, tốt hơn nữa là, trong khoảng từ 10°C đến 50°C, tốt hơn nhiều nữa là, trong khoảng từ 20°C đến 40°C, và tốt nhất là, trong khoảng từ 25°C đến 35°C. Thời gian phản ứng có thể thay đổi phụ thuộc vào loại tác nhân axyl hóa được sử dụng và nhiệt độ phản ứng, và thích hợp là trong khoảng từ 0,1 phút đến 24 giờ nói chung, và tốt hơn là trong khoảng từ 1 phút đến 5 giờ.

(3) Bước C:

Trong hợp chất (VII) được tạo ra trong bước B, nhóm bảo vệ được loại bỏ sử dụng tác nhân khử bảo vệ để tạo thành hợp chất thể hiện bởi công thức chung (IX).

Công thức 22



trong đó bazo, B^p, L, n, R², R³ và T có ý nghĩa như được xác định trên đây.

Bước này có thể được thực hiện bằng cách cho hợp chất (VII) phản ứng với tác nhân khử bảo vệ.

"Tác nhân khử bảo vệ" bao gồm, ví dụ, nước amoniac đậm đặc và metylamin. "Tác nhân khử bảo vệ" được dùng trong bước này cũng có thể được sử dụng làm chất pha loãng với, ví dụ, nước, metanol, etanol, rượu isopropyl, axetonitril, tetrahydrofuran, DMF, N,N-dimetylimidazolidon, N-metylpiperidon, hoặc hỗn hợp của các dung môi này. Trong số các chất này, ưu tiên là etanol. Lượng tác nhân khử bảo vệ được sử dụng thích hợp là trong khoảng từ, 1 mol đương lượng đến 100000 mol đương lượng, và tốt hơn là trong khoảng từ 10 mol đương lượng đến 1000 mol

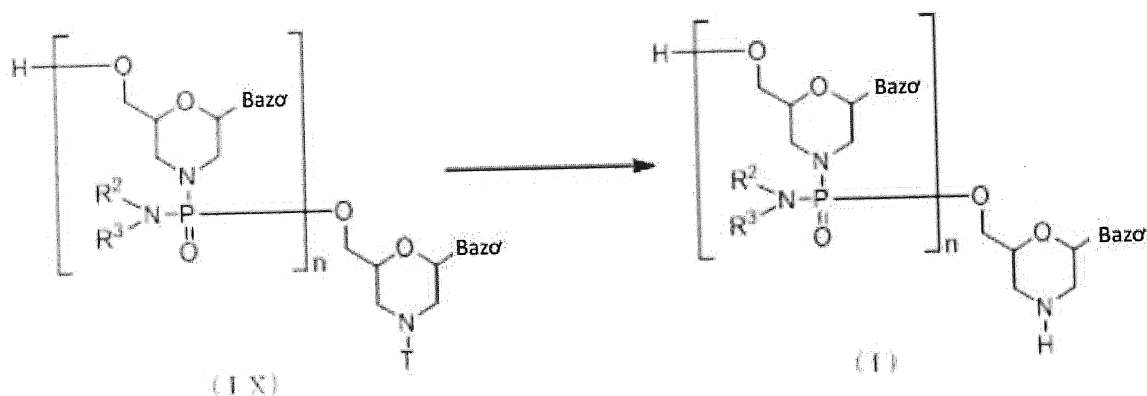
đương lượng, dựa trên 1 mol của hợp chất (VII).

Nhiệt độ phản ứng thích hợp là trong khoảng từ 15°C đến 75°C, tốt hơn là, trong khoảng từ 40°C đến 70°C, và tốt hơn nữa là, trong khoảng từ 50°C đến 60°C. Thời gian phản ứng để khử bảo vệ có thể thay đổi phụ thuộc vào loại hợp chất (VII), nhiệt độ phản ứng, v.v., và thích hợp là trong khoảng từ 10 phút đến 30 giờ, tốt hơn là 30 phút đến 24 giờ, và tốt hơn nữa là trong khoảng từ 5 giờ đến 20 giờ.

(4) Bước D:

PMO (I) được sản xuất bằng cách cho hợp chất (IX) được tạo ra trong bước C phản ứng với axit:

Công thức 23



trong đó $bazo$, n , R^2 , R^3 và T có ý nghĩa như được xác định trên đây.

Bước này có thể được thực hiện bằng cách thêm axit vào hợp chất (IX).

"Axit" có thể được sử dụng trong bước này bao gồm, ví dụ, axit tricloaxetic, axit dicloaxetic, axit axetic, axit phosphoric, axit clohydric, v.v.. Axit được sử dụng được sử dụng một cách thích hợp để cho phép dung dịch có độ pH trong khoảng từ 0,1 đến 4,0, và tốt hơn nữa là, trong khoảng từ pH 1,0 đến 3,0. Dung môi không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó trợ với phản ứng, và bao gồm, ví dụ, axetonitril, nước, hoặc hỗn hợp của các dung môi của chúng.

Nhiệt độ phản ứng thích hợp là trong khoảng từ 10°C đến 50°C, tốt hơn là trong khoảng từ 20°C đến 40°C, và tốt hơn nữa là, trong khoảng từ 25°C đến 35°C.

Thời gian phản ứng để khử bảo vệ có thể thay đổi phụ thuộc vào kind của hợp chất (IX), nhiệt độ phản ứng, v.v., và thích hợp là trong khoảng từ 0,1 phút đến 5 giờ, tốt hơn là 1 phút đến 1 giờ, và tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1 phút đến 30 phút.

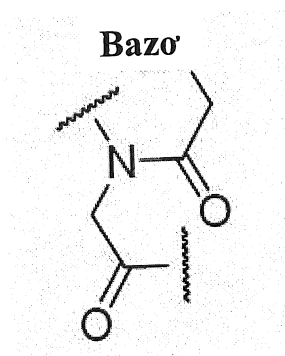
PMO (I) có thể thu được bằng cách cho hỗn hợp phản ứng thu được trong bước này vào các phương pháp tách và tinh sạch thông thường như chiết, cô đặc, trung hòa, lọc, tách bằng ly tâm, kết tinh lại, sắc ký cột pha đảo C_8 đến C_{18} , sắc ký cột trao đổi ion, sắc ký cột trao đổi anion, sắc ký cột lọc gel, sắc ký lỏng hiệu năng cao, tấm tách, siêu lọc, v.v., riêng rẽ hoặc ở dạng phối hợp của các phương pháp này. Do đó, PMO (I) mong muốn có thể được phân tách và tinh sạch (cũng xem, *ví dụ*, WO 1991/09033).

Trong tinh sạch PMO (I) sử dụng sắc ký pha đảo, *ví dụ*, hỗn hợp dung dịch 20 mM triethylamin/đệm axetate và axetonitril có thể được sử dụng làm dung môi rửa giải.

Trong tinh sạch PMO (I) sử dụng sắc ký trao đổi ion, *ví dụ*, hỗn hợp dung dịch của dung dịch muối 1 M và dung dịch nước natri hydroxit 10 mM có thể được sử dụng làm dung môi rửa giải.

Peptit axit nucleic được mô tả trên đây là oligome theo sáng chế có nhóm được biểu diễn bằng công thức chung sau đây là đơn vị cấu trúc:

Công thức 24



trong đó bazơ có ý nghĩa như được xác định trên đây.

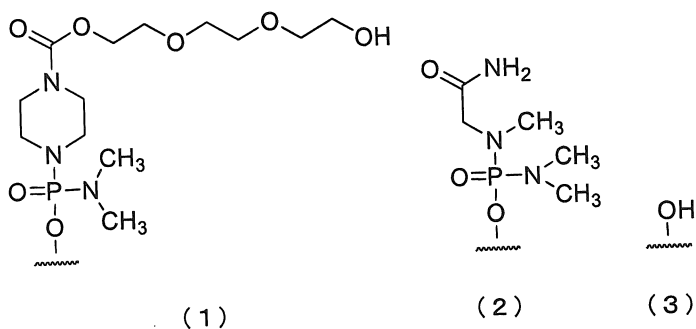
Các peptit axit nucleic có thể được sản xuất bằng cách tham khảo đến, *ví dụ*,

các tài liệu sau đây.

- 1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Science, 254, 1497 (1991)
- 2) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, JACS., 114, 1895 (1992)
- 3) K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, J. Org. Chem., 59, 5767 (1994)
- 4) L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, J. Pept. Sci., 1, 175 (1995)
- 5) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Orum, J. Pept. Res., 49, 80 (1997)

Trong oligome theo sáng chế, đầu 5' có thể là cấu trúc hóa học bất kỳ từ (1) đến (3) dưới đây, và tốt hơn là (3)-OH.

Công thức 25



Sau đây, các nhóm được thể hiện bởi (1), (2) và (3) trên đây được đề cập đến tương ứng là "nhóm (1)", "nhóm (2)" và "nhóm (3)".

2. Dược phẩm

Oligome theo sáng chế gây ra sự bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin. Do

đó, được mong đợi rằng các tình trạng của chúng loạn dưỡng cơ có thể được giảm nhẹ bằng cách sử dụng dược phẩm chứa oligome theo sáng chế cho bệnh nhân DMD, người có đột biến đích là bỏ qua exon 44, đó là đột biến biến đổi thành trong khung bởi sự bỏ qua exon 44. Tương tự, quy trình sản xuất oligome theo sáng chế mà có chiều dài chuỗi ngắn, là đơn giản và chi phí sản xuất oligome theo sáng chế có thể được giảm đi.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất dược phẩm để điều trị chứng loạn dưỡng cơ, chứa oligome theo sáng chế làm thành phần hoạt tính, muối được dụng hoặc hydrat của nó (sau đây được đề cập là "dược phẩm theo sáng chế").

Ví dụ về muối được dụng của oligome theo sáng chế chứa trong dược phẩm theo sáng chế là các muối kim loại kiềm như các muối của natri, kali và lithi; các muối kim loại kiềm thổ như các muối của canxi và magie; các muối kim loại như các muối của nhôm, sắt, kẽm, đồng, niken, coban, v.v.; các muối amoni; các muối amin hữu cơ như các muối của t-octylamin, dibenzylamin, morpholin, glucosamin, phenylglyxin alkyl este, etylenediamin, *N*-metylglucamin, guanidin, dietylamin, trietylamin, dicyclohexylamin, *N, N'*-dibenzyletylendiamin, cloroprocain, procain, dietanolamin, *N*-benzylphenetylamin, piperazin, tetrametylamoni, tris(hydroxymetyl)aminometan; các muối hydrohalua như các muối của hydroflorat, hydroclorua, hydrobromua và hydroiodua; muối của các axit vô cơ như nitrat, perchlorat, sulfat, phosphat, v.v.; các sulfonat alkan thấp như metansulfonat, triflometansulfonat và etansulfonat; các arylsulfonat như benzensulfonat và p-toluensulfonat; các muối của axit hữu cơ như axetat, malat, fumarat, succinat, xitrat, tartarat, oxalat, maleat, v.v.; và , các muối axit amin như muối của glyxin, lysin, arginin, ornithin, axit glutamic và axit aspartic. Các muối này có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết. Theo cách khác, oligome theo sáng chế chứa trong dược phẩm theo sáng chế có thể ở dạng hydrat của nó.

Đường dùng được phẩm theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là đường được được dụng, và có thể được chọn phụ thuộc vào phương pháp điều trị. Xét đến việc dễ cấp đến các mô cơ, được ưu tiên là dùng trong tĩnh mạch, dùng trong động mạch, dùng trong cơ, dùng dưới da, dùng qua đường miệng, dùng cho mô, dùng qua da, v.v. Ngoài ra, các dạng liều dùng khả thi cho chế phẩm theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể, và bao gồm, ví dụ, các dạng tiêm khác nhau, các tác nhân dùng đường miệng, các thuốc nhỏ, các dạng xông hít, các thuốc mỡ, các thuốc xức, v.v.

Trong việc dùng oligome theo sáng chế cho bệnh nhân mắc chứng loạn dưỡng cơ, được phẩm theo sáng chế tốt hơn là chứa chất mang để thúc đẩy sự cấp oligome đến các mô cơ. Chất mang này không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là được dụng, và các ví dụ bao gồm các chất mang cation như cation liposome, cation polyme, v.v., hoặc các chất mang sử dụng vỏ virus. Các cation liposome là, ví dụ, các liposome chứa 2-O-(2-diethylaminoethyl)carbamoyl-1,3-O-dioleoylglycerol và các phospholipit làm các hợp phần chính (sau đây được đề cập là "liposome A"), Oligofectamine (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Invitrogen Corp.), Lipofectin (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Invitrogen Corp.), Lipofectamine (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Invitrogen Corp.), Lipofectamine 2000 (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Invitrogen Corp.), DMRIE-C (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Invitrogen Corp.), GeneSilencer (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Gene Therapy Systems), TransMessenger (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi QIAGEN, Inc.), TransIT TKO (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Mirus) và Nucleofector II (Lonza). Trong số các chất khác, liposome A là được ưu tiên. Ví dụ về các cation polyme là JetSI (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Qbiogene, Inc.) và Jet-PEI (nhãn hiệu đã đăng ký) (polyetylenimin, sản xuất bởi Qbiogene, Inc.). Ví dụ về các chất mang sử dụng vỏ virus là GenomeOne (nhãn hiệu đã đăng ký) (HVJ-E liposome,

sản xuất bởi Ishihara Sangyo). Theo cách khác, các dụng cụ y tế được mô tả trong patent Nhật Bản số 2924179 và các chất mang cation được mô tả trong Công bố lại đơn nội địa Nhật Bản của các đơn PCT số 2006/129594 và 2008/096690 cũng có thể được sử dụng.

Nồng độ của oligome theo sáng chế chứa trong dược phẩm theo sáng chế có thể thay đổi phụ thuộc vào loại chất mang, v.v., và thích hợp là trong khoảng từ 0,1 nM đến 100 μ M, tốt hơn là nằm trong khoảng 1 nM đến 10 μ M, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10 nM đến 1 μ M. Tỷ lệ khối lượng của oligome theo sáng chế có trong dược phẩm theo sáng chế và chất mang (chất mang/oligome theo sáng chế) có thể thay đổi phụ thuộc vào tính chất oligome, loại chất mang, v.v., và thích hợp là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100, tốt hơn là nằm trong khoảng 1 đến 50, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10 đến 20.

Ngoài oligome theo sáng chế và chất mang được mô tả trên đây, các chất phụ gia được dụng cũng có thể tùy ý được đưa vào dạng bào chế của dược phẩm theo sáng chế. Ví dụ về các phụ gia này là các chất hỗ trợ nhũ hóa (ví dụ, các axit béo có 6 đến 22 nguyên tử cacbon và các muối được dụng của chúng, albumin và dextran), các chất ổn định (ví dụ, cholesterol và axit phosphatidic), các chất làm đẳng trương (ví dụ, natri clorua, glucoza, maltoza, lactoza, sucroza, trehaloza), và các chất kiểm soát pH (ví dụ, axit clohydric, axit sulfuric, axit phosphoric, axit axetic, natri hydroxit, kali hydroxit và trietanolamin). Một hoặc nhiều các chất phụ gia này có thể được sử dụng. Hàm lượng của chất phụ gia trong dược phẩm theo sáng chế thích hợp là 90% khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 70% khối lượng hoặc nhỏ hơn và tốt hơn nữa là, 50% khối lượng hoặc nhỏ hơn.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế bằng cách thêm oligome theo sáng chế vào dịch phân tán chất mang và khuấy hỗn hợp thích hợp. Các chất phụ gia có thể được thêm vào ở bước thích hợp trước hoặc sau khi thêm oligome theo sáng

chế. Dung môi dạng nước có thể được sử dụng trong khi thêm oligome theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là được dụng, và các ví dụ là nước tiêm được hoặc nước cất tiêm được, chất lỏng điện ly như muối sinh lý, v.v., và dịch đường như dịch đường glucoza, dịch đường mantoza, v.v. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể chọn lựa một cách thích hợp các điều kiện về pH và nhiệt độ cho mục đích này.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành, ví dụ, dạng lỏng và dạng bào chế đông khô của nó. Dạng bào chế đông khô có thể được tạo ra bằng cách làm đông khô dược phẩm theo sáng chế ở dạng lỏng theo cách thông thường. Việc đông khô có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách tiệt trùng một cách thích hợp dược phẩm theo sáng chế ở dạng lỏng, phân tán các phần vào thiết bị chứa dạng lọ, tiến hành làm đông sơ bộ trong 2 giờ ở các điều kiện khoảng -40 đến -20°C , tiến hành làm khô sơ bộ ở khoảng 0 đến 10°C trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó tiến hành làm khô thứ cấp ở khoảng 15 đến 25°C trong áp suất giảm. Nhìn chung, dạng bào chế đông khô của dược phẩm theo sáng chế có thể thu được bằng cách thay thế hàm lượng trong lọ bằng khí nitơ và đóng nắp lọ.

Dạng bào chế đông khô của dược phẩm theo sáng chế nói chung có thể được sử dụng trên cơ sở hoàn nguyên bằng cách thêm dung dịch thích hợp tùy ý (chất lỏng hoàn nguyên) và hòa tan lại dạng bào chế. Chất lỏng hoàn nguyên như vậy bao gồm nước tiêm được, muối sinh lý và các chất lỏng để truyền khác. Thể tích chất lỏng hoàn nguyên có thể thay đổi phụ thuộc vào ý định sử dụng, v.v., không bị giới hạn một cách cụ thể, và thích hợp là lớn hơn từ $0,5$ đến 2 lần so với thể tích trước khi đông khô hoặc không lớn hơn 500 mL .

Mong muốn là không chế liều dùng dược phẩm theo sáng chế, bằng cách xem xét các yếu tố sau: loại và dạng liều dùng của oligome theo sáng chế bao gồm; các tình trạng của bệnh nhân bao gồm tuổi, thể trọng, v.v.; đường dùng; và các đặc tính và

mức độ của bệnh. Liều dùng hàng ngày được tính toàn là lượng oligome đối nghĩa theo sáng chế thường trong khoảng từ 0,1 mg đến 10 g/người, và tốt hơn là 1 mg đến 1 g/người. Khoảng trị số này đôi khi có thể thay đổi phụ thuộc vào loại bệnh đích, đường dùng và phân tử đích. Do đó, liều dùng nhỏ hơn khoảng này có thể đủ trong một số trường hợp và ngược lại, liều dùng cao hơn khoảng này đôi khi có thể được yêu cầu. Dược phẩm có thể được dùng từ một đến vài lần một ngày hoặc ở các khoảng cách từ một ngày đến vài ngày.

Theo phương án khác của dược phẩm theo sáng chế, đề xuất dược phẩm chứa vector có khả năng biểu hiện oligonucleotit theo sáng chế và chất mang được mô tả trên đây. Vector biểu hiện như vậy có thể là vector có khả năng biểu hiện nhiều oligonucleotit theo sáng chế. Dược phẩm có thể được bào chế với các chất phụ gia được dùng khi trong trường hợp dược phẩm theo sáng chế chứa oligome theo sáng chế. Nồng độ của vector biểu hiện chứa trong dược phẩm có thể thay đổi phụ thuộc vào loại chất mang, v.v., và thích hợp là trong khoảng từ 0,1 nM đến 100 μ M, tốt hơn là trong khoảng từ 1 nM đến 10 μ M, và tốt hơn nữa là trong khoảng từ 10 nM đến 1 μ M. Tỷ lệ khối lượng của vector biểu hiện chứa trong dược phẩm và chất mang (chất mang/vector biểu hiện) có thể thay đổi phụ thuộc vào tính chất của vector biểu hiện, loại chất mang, v.v., và thích hợp là trong khoảng từ 0,1 đến 100, tốt hơn là trong khoảng từ 1 đến 50, và tốt hơn nữa là trong khoảng từ 10 đến 20. Hàm lượng chất mang chứa trong dược phẩm là như trong trường hợp dược phẩm theo sáng chế chứa oligome theo sáng chế, và phương pháp để sản xuất là giống như trong trường hợp với dược phẩm theo sáng chế.

Sau đây, sáng chế will be được mô tả chi tiết hơn với sự tham chiếu đến các ví dụ thực hiện và các ví dụ thử nghiệm dưới đây, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ tham chiếu 1

Axit 4-{[(2S, 6R)-6-(4-Benzamido-2-oxopyrimidin-1-yl)-4-tritylmorpholin-2-yl]metoxy}-4-oxobutanoic được tải lên nhựa amino polystyren

Bước 1: Sản xuất axit 4-{[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)- 4-tritylmorpholin-2-yl]metoxy}-4-oxobutanoic

Trong môi trường agon, 3,44 g N-{1-[(2R, 6S)-6-(hydroxymetyl)- 4-tritylmorpholin-2-yl]-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl}benzamide và 1,1 g 4-dimethylaminopyridine (4-DMAP) được tạo huyền phù trong 50 mL diclometan, và 0,90 g anhydrit succinic được thêm vào huyền phù, sau đó khuấy ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Thêm vào hỗn hợp phản ứng 10 mL metanol, và cô đặc hỗn hợp trong áp suất giảm. Phần còn lại được chiết sử dụng etyl axetat và dung dịch nước kali hydrophosphat 0,5 M. Lớp hữu cơ thu được được rửa nối tiếp bằng dung dịch nước kali hydrophosphat 0,5M, nước và nước muối theo thứ tự đã nêu. Lớp hữu cơ thu được được làm khô qua natri sulfat và được cô đặc trong áp suất giảm để tạo thành 4,0 g sản phẩm.

Bước 2: Sản xuất axit 4-{[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopyrimidin-1-yl)-4-tritylmorpholin-2-yl]metoxy}-4-oxobutanoic được tải lên nhựa amino polystyren

Sau khi 4,0 g axit 4-{[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-4-tritylmorpholin-2-yl]metoxy}-4-oxobutanoic được hòa tan trong 200 mL pyridin (đã được tách nước), 0,73 g 4-DMAP và 11,5 g 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbo-diimit hydroclorua được thêm vào dung dịch. Sau đó, 25,0 g chất hỗ trợ Primer nhựa amino polystyren 200 (sản xuất bởi GE Healthcare Japan Co., Ltd., 17-5214-97) và 8,5 mL triethylamin được thêm vào hỗn hợp, sau đó lắc ở nhiệt độ phòng trong 4 ngày. Sau khi hoàn thành phản ứng, nhựa được lấy ra bằng cách lọc. Nhựa thu được được rửa nối tiếp bằng pyridin, metanol và diclometan theo thứ tự đã nêu, và được làm khô

trong áp suất giảm. Thêm vào nhựa thu được 200 mL tetrahydrofuran (dạng tách nước), 15 mL anhydrit axetic và 15 mL 2,6-lutidin, và hỗn hợp được lắc ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Nhựa được lấy ra bằng cách lọc, được rửa nối tiếp bằng pyridine, metanol và diclometan theo thứ tự đã nêu và được làm khô trong áp suất giảm để tạo thành 26,7 g sản phẩm.

Lượng tải của sản phẩm được xác định từ lượng mong của trityl trên g nhựa bằng cách đo độ hấp thụ UV ở 409 nm sử dụng phương pháp đã biết. Lượng tải của nhựa là 192,2 $\mu\text{mol/g}$.

Các điều kiện đo UV

Thiết bị: U-2910 (Hitachi, Ltd.)

Dung môi: axit metansulfonic

Bước sóng: 265 nm

Trị số ϵ : 45000

Ví dụ tham chiếu 2

Axit 4- $\{[(2S, 6R)-6-(5\text{-metyl-2,4-dioxopyrimidin-1-yl})-4\text{-tritylmorpholin-2-yl}]$ metoxy}-4-oxobutanoic được tải lên nhựa polystyren

Hợp chất nêu ở đề mục được sản xuất theo phương pháp tương tự như trong Ví dụ tham khảo 1, ngoại trừ 1- $[(2R,6S)-6-(\text{hydroxymetyl})-4\text{-tritylmorpholin-2-yl}]-5\text{-methylpyrimidin-2,4(1H,3H)-dion}$ được sử dụng trong bước này, thay cho $N\text{-}\{1\text{-}[(2R,6S)-6-(\text{hydroxymetyl})-4\text{-tritylmorpholin-2-yl}]-2\text{-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl}\}$ benzamid được sử dụng trong bước 1 của Ví dụ tham khảo 1.

Lượng tải của sản phẩm được xác định từ lượng mong của trityl trên g nhựa bằng cách đo độ hấp thụ UV ở 409 nm sử dụng phương pháp đã biết. Lượng tải của nhựa là 164,0 $\mu\text{mol/g}$.

Ví dụ tham khảo 3

Axit 4- $\{[(2S, 6R)-6-(6\text{-benzamido purine-9-yl})-4\text{-tritylmorpholin-2-yl}]$ metoxy}-4-

oxobutanoic được tải lên nhựa amino polystyren

Hợp chất nêu ở đề mục được sản xuất theo cách tương tự như trong Ví dụ tham khảo 1, ngoại trừ việc N-{9-[(2R,6S)-6-(hydroxymethyl)-4-tritylmorpholin-2-yl] purine-6-yl} benzamido được sử dụng trong bước này, thay cho N-{1-[(2R,6S)-6-(hydroxymethyl)-4-tritylmorpholin-2-yl]-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl}benzamid được sử dụng trong bước 1 của Ví dụ tham khảo 1.

Lượng tải của sản phẩm được xác định từ lượng mong của trityl trên g nhựa bằng cách đo độ hấp thụ UV ở 409 nm sử dụng phương pháp đã biết. Lượng tải của nhựa là 185,7 $\mu\text{mol/g}$.

Ví dụ tham khảo 4

Axit 4-{{{(2S, 6R)-6-{6-2-xyanoetoxy}-2-[(2-phenoxyaxetyl) amino] purin-9-yl}-4-tritylmorpholin-2-yl}metoxy}-4-oxobutanoic được tải lên nhựa amino polystyren

Hợp chất nêu ở đề mục được sản xuất theo cách tương tự như trong Ví dụ tham khảo 1, ngoại trừ việc N-{6-(2-xyanoetoxy)-9-[(2R,6S)-6-(hydroxymethyl)-4-tritylmorpholin-2-yl] purin-2-yl} -2-phenoxyaxetoamido được sử dụng trong bước này, thay cho N-{1-[(2R,6S)-6-(hydroxymethyl)-4-tritylmorpholin-2-yl]-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl} benzamid được sử dụng trong bước 1 của Ví dụ tham khảo 1.

Lượng tải của sản phẩm được xác định từ lượng mong của trityl trên g nhựa bằng cách đo độ hấp thụ UV ở 409 nm sử dụng phương pháp đã biết. Lượng tải của nhựa là 164,8 $\mu\text{mol/g}$.

Theo mô tả trong Ví dụ 1 dưới đây, PMO thể hiện bởi PMO số 1-118 trong bảng 1 được tổng hợp. PMO số 119 và 120 được mua của Gene Tools, LLC. PMO được tổng hợp được hòa tan trong nước để tiêm (sản xuất bởi Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.).

Bảng 1-1

Bảng 1

PMO No.	Trình tự đích nằm trên exon 44	Chú ý	SEQ ID NO:
1	11-23 & 91-103	Đầu 5': nhóm (3)	11
2	11-23 & 61-73	Đầu 5': nhóm (3)	12
3	11-23 & 71-83	Đầu 5': nhóm (3)	13
4	21-33 & 91-103	Đầu 5': nhóm (3)	14
5	21-33 & 81-93	Đầu 5': nhóm (3)	15
6	21-33 & 101-113	Đầu 5': nhóm (3)	16
7	21-33 & 61-73	Đầu 5': nhóm (3)	17
8	21-33 & 71-83	Đầu 5': nhóm (3)	18
9	21-35 & 101-115	Đầu 5': nhóm (3)	19
10	11-25 & 91-105	Đầu 5': nhóm (3)	20
11	16-25 & 101-115	Đầu 5': nhóm (3)	21
12	21-35 & 91-105	Đầu 5': nhóm (3)	22
13	11-23 & 101-113	Đầu 5': nhóm (3)	23
14	23-35 & 91-103	Đầu 5': nhóm (3)	24
15	19-31 & 91-103	Đầu 5': nhóm (3)	;
16	21-33 & 89-101	Đầu 5': nhóm (3)	26
17	11-23 & 81-93	Đầu 5': nhóm (3)	27
18	19-31 & 93-105	Đầu 5': nhóm (3)	28
19	23-35 & 89-101	Đầu 5': nhóm (3)	29
20	23-35 & 93-105	Đầu 5': nhóm (3)	30
21	22-33 & 92-103	Đầu 5': nhóm (3)	31
22	91-103 & 21-33	Đầu 5': nhóm (3)	32

23	22-32 & 92-102	Đầu 5': nhóm (3)	33
24	22-31 & 93-102	Đầu 5': nhóm (3)	34
25	19-31 & 59-71	Đầu 5': nhóm (3)	35
26	21-33 & 93-105	Đầu 5': nhóm (3)	36
27	21-33 & 63-75	Đầu 5': nhóm (3)	37
28	19-31 & 61-73	Đầu 5': nhóm (3)	38
29	19-31 & 63-75	Đầu 5': nhóm (3)	39
30	21-33 & 59-71	Đầu 5': nhóm (3)	40
31	23-35 & 61-73	Đầu 5': nhóm (3)	41
32	23-35 & 63-75	Đầu 5': nhóm (3)	42
33	23-35 & 59-71	Đầu 5': nhóm (3)	43
34	19-31 & 89-101	Đầu 5': nhóm (3)	6
35	61-73 & 91-103	Đầu 5': nhóm (3)	44
36	61-73 & 72-84	Đầu 5': nhóm (3)	45
37	24-33 & 62-71	Đầu 5': nhóm (3)	46
38	24-33 & 65-74	Đầu 5': nhóm (3)	47
39	61-70 & 75-84	Đầu 5': nhóm (3)	48
40	22-31 & 65-74	Đầu 5': nhóm (3)	49
41	17-29 & 91-103	Đầu 5': nhóm (3)	50
42	33-44 & 62-74	Đầu 5': nhóm (3)	51
43	26-37 & 65-76	Đầu 5': nhóm (3)	52
44	23-33 & 61-71	Đầu 5': nhóm (3)	53
45	23-33 & 65-75	Đầu 5': nhóm (3)	7
46	22-32 & 64-74	Đầu 5': nhóm (3)	54
47	59-68 & 77-86	Đầu 5': nhóm (3)	55
48	58-70 & 75-87	Đầu 5': nhóm (3)	56

49	22-33 & 63-74	Đầu 5': nhóm (3)	8
50	61-73 & 81-93	Đầu 5': nhóm (3)	57
51	93-103 & 25-35	Đầu 5': nhóm (3)	58
52	17-29 ATT 91-102	Đầu 5': nhóm (3)	59
53	92-103 & 22-33	Đầu 5': nhóm (3)	60
54	91-103 & 19-31	Đầu 5': nhóm (3)	61
55	61-73 & 19-31	Đầu 5': nhóm (3)	62
56	61-73 & 85-97	Đầu 5': nhóm (3)	63
57	69-81 CTCC 61-68	Đầu 5': nhóm (3)	64
58	93-105 & 23-35	Đầu 5': nhóm (3)	65
59	90-103 & 25-36	Đầu 5': nhóm (3)	66
60	CT-[61-76]-AC	Đầu 5': nhóm (3)	67
61	84-96 & 21-33	Đầu 5': nhóm (3)	68
62	81-93 & 23-35	Đầu 5': nhóm (3)	69
63	CC-[61-80]-CC	Đầu 5': nhóm (3)	70
64	CTT-[61-78]-CCC	Đầu 5': nhóm (3)	71
65	84-93 & 23-33	Đầu 5': nhóm (3)	72
66	89-101 & 19-31	Đầu 5': nhóm (3)	73
67	91-103 & 61-73	Đầu 5': nhóm (3)	74
68	61-71 & 91-105	Đầu 5': nhóm (3)	75
69	20-30 & 89-99	Đầu 5': nhóm (3)	76
70	64-74 & 93-103	Đầu 5': nhóm (3)	77
71	20-31 & 89-100	Đầu 5': nhóm (3)	78
72	1-13 & 76-88	Đầu 5': nhóm (3)	79
73	64-75 & 92-103	Đầu 5': nhóm (3)	9
74	99-108 & 19-34	Đầu 5': nhóm (3)	80

75	58-67 & 76-85	Đầu 5': nhóm (3)	81
76	58-67 & 77-86	Đầu 5': nhóm (3)	82
77	23-33 & 92-102	Đầu 5': nhóm (3)	83
78	20-30 & 90-100	Đầu 5': nhóm (3)	84
79	93-104 & 22-33	Đầu 5': nhóm (3)	85
80	93-103 & 23-33	Đầu 5': nhóm (3)	86
81	64-73 & 76-85	Đầu 5': nhóm (3)	87
82	64-74 & 86-95	Đầu 5': nhóm (3)	88
83	58-66 & 77-85	Đầu 5': nhóm (3)	89
84	64-73 & 84-93	Đầu 5': nhóm (3)	90
85	21-31 & 90-100	Đầu 5': nhóm (3)	91
86	20-30 & 87-97	Đầu 5': nhóm (3)	92
87	27-36 & 89-97	Đầu 5': nhóm (3)	93
88	20-29 ATT 91-100	Đầu 5': nhóm (3)	94
89	20-29 ATT 91-97	Đầu 5': nhóm (3)	95
90	20-29 & 88-97	Đầu 5': nhóm (3)	96
91	22-31 & 63-74	Đầu 5': nhóm (3)	97
92	64-76 & 96-102 +C	Đầu 5': nhóm (3)	98
93	58-68 & 77-85 +C	Đầu 5': nhóm (3)	99
94	22-36 & 89-97	Đầu 5': nhóm (3)	100
95	19-31 & 89-100	Đầu 5': nhóm (3)	101
96	22-31 & 87-97	Đầu 5': nhóm (3)	102
97	-1-11 & 62-73	Đầu 5': nhóm (3)	103
98	-1-11 & 89-100	Đầu 5': nhóm (3)	104
99	-1-11 & 20-31	Đầu 5': nhóm (3)	105
100	20-31 & 89-101	Đầu 5': nhóm (3)	106

101	19-31 & 90-101	Đầu 5': nhóm (3)	107
102	20-31 & 90-101	Đầu 5': nhóm (3)	108
103	-1-13 & 76-82	Đầu 5': nhóm (3)	109
104	-1-10 & 63-73	Đầu 5': nhóm (3)	110
105	-1-10 & 90-100	Đầu 5': nhóm (3)	111
106	-1-10 & 20-30	Đầu 5': nhóm (3)	112
107	20-31 & 91-101	Đầu 5': nhóm (3)	113
108	19-31 & 89-101	Đầu 5': nhóm (3) Đầu 3': axetyl hóa	6
109	20-31	Đầu 5': nhóm (3)	114
110	65-75	Đầu 5': nhóm (3)	115
111	23-33	Đầu 5': nhóm (3)	116
112	92-103	Đầu 5': nhóm (3)	117
113	64-75	Đầu 5': nhóm (3)	118
114	89-101	Đầu 5': nhóm (3)	119
115	19-31	Đầu 5': nhóm (3)	120
116	20-31 & 89-101	Đầu 5': nhóm (3) Đầu 3': axetyl hóa	106
117	63-74	Đầu 5': nhóm (3)	121
118	22-33	Đầu 5': nhóm (3)	122
119	59-68	Đầu 5': nhóm (2)	123
120	77-86	Đầu 5': nhóm (2)	124

Ví dụ 1

Là bazơ ở đầu 5', axit 0,2 g 4-{[(2S, 6R)-6-(4-benzamide-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-4-tritylmorpholin-2-yl]metoxy} 4-oxobutanoic được tải lên nhựa

aminopolystyren (Ví dụ tham khảo 1), axit 4- $\{[(2S, 6R)-6-(5\text{-metyl-2,4-dioxypyrimidine-1-yl)-4-tritylmorpholin-2-yl] \text{ metoxy}\}-4\text{-oxobutanoic}$ được tải lên nhựa aminopolystyren (Ví dụ tham khảo 2), axit 4- $\{[(2S, 6R)-6-(6\text{-benzamido purin-9-yl)-4-tritylmorpholin-2-yl] \text{ metoxy}\}-4\text{-oxobutanoic}$ được tải lên nhựa aminopolystyren (Ví dụ tham khảo 3), hoặc axit 4- $\{[(2S, 6R)-6-(6-(2\text{-xyanoetoxy})-2-[(2\text{-phenoxyaxetyl) amino] purin-9-yl})-4-tritylmorpholin-2-yl] \text{ metoxy}\}-4\text{-oxobutanoic}$ được tải lên nhựa aminopolystyren (Ví dụ tham khảo 4), được nạp vào cột có bộ lọc. Sau đó, chu trình tổng hợp được thể hiện dưới đây được bắt đầu sử dụng máy tổng hợp oligonucleotit (AKTA Oligopilot 10 plus). Hợp chất monome morpholino mong muốn được thêm vào trong mỗi chu trình bắt cặp để tạo thành trình tự bazơ được mô tả trong bảng 1 (xem bảng 2 dưới đây).

Dung dịch khử bảo vệ là dung dịch diclometan chứa 3% (khối lượng/thể tích) axit trifloaxetic. Dung dịch trung hòa và rửa được sử dụng là dung dịch thu được bằng cách hòa tan N,N-diisopropyletylamin thành 10% (thể tích/thể tích) và tetrahydrofuran thành 5% (thể tích/thể tích) trong diclometan chứa 35% (thể tích/thể tích) axetonitril. Dung dịch bắt cặp A được sử dụng là dung dịch thu được bằng cách hòa tan hợp chất monome morpholino trong tetrahydrofuran thành 0,10 M. Dung dịch bắt cặp B được sử dụng là dung dịch thu được bằng cách hòa tan N,N-diisopropyletylamin thành 20% (thể tích/thể tích) và tetrahydrofuran thành 10% (thể tích/thể tích) trong axetonitril. Dung dịch khai mào được sử dụng là dung dịch thu được bằng cách hòa tan 20% (thể tích/thể tích) axetic anhydrit và 30% (thể tích/thể tích) 2,6-lutidin trong axetonitril.

Nhựa aminopolystyren được tải với PMO được tổng hợp trên đây được thu hồi từ bình phản ứng và được làm khô ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 2 giờ trong áp suất giảm. PMO được làm khô được tải lên nhựa aminopolystyren resin được nạp vào trong bình phản ứng, và 5 mL nước amoniac 28% -etanol (1/4) được thêm vào. Hỗn

hợp được khuấy ở 55°C trong 15 giờ. Nhựa aminopolystyren được tách bằng cách lọc và được rửa bằng 1 mL nước-etanol (1/4). Dịch lọc thu được được cô đặc trong áp suất giảm. Phần cặn thu được được hòa tan trong 10 mL hỗn hợp dung môi của axit axetic 20 mM – đệm triethylamin (đệm TEAA) và axetonitril (4/1) và được lọc qua màng lọc. Dịch lọc thu được được tinh sạch bằng HPLC pha đảo. Các điều kiện sử dụng là như được thể hiện trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Cột	XBridge 5 μ m C18 (Waters, ϕ 19×50 mm, 1 CV=14 mL)
Tốc độ dòng	10 mL/phút
Nhiệt độ cột	Nhiệt độ phòng
Dung dịch A	Đệm TEAA 20mM
Dung dịch B	CH ₃ CN
Gradient	(B) đậm đặc 10→70% /15 CV

CV: thể tích cột

Mỗi phân đoạn được phân tích, và sản phẩm đích được thu hồi và được cô đặc trong áp suất giảm. Thêm vào phần cô đặc còn lại 0,5 mL dung dịch nước axit phosphoric 2M, và hỗn hợp được khuấy trong 15 phút. Ngoài ra, 2 mL dung dịch nước natri hydroxit 2 M được thêm vào để chuyển hỗn hợp thành môi trường kiềm, tiếp theo là lọc qua màng lọc (0,45 μ m).

Dung dịch nước thu được chứa sản phẩm đích được tinh sạch bằng cột nhựa trao đổi anion. Các điều kiện được sử dụng là như được thể hiện trong bảng 4 dưới đây.

Mỗi phân đoạn được phân tích (trên HPLC) và sản phẩm đích thu được ở dạng dung dịch nước. Thêm vào dung dịch nước thu được đệm phosphat 0,1 M (pH 6,0) để trung hòa. Tiếp theo, hỗn hợp thu được được khử muối bằng HPLC pha đảo trong các điều kiện được mô tả trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Cột	XBridge 5 μ m C8 (Waters, ϕ 10 $\times$ 50 mm, 1 CV=4 mL)
Tốc độ dòng	4 mL/phút
Nhiệt độ cột	60°C
Dung dịch A	nước
Dung dịch B	CH ₃ CN
Gradient	(B) đậm đặc 0 $\rightarrow$ 50% / 20CV

Sản phẩm đích được thu hồi và hỗn hợp được cô đặc trong áp suất giảm. Phần còn lại thu được được hòa tan trong nước. Dung dịch nước thu được được đông khô để tạo thành hợp chất đích là chất rắn như bông màu trắng.

Các giá trị tính toán và giá trị phát hiện được của ESI-TOF-MS được thể hiện trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6-1

Bảng 6

PMO số.	Trình tự đích trong exon 44	Tính toán	Phát hiện
1	H44_11-23_91-103	8539,94	8539,52
2	H44_11-23_61-73	8551,97	8552,69
3	H44_11-23_71-83	8533,95	8535,46
4	H44_21-33_91-103	8507,92	8507,71
5	H44_21-33_81-93	8543,96	8543,98
6	H44_21-33_101-113	8534,95	8535,75
7	H44_21-33_61-73	8519,95	8520,14
8	H44_21-33_71-83	8501,93	8501,81
9	H44_21-35_101-115	9882,42	9882,06
10	H44_11-25_91-105	9869,39	9870,94

11	H44_16-25_101-115	8226,85	8227,78
12	H44_21-35_91-105	9855,39	9855,53
13	H44_11-23_101-113	8566,97	8566,58
14	H44_23-35_91-103	8540,94	8541,52
15	H44_19-31_91-103	8491,92	8491,90
16	H44_21-33_89-101	8541,94	8541,87
17	H44_11-23_81-93	8575,98	8576,67
18	H44_19-31_93-105	8475,92	8476,50
19	H44_23-35_89-101	8574,96	8574,70
20	H44_23-35_93-105	8524,94	8524,71
21	H44_22-33_92-103	7822,69	7823,21
22	H44_91-103_21-33	8507,92	8508,59
23	H44_22-32_92-102	7177,47	7177,58
24	H44_22-31_93-102	6492,24	6492,03
25	H44_19-31_59-71	8478,94	8478,90
26	H44_21-33_93-105	8491,92	8492,33
27	H44_21-33_63-75	8470,93	8471,00
28	H44_19-31_61-73	8503,95	8503,87
29	H44_19-31_63-75	8454,93	8454,94
30	H44_21-33_59-71	8494,94	8494,90
31	H44_23-35_61-73	8552,97	8552,40
32	H44_23-35_63-75	8503,95	8504,17
33	H44_23-35_59-71	8527,96	8527,97
34	H44_19-31_89-101	8525,94	8525,93
35	H44_61-73_91-103	8595,95	8595,95
36	H44_61-73_72-84	8589,96	8590,03

37	H44_24-33_62-71	6520,27	6519,69
38	H44_24-33_65-74	6520,27	6520,36
39	H44_61-70_75-84	6574,28	6573,63
40	H44_22-31_65-74	6495,26	6495,21
41	H44_17-29_91-103	8515,93	8515,62
42	H44_33-44_62-74	8254,88	8254,88
43	H44_26-37_65-76	7876,75	7876,96
44	H44_23-33_61-71	7189,50	7189,75
45	H44_23-33_65-75	7180,49	7180,75
46	H44_22-32_64-74	7165,49	7165,64
47	H44_59-68_77-86	6559,28	6559,32
48	H44_58-70_75-87	8566,97	8567,64
49	H44_22-33_63-74	7810,71	7810,77
50	H44_61-73_81-93	8631,99	8632,04
51	H44_93-103_25-35	7195,49	7195,55
52	H44_17-29_ATT_91-102	9185,16	9186,41
53	H44_92-103_22-33	7822,69	7822,17
54	H44_91-103_19-31	8491,92	8491,77
55	H44_61-73_19-31	8503,95	8503,41
56	H44_61-73_85-97	8591,98	8591,55
57	H44_69-81_CTCC_61-68	8164,83	8165,78
58	H44_93-105_23-35	8524,94	8525,05
59	H44_90-103_25-36	8558,96	8558,71
60	CT-[H44_61-76]-AC	6534,27	6534,04
61	H44_84-96_21-33	8518,95	8518,86
62	H44_81-93_23-35	8576,98	8577,13

63	CC-[H44_61-80]-CC	7819,72	7818,92
64	CTT-[H44_61-78]-CCC	7825,71	7825,02
65	H44_84-93_23-33	6883,40	6882,97
66	H44_89-101_19-31	8525,94	8526,46
67	H44_91-103_61-73	8595,95	8595,17
68	H44_61-71_91-105	8579,95	8579,71
69	H44_20-30_89-99	7186,48	7186,30
70	H44_64-74_93-103	7201,48	7202,00
71	H44_20-31_89-100	7831,70	7831,77
72	H44_1-13_76-88	8551,97	8552,42
73	H44_64-75_92-103	7861,70	7861,72
74	H44_99-108_19-34	8583,97	8583,87
75	H44_58-67_76-85	6534,27	6533,87
76	H44_58-67_77-86	6543,28	6542,70
77	H44_23-33_92-102	7177,47	7176,76
78	H44_20-30_90-100	7161,47	7161,32
79	H44_93-104_22-33	7822,69	7823,23
80	H44_93-103_23-33	7177,47	7177,09
81	H44_64-73_76-85	6550,27	6549,41
82	H44_64-74_86-95	6922,41	6921,39
83	H44_58-66_77-85	5889,05	5888,11
84	H44_64-73_84-93	6592,30	6591,14
85	H44_21-31_90-100	7161,47	7160,62
86	H44_20-30_87-97	7179,49	7178,65
87	H44_27-36_89-97	6214,17	6213,81
88	H44_20-29_ATT_91-100	7506,58	7505,79

89	H44_20-29_ATT_91-97	6491,24	6490,34
90	H44_20-29_88-97	6525,26	6523,73
91	H44_22-31_63-74	7140,48	7139,34
92	H44_64-76_96-102+C	6871,37	6869,58
93	H44_58-68_77-85+C	6874,39	6872,78
94	H44_22-36_89-97	7858,73	7859,53
95	H44_19-31_89-100	8170,82	8171,89
96	H44_22-31_87-97	6849,38	6849,17
97	H44_-1-11_62-73	7898,74	7899,01
98	H44_-1-11_89-100	7904,73	7904,14
99	H44_-1-11_20-31	7794,71	7794,30
100	H44_20-31_89-101	8186,82	8186,63
101	H44_19-31_90-101	8170,82	8170,92
102	H44_20-31_90-101	7831,70	7831,48
103	H44_-1-13_76-82	6849,38	6848,35
104	H44_-1-10_63-73	7213,51	7211,46
105	H44_-1-10_90-100	7219,50	7218,65
106	H44_-1-10_20-30	7149,49	7151,40
107	H44_20-31_91-101	7492,58	7493,67
108	H44_19-31_89-101(N-Ac)	8567,95	8568,51
109	H44_20-31	3816,34	3816,82
110	H44_65-75	3565,25	3565,61
111	H44_23-33	3526,24	3526,57
112	H44_92-103	3892,34	3892,71
113	H44_64-75	3880,36	3880,72
114	H44_89-101	4281,48	4282,08

115	H44_19-31	4155,46	4156,03
116	H44_20-31_89-101(N-Ac)	8228,83	8229,03
117	H44_63-74	3880,36	3880,21
118	H44_22-33	3841,35	3841,30

Ví dụ thử nghiệm 1

Thử nghiệm in vitro

Sử dụng kit Amaxa Cell Line Nucleofector L trên Nucleofector II (Lonza), 0,1 đến 30 μM của các oligome đối nghĩa trong bảng 1 được chuyển nhiễm với $3,5 \times 10^5$ của các tế bào RD (dòng tế bào sacom cơ vân của người). Chương trình T-030 được sử dụng.

Sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được nuôi cấy trong ba đêm trong 2 mL môi trường thiết yếu tối thiểu của Eagle (Eagle's Minimal Essential Medium - EMEM) (sản xuất bởi Sigma, sau đây gọi là như vậy) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (fetal calf serum -FCS) (sản xuất bởi Invitrogen) trong điều kiện 37°C và CO₂ 5%.

Các tế bào được rửa một lần với PBS (sản xuất bởi Nissui, sau đây gọi là như vậy) và 350 μL đệm RLT (sản xuất bởi Qiagen) chứa 1% 2-mercaptoethanol (sản xuất bởi Nacalai Tesque) được thêm vào các tế bào. Sau khi các tế bào được để ở nhiệt độ phòng trong vài phút để dung giải các tế bào, sản phẩm dung giải được thu vào thiết bị làm đồng nhất QIAshredder (sản xuất bởi Qiagen). Sau đó dịch dung giải được ly tâm ở 15,000 vòng/phút trong 2 phút để tạo thành dịch đồng nhất. ARN tổng được chiết theo phương pháp kèm với kit RNeasy Mini (sản xuất bởi Qiagen). Nồng độ RNA tổng được chiết được xác định sử dụng NanoDrop ND-1000 (sản xuất bởi LMS).

PCR theo thời gian thực một bước được thực hiện với 400 ng RNA tổng đã chiết sử dụng kit PCT thời gian thực QIAGEN OneStep (sản xuất bởi Qiagen). Dung

dịch phản ứng được chuẩn bị theo phương pháp đi kèm với kit. PTC-100 (sản xuất bởi MJ Research) hoặc TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (sản xuất bởi Takara Bio) được sử dụng làm thiết bị chu trình nhiệt. Chương trình PCR thời gian thực sử dụng là như sau.

50°C, 30 phút: phản ứng phiên mã ngược

95°C, 15 phút: hoạt hóa polymeraza, bất hoạt transcriptaza đảo, biến tính nhiệt của cADN

[94°C, 30 giây; 60°C, 30 giây; 72 °C, 1 phút] x 35 chu trình: Khuếch đại PCR

72°C, 10 phút: kéo dài lần cuối

Các trình tự bazơ của mỗi xuôi và mỗi ngược sử dụng cho PCT thời gian thực được đưa ra dưới đây.

Mỗi xuôi : 5'- GCTCAGGTCGGATTGACATT -3' (SEQ ID NO: 125)

Mỗi ngược : 5'- GGGCAACTCTTCCACCAGTA -3' (SEQ ID NO: 126)

Sản phẩm phản ứng, 1 µL của PCR trên đây được phân tích sử dụng thiết bị Bioanalyzer (sản xuất bởi Agilent Technologies, Inc.).

Polynucleotit mức “A” của sợi có sự bỏ qua exon 44 và polynucleotit mức “B” của sợi không có sự bỏ qua exon 44 được đo. Dựa trên các giá trị đo “A” và “B” này, hiệu quả bỏ qua được xác định bằng phương trình dưới đây:

$$\text{Hiệu quả bỏ qua (\%)} = A / (A + B) \times 100$$

Các kết quả thử nghiệm

Kết quả được thể hiện trên các FIG. từ Fig. 1 đến Fig. 26. Thử nghiệm này cho thấy rằng, oligome theo sáng chế thu được bằng cách liên kết các oligome đơn vị ngắn được chọn từ bazơ thứ nhất đến 44 (SEQ ID NO: 1) và bazơ thứ 58 đến 115 (SEQ ID NO: 2), một cách tương ứng, từ đầu 5' của trình tự nucleotit của exon 44 (SEQ ID NO: 10) trong gen dystrophin kiểu dại của người gây ra sự bỏ qua exon 44 một cách hiệu quả.

Ví dụ thử nghiệm 2

Thử nghiệm in vitro

Các thử nghiệm được thực hiện như Ví dụ thử nghiệm 1 ngoại trừ việc $3,5 \times 10^5$ tế bào RD (dòng tế bào sáo cơ vân người) được chuyển nhiễm với các oligome theo sáng chế của PMO số 34, 100, 45, 73, 49 và 47 ở dạng đơn hoặc ở dạng trong đó hai oligome đơn vị cấu thành mỗi oligome được bao gồm ở dạng đơn hoặc trong hỗn hợp, ở nồng độ 1, 3 hoặc 10 μM , sử dụng kit Amaxa Cell Line Nucleofector L trên Nucleofector II (Lonza). Chương trình T-030 được sử dụng. Các tổ hợp của các trình tự để chuyển nhiễm là như sau.

Bảng 7

Tổ hợp các trình tự được chuyển nhiễm

	Tổ hợp các trình tự	Nồng độ của oligome được chuyển nhiễm (μM)
1	PMO No.34	1 μM
2	PMO No.115 hoặc PMO No.114 hoặc hỗn hợp	1 μM mỗi loại
3	PMO No.100	1 μM
4	PMO No.109 hoặc PMO No.114 hoặc hỗn hợp	1 μM mỗi loại
;	PMO No.45	1 μM
6	PMO No.111 hoặc PMO No.110 hoặc hỗn hợp	1 μM mỗi loại
7	PMO No.73	1 μM
8	PMO No.113 hoặc PMO No.112 hoặc hỗn hợp	1 μM mỗi loại
9	PMO No.49	1 μM
;	PMO No.117 hoặc PMO No.118 hoặc hỗn hợp	1 μM mỗi loại
11	PMO No.47	3 hoặc 10 μM
12	PMO No.119 hoặc PMO No.120 hoặc hỗn hợp	3 hoặc 10 μM mỗi loại

Các kết quả thử nghiệm

Kết quả được thể hiện trên các FIG. 27 đến 31. Thử nghiệm này cho thấy rằng, mỗi trong số các PMO số 110 đến 115, PMO số 117 và PMO số 118 hướng đích vị trí trên exon 44 không thể gây ra sự bỏ qua exon 44 bởi bản thân nó. Thử nghiệm này cũng tiết lộ rằng, như so sánh với các hỗn hợp của hai axit nucleic đối nghĩa hướng đích các vị trí khác nhau trên exon 44 (hỗn hợp của PMO No. 114 và PMO No. 115; hỗn hợp của PMO No. 109 và PMO No. 114; hỗn hợp của PMO No. 110 và PMO No. 111; hỗn hợp của PMO No. 112 và PMO No. 113; hỗn hợp của PMO No. 117 và PMO No. 118; và hỗn hợp của PMO No. 119 và PMO No. 120), các oligome theo sáng chế của PMO No. 34, PMO No. 100, PMO No. 45, PMO No. 73, PMO No. 49 và PMO No. 47, trong đó mỗi oligome đơn vị tương ứng được liên kết với nhau, gây ra sự bỏ qua exon 44 với hiệu quả cao.

Ví dụ thử nghiệm 3

Thử nghiệm in vitro sử dụng nguyên bào sợi người

Hoạt tính bỏ qua exon 44 được xác định bằng cách sử dụng các tế bào GM05112 (các nguyên bào sợi thu được từ bệnh nhân mắc DMD là người với sự xóa exon 45, Coriell Institute for Medical Research). Là môi trường sinh trưởng, môi trường Eagle được biến đổi của Dulbecco được sử dụng: Hỗn hợp dinh dưỡng F-12 (DMEM/F-12) (Life Technologies) chứa 10% FCS (HyClone Laboratories, Inc.) và 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) (Sigma-Aldrich, Inc.) và tế bào được nuôi cấy trong điều kiện 37°C và 5% CO₂.

Các tế bào được nuôi cấy trong bình T225 và 2,5 mL retrovirus (ZsGreen1 coexpression) biểu hiện myoD thu được từ người (SEQ ID NO: 127) và nồng độ cuối là 8 µg/mL của polybren (Sigma-Aldrich, Inc.) được thêm vào 30 mL môi trường sinh trưởng. Sau khi ủ ở 32°C trong 2 ngày, môi trường được đổi thành môi trường sinh trưởng mới và việc ủ được tiếp tục ở 37°C trong 3 ngày. Các nguyên bào sợi được

biến nạp MyoD dương tính ZsGreen1 được thu bởi thiết bị BD FACS Aria Cell Sorter (BD Bioscience). Các tế bào thu được được tạo huyền phù trong môi trường biệt hóa (DMEM/F-12 chứa 2% huyết thanh ngựa (Life Technologies), 1% P/S và ITS Liquid Media Supplement (Sigma-Aldrich, Inc.)) và cấy vào đĩa ở mật độ $9,4 \times 10^4$ tế bào/giếng vào đĩa 24 giếng được phủ collagen. Môi trường được thay cứ mỗi 2 đến 3 ngày và việc ủ được tiếp tục để biệt hóa vào các ống myotube.

Vào ngày thứ 7 sau khi cấy vào đĩa 24 giếng, môi trường được thay thế bằng môi trường biệt hóa, và 10 μ M của các oligome PMO No. 34, 45, 49 và 73 được thêm vào đó ở nồng độ cuối. Sau khi các tế bào được ủ trong 2, môi trường được thay bằng môi trường biệt hóa không có PMO, và các tế bào được ủ thêm 5 ngày nữa. Sau đó các tế bào được thu lại để tách ARN tổng sử dụng kit RNeasy Mini (QIAGEN). PCR thời gian thực được thực hiện với 50 ng ARN tổng tách được sử dụng kit QIAGEN OneStep RT-PCR. Dung dịch phản ứng được chuẩn bị theo phương pháp đi kèm với kit. iCycler (sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories) được sử dụng làm thiết bị chu trình nhiệt. Chương trình PCR thời gian thực sử dụng là như sau.

50°C, 30 phút: phản ứng phiên mã ngược

95°C, 15 phút: hoạt hóa polymeraza, bất hoạt transcriptaza đảo, biến tính nhiệt của cADN

[94°C, 1 phút; 60°C, 1 phút; 72 °C, 1 phút] x 35 chu trình: Khuếch đại PCR

72°C, 7 phút: kéo dài lần cuối

Các trình tự bazơ của mỗi xuôi và mỗi ngược sử dụng cho PCT thời gian thực được đưa ra dưới đây.

Mỗi xuôi : 5'- GCTCAGGTCGGATTGACATT -3' (SEQ ID NO: 125)

Mỗi ngược : 5'- GGGCAACTCTTCCACCAGTA -3' (SEQ ID NO: 126)

1 μ L sản phẩm PCR được phân tích bởi Experion ADN 1K Analysis Kits (Bio-Rad Laboratories) sử dụng Experion Electrophoresis Station (Bio-Rad

Laboratories). Thử nghiệm ADN 1K được lựa chọn trên Experion Software phiên bản 3.2 (Bio-Rad Laboratories) và được đo. Mức (A) của chuỗi xung quanh 317 bp và mức (B) của chuỗi xung quanh 465 bp được xác định (đơn vị: nmol/L). Hiệu quả bỏ qua (%) được xác định bằng phương trình sau đây sử dụng Excel 2007 SP3 (Microsoft).

$$\text{Hiệu quả bỏ qua (\%)} = A/(A + B) \times 100$$

Các kết quả thử nghiệm

Các kết quả được thể hiện trên FIG. 32. Thử nghiệm này cho thấy rằng, các oligome đối nghĩa theo sáng chế của PMO Nos.34, 45, 49 và 73, có thể gây ra sự bỏ qua exon 44 với hiệu quả cao ở các tế bào từ bệnh nhân mắc DMD với sự xóa exon 45.

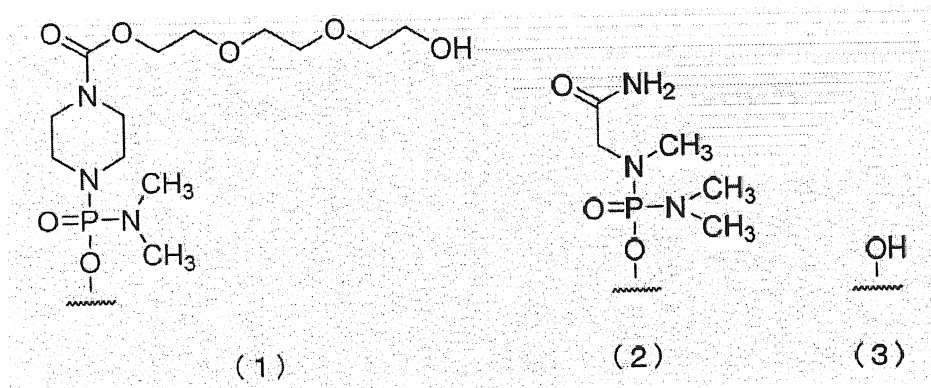
Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Các kết quả thử nghiệm trong các ví dụ thử nghiệm chứng minh rằng các oligome theo sáng chế trong đó các oligome ngắn được liên kết gây ra sự bỏ qua exon 44 trong các tế bào RD. Do đó, các oligome theo sáng chế là cực kỳ hữu dụng để điều trị DMD.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Oligome đối nghĩa bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO từ 6 đến 9, 55 và 106, và bao gồm sự bỏ qua exon 44 trong gen dystrophin ở người, hoặc muối hoặc hydrat được dụng của nó.
2. Oligome đối nghĩa theo điểm 1, trong đó oligome đối nghĩa này là oligonucleotit, hoặc muối hoặc hydrat được dụng của nó.
3. Oligome đối nghĩa theo điểm 2, trong đó gốc đường và/hoặc vùng liên kết với phosphat của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit được cải biến, hoặc muối hoặc hydrat được dụng của nó.
4. Oligome đối nghĩa theo điểm 2 hoặc 3, trong đó gốc đường của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit là riboza trong đó nhóm 2'-OH được thay thế bằng nhóm bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm trong số các nhóm bao gồm OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br và I (trong đó R là alkyl hoặc aryl và R' là alkylen), hoặc muối hoặc hydrat được dụng của nó.
5. Oligome đối nghĩa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó vùng liên kết với phosphat của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit vùng bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm liên kết phosphorothioat, liên kết phosphorodithioat, liên kết alkylphosphonat, liên kết phosphoramidat và liên kết boranophosphat, hoặc muối hoặc hydrat được dụng của nó.
6. Oligome đối nghĩa theo điểm 1 hoặc 2, trong đó oligome đối nghĩa này là oligome morpholino, hoặc muối hoặc hydrat được dụng của nó.
7. Oligome đối nghĩa theo điểm 6, trong đó oligome đối nghĩa này là oligome phosphorodiamidat morpholino, hoặc muối hoặc hydrat được dụng của nó.
8. Oligome đối nghĩa theo điểm 6 hoặc 7, trong đó đầu 5' có công thức hóa học bất kỳ trong số các công thức hóa học từ (1) đến (3) dưới đây, hoặc muối hoặc hydrat được

dụng của nó:



9. Dược phẩm để điều trị chứng loạn dưỡng cơ, chứa oligome đối nghĩa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, hoặc muối hoặc hydrat dược dụng của nó làm hoạt chất.

10. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó dược phẩm này còn chứa chất mang dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> NIPPON SHINYAKU CO., LTD.
NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY
- <120> OLIGOME ĐỐI NGHĨA VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA OLIGOME NÀY
- <130> G1076WO
- <150> JP 2014-124157
<151> 2014-06-17
- <160> 128
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 45
<212> ADN
<213> Nhân tạo
- <220>
<223> Axit nucleic tổng hợp
- <400> 1
ggcgatttga cagatctgtt gagaaatggc ggcgttttca ttatg
45
- <210> 2
<211> 58
<212> ADN
<213> Nhân tạo
- <220>
<223> Axit nucleic tổng hợp
- <400> 2
taatcagtgg ctaacagaag ctgaacagtt tctcagaaag acacaaattc ctgagaat
58
- <210> 3
<211> 17
<212> ADN
<213> Nhân tạo
- <220>
<223> Axit nucleic tổng hợp
- <400> 3
ttgagaaatg gcggcgt
17

<210> 4
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 4
 tcagtggcta acagaag
 17

<210> 5
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 5
 totcagaaag acacaaa
 17

<210> 6
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 6
 gtgtctttct gagccgccat ttctca
 26

<210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 7
 tctgttagcc acgccgccat tt
 22

<210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 8
 ctgttagcca ctcgccgcca tttc
 24

<210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 9
 ttgtgtcttt cttctgttag ccac
 24

<210> 10
 <211> 148
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<400> 10
 gcgatttgac agatctgttg agaaatggcg gcgttttcat tatgatataa agatatttaa
 60

tcagtggcta acagaagctg aacagtttct cagaaagaca caaatcctg agaattggga
 120

acatgctaaa tacaaatggt atcttaag
 148

<210> 11
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 11

ttgtgtcttt ctgtctcaac agatct
26

<210> 12
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 12
tgtagccac tgatctcaac agatct
26

<210> 13
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 13
gttcagcttc tggtctcaac agatct
26

<210> 14
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 14
ttgtgtcttt ctgcgcgcgc atttct
26

<210> 15
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 15

ctgagaaact gttcgccgcc atttct
26

<210> 16
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 16
tctcaggaat ttgcgccgcc atttct
26

<210> 17
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 17
tgttagccac tgacgccgcc atttct
26

<210> 18
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 18
gttcagcttc tgcgccgcc atttct
26

<210> 19
<211> 30
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 19

attctcagga atttgaacgc cgccatttct
30

<210> 20
<211> 30
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 20
atttgtgtct ttctgtttct caacagatct
30

<210> 21
<211> 25
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 21
attctcagga atttgtttct caaca
25

<210> 22
<211> 30
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 22
atttgtgtct ttctgaacgc cgccatttct
30

<210> 23
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 23

tctcaggaat ttgtctcaac agatct
26

<210> 24
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 24
ttgtgtcttt ctgaacgccg ccattt
26

<210> 25
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 25
ttgtgtcttt ctgccgccat ttctca
26

<210> 26
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 26
gtgtctttct gagcgccgcc atttct
26

<210> 27
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 27

ctgagaaact gtttctcaac agatct
26

<210> 28
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 28
atttgtgtct ttcccgccat ttctca
26

<210> 29
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 29
gtgtctttct gagaacgccg ccattt
26

<210> 30
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 30
atttgtgtct ttcaacgccg ccattt
26

<210> 31
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 31

ttgtgtcttt ctcgcccga tttc
24

<210> 32
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 32
cgccgccatt tctttgtgtc tttctg
26

<210> 33
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 33
tgtgtctttc tgccgccatt tc
22

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 34
tgtgtctttc ccgccatttc
20

<210> 35
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 35

ttagccactg attccgccaat ttctca
26

<210> 36
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 36
atttgtgtct ttccgccgcc atttct
26

<210> 37
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 37
tctgttagcc actcgccgcc atttct
26

<210> 38
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 38
tgtagccac tgaccgccaat ttctca
26

<210> 39
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 39

tctgttagcc actccgcat ttctca
26

<210> 40
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 40
ttagccactg attcgccgcc atttct
26

<210> 41
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 41
tgtagccac tgaaacgccg ccattt
26

<210> 42
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 42
tctgttagcc actaacgccg ccattt
26

<210> 43
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 43

ttagccactg attaacgccg ccattt
26

<210> 44
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 44
ttgtgtcttt ctgtgtagc cactga
26

<210> 45
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 45
tggtcagctt ctgtgtagc cactga
26

<210> 46
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 46
ttagccactg cgccgccatt
20

<210> 47
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 47

ctggttagcca cgccgccatt
20

<210> 48
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 48
tggttcagctt tagccactga
20

<210> 49
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 49
ctggttagcca ccgccatttc
20

<210> 50
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 50
ttgtgtcttt ctggccattt ctcaac
26

<210> 51
<211> 25
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 51

ctggttagcca ctgcataatg aaaac
25

<210> 52
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 52
ttctggttagc caaaaacgcc gcc
24

<210> 53
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 53
ttagccactg acgccgccat tt
22

<210> 54
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 54
ctggttagcca cgccgccatt tc
22

<210> 55
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 55

actgttcagc gccactgatt
20

<210> 56
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 56
aactgttcag ctttagccac tgatta
26

<210> 57
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 57
ctgagaaaact gtttgtagc cactga
26

<210> 58
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 58
aacgccgcca tttgtgtatt tc
22

<210> 59
<211> 28
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 59

tggtgtctttc tgtttagccat ttctcaac
28

<210> 60
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 60
cgccgccatt tcttgtgtct ttct
24

<210> 61
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 61
ccgccatttc tcattgtgtc tttctg
26

<210> 62
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 62
ccgccatttc tcattgtgtc tttctg
26

<210> 63
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 63

ctttctgaga aactgttagc cactga
26

<210> 64
<211> 25
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 64
gccactgacc tctcagcttc tgtta
25

<210> 65
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 65
aacgccgcca tttatttgtg tctttc
26

<210> 66
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 66
aaacgccgcc atttgtgtct ttctga
26

<210> 67
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 67

ctttctgtta gccactgaac
20

<210> 68
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 68
cgccgccatt tcttttctga gaaact
26

<210> 69
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 69
aacgccgcca tttctgagaa actgtt
26

<210> 70
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 70
cccagcttct gttagccact gacc
24

<210> 71
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 71

cttgcttctg ttagccactg accc
24

<210> 72
<211> 21
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 72
cgccgccatt tctgagaaac t
21

<210> 73
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 73
ccgccatttc tcagtgtctt tctgag
26

<210> 74
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 74
tgtagccac tgattgtgtc tttctg
26

<210> 75
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 75

atttgtgtct ttctgttagc cactga
26

<210> 76
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 76
gtcttttctga gcgccatttc tc
22

<210> 77
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 77
ttgtgtcttt cctgttagcc ac
22

<210> 78
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 78
tgtctttctg agccgccatt tctc
24

<210> 79
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 79

aaactgttca gcttctgtca aatcgc
26

<210> 80
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 80
acgccgccat ttctcaggaa tttgtg
26

<210> 81
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 81
ctgttcagct ccactgatta
20

<210> 82
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 82
actgttcagc ccactgatta
20

<210> 83
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 83

tgtgtctttc tcgccgcat tt
22

<210> 84
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 84
tgtctttctg acgccatttc tc
22

<210> 85
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 85
cgccgccatt tctttgtgtc tttc
24

<210> 86
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 86
cgccgccatt tttgtgtctt tc
22

<210> 87
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 87

ctgttcagct tgtagccac
20

<210> 88
<211> 21
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 88
ttctgagaaa ctgttagcca c
21

<210> 89
<211> 18
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 89
ctgttcagcc actgatta
18

<210> 90
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 90
ctgagaaact tgtagccac
20

<210> 91
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 91

tgtctttctg accgccattt ct
22

<210> 92
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 92
ctttctgaga acgccatttc tc
22

<210> 93
<211> 19
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 93
ctttctgaga aacgccgcc
19

<210> 94
<211> 23
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 94
tgtctttctg ttagccattt ctc
23

<210> 95
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 95

ctttctgtta gccatttctc
20

<210> 96
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 96
ctttctgaga gccatttctc
20

<210> 97
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 97
ctgttagcca ctccgccatt tc
22

<210> 98
<211> 21
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 98
ctgtgtcttt ctgttagcca c
21

<210> 99
<211> 21
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 99

ctgttcagcg ccactgatta c
21

<210> 100
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 100
ctttctgaga aacgccgcca tttc
24

<210> 101
<211> 25
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 101
tgtctttctg agccgccatt tctca
25

<210> 102
<211> 21
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 102
ctttctgaga accgccattt c
21

<210> 103
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 103

tgttagccac tgtgtcaaat cgcc
24

<210> 104
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 104
tgtctttctg agtgtcaaat cgcc
24

<210> 105
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 105
ccgccatttc tctgtcaaat cgcc
24

<210> 106
<211> 25
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 106
gtgtctttct gagccgccat ttctc
25

<210> 107
<211> 25
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 107

gtgtctttct gaccgccatt tctca
25

<210> 108
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 108
gtgtctttct gaccgccatt tctc
24

<210> 109
<211> 21
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 109
ttcagcttct gtcaaatacg c
21

<210> 110
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 110
tgtagccac tgtcaaatacg cc
22

<210> 111
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 111

tgtctttctg agtcaaatcg cc
22

<210> 112
<211> 22
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 112
cgccatttct cgtcaaatcg cc
22

<210> 113
<211> 23
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 113
gtgtctttct gccgccattt ctc
23

<210> 114
<211> 12
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 114
ccgccatttc tc
12

<210> 115
<211> 11
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 115

tctgttagcc a
11

<210> 116
<211> 11
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 116
cgccgccatt t
11

<210> 117
<211> 12
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 117
ttgtgtcttt ct
12

<210> 118
<211> 12
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 118
tctgttagcc ac
12

<210> 119
<211> 13
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 119

gtgtctttct gag
13

<210> 120
<211> 13
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 120
ccgccatttc tca
13

<210> 121
<211> 12
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 121
ctgttagcca ct
12

<210> 122
<211> 12
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 122
cgccgccatt tc
12

<210> 123
<211> 10
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 123

gccactgatt
10

<210> 124
<211> 10
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 124
actgttcagc
10

<210> 125
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 125
gctcaggtcg gattgacatt
20

<210> 126
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 126
gggcaactct tccaccagta
20

<210> 127
<211> 963
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(963)

<400> 127

atg gag cta ctg tcg cca ccg ctc cgc gac gta gac ctg acg gcc ccc
48

Met Glu Leu Leu Ser Pro Pro Leu Arg Asp Val Asp Leu Thr Ala Pro
1 5 10 15

gac ggc tct ctc tgc tcc ttt gcc aca acg gac gac ttc tat gac gac
96

Asp Gly Ser Leu Cys Ser Phe Ala Thr Thr Asp Asp Phe Tyr Asp Asp
20 25 30

ccg tgt ttc gac tcc ccg gac ctg cgc ttc ttc gaa gac ctg gac ccg
144

Pro Cys Phe Asp Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Glu Asp Leu Asp Pro
35 40 45

cgc ctg atg cac gtg ggc gcg ctc ctg aaa ccc gaa gag cac tcg cac
192

Arg Leu Met His Val Gly Ala Leu Leu Lys Pro Glu Glu His Ser His
50 55 60

ttc ccc gcg gcg gtg cac ccg gcc ccg ggc gca cgt gag gac gag cat
240

Phe Pro Ala Ala Val His Pro Ala Pro Gly Ala Arg Glu Asp Glu His
65 70 75 80

gtg cgc gcg ccc agc ggg cac cac cag gcg ggc cgc tgc cta ctg tgg
288

Val Arg Ala Pro Ser Gly His His Gln Ala Gly Arg Cys Leu Leu Trp
85 90 95

gcc tgc aag gcg tgc aag cgc aag acc acc aac gcc gac cgc cgc aag
336

Ala Cys Lys Ala Cys Lys Arg Lys Thr Thr Asn Ala Asp Arg Arg Lys
100 105 110

gcc gcc acc atg cgc gag cgg cgc cgc ctg agc aaa gta aat gag gcc
384

Ala Ala Thr Met Arg Glu Arg Arg Arg Leu Ser Lys Val Asn Glu Ala
115 120 125

ttt gag aca ctc aag cgc tgc acg tcg agc aat cca aac cag cgg ttg
432

Phe Glu Thr Leu Lys Arg Cys Thr Ser Ser Asn Pro Asn Gln Arg Leu
130 135 140

ccc aag gtg gag atc ctg cgc aac gcc atc cgc tat atc gag ggc ctg
480

Pro Lys Val Glu Ile Leu Arg Asn Ala Ile Arg Tyr Ile Glu Gly Leu
145 150 155 160

cag gct ctg ctg cgc gac cag gac gcc gcg ccc cct ggc gcc gca gcc
528

Gln Ala Leu Leu Arg Asp Gln Asp Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala
 165 170 175
 gcc ttc tat gcg ccg ggc ccg ctg ccc ccg ggc cgc ggc ggc gag cac
 576
 Ala Phe Tyr Ala Pro Gly Pro Leu Pro Pro Gly Arg Gly Gly Glu His
 180 185 190
 tac agc ggc gac tcc gac gcg tcc agc ccg cgc tcc aac tgc tcc gac
 624
 Tyr Ser Gly Asp Ser Asp Ala Ser Ser Pro Arg Ser Asn Cys Ser Asp
 195 200 205
 ggc atg atg gac tac agc ggc ccc ccg agc ggc gcc cgg cgg cgg aac
 672
 Gly Met Met Asp Tyr Ser Gly Pro Pro Ser Gly Ala Arg Arg Arg Asn
 210 215 220
 tgc tac gaa ggc gcc tac tac aac gag gcg ccc agc gaa ccc agg ccc
 720
 Cys Tyr Glu Gly Ala Tyr Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Glu Pro Arg Pro
 225 230 235 240
 ggg aag agt gcg gcg gtg tcg agc cta gac tgc ctg tcc agc atc gtg
 768
 Gly Lys Ser Ala Ala Val Ser Ser Leu Asp Cys Leu Ser Ser Ile Val
 245 250 255
 gag cgc atc tcc acc gag agc cct gcg gcg ccc gcc ctc ctg ctg gcg
 816
 Glu Arg Ile Ser Thr Glu Ser Pro Ala Ala Pro Ala Leu Leu Leu Ala
 260 265 270
 gac gtg cct tct gag tcg cct ccg cgc agg caa gag gct gcc gcc ccc
 864
 Asp Val Pro Ser Glu Ser Pro Pro Arg Arg Gln Glu Ala Ala Ala Pro
 275 280 285
 agc gag gga gag agc agc ggc gac ccc acc cag tca ccg gac gcc gcc
 912
 Ser Glu Gly Glu Ser Ser Gly Asp Pro Thr Gln Ser Pro Asp Ala Ala
 290 295 300
 ccg cag tgc cct gcg ggt gcg aac ccc aac ccg ata tac cag gtg ctc
 960
 Pro Gln Cys Pro Ala Gly Ala Asn Pro Asn Pro Ile Tyr Gln Val Leu
 305 310 315 320
 tga
 963

<210> 128

<211> 320
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

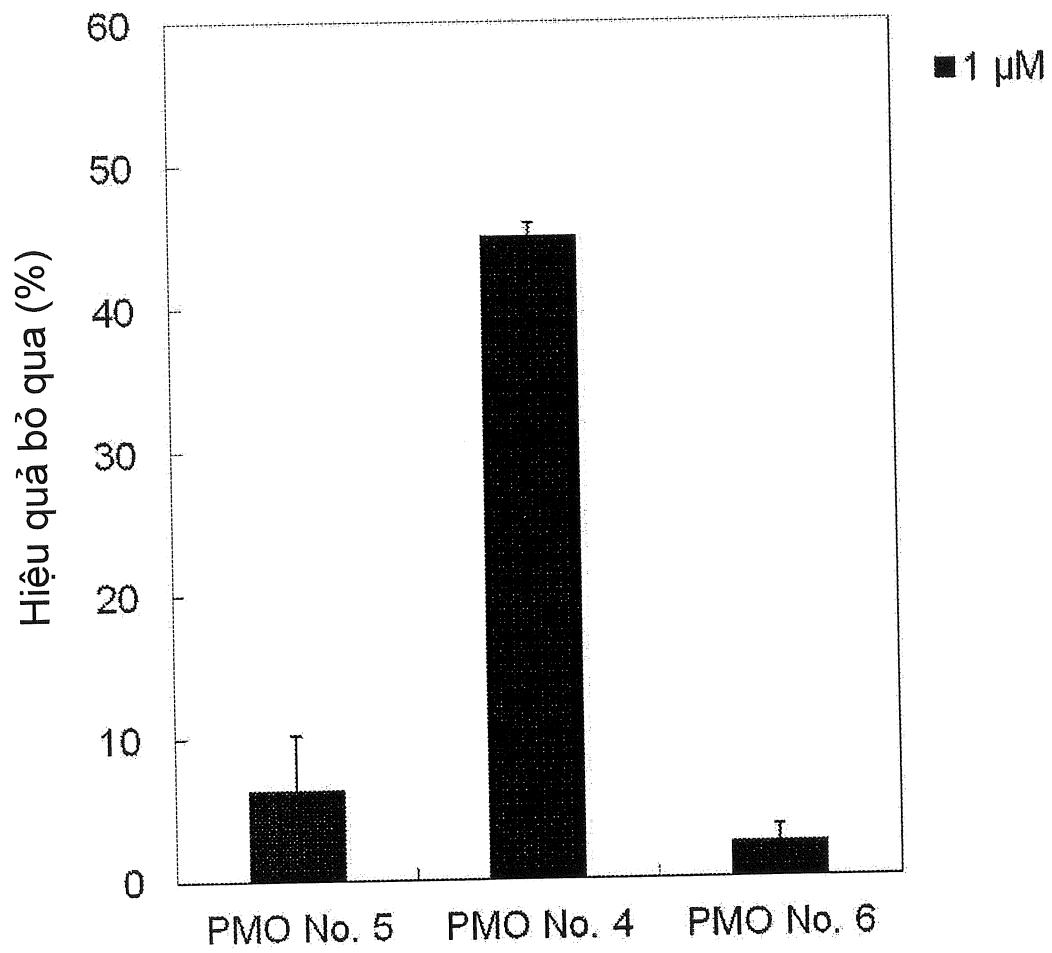
<400> 128

```

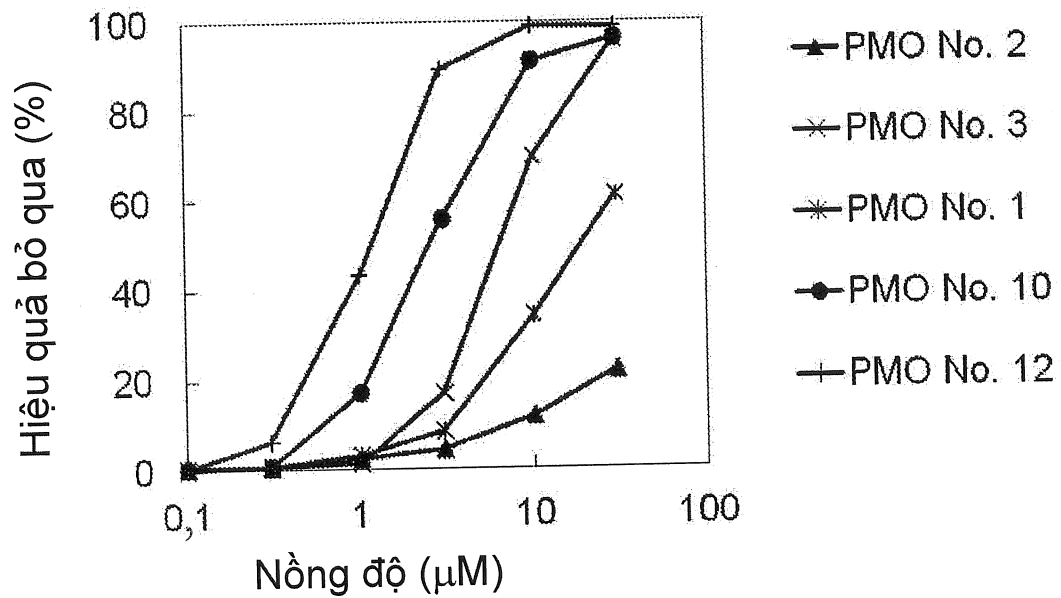
Met Glu Leu Leu Ser Pro Pro Leu Arg Asp Val Asp Leu Thr Ala Pro
1          5          10          15
Asp Gly Ser Leu Cys Ser Phe Ala Thr Thr Asp Asp Phe Tyr Asp Asp
20          25          30
Pro Cys Phe Asp Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Glu Asp Leu Asp Pro
35          40          45
Arg Leu Met His Val Gly Ala Leu Leu Lys Pro Glu Glu His Ser His
50          55          60
Phe Pro Ala Ala Val His Pro Ala Pro Gly Ala Arg Glu Asp Glu His
65          70          75          80
Val Arg Ala Pro Ser Gly His His Gln Ala Gly Arg Cys Leu Leu Trp
85          90          95
Ala Cys Lys Ala Cys Lys Arg Lys Thr Thr Asn Ala Asp Arg Arg Lys
100         105         110
Ala Ala Thr Met Arg Glu Arg Arg Arg Leu Ser Lys Val Asn Glu Ala
115         120         125
Phe Glu Thr Leu Lys Arg Cys Thr Ser Ser Asn Pro Asn Gln Arg Leu
130         135         140
Pro Lys Val Glu Ile Leu Arg Asn Ala Ile Arg Tyr Ile Glu Gly Leu
145         150         155         160
Gln Ala Leu Leu Arg Asp Gln Asp Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala
165         170         175
Ala Phe Tyr Ala Pro Gly Pro Leu Pro Pro Gly Arg Gly Gly Glu His
180         185         190
Tyr Ser Gly Asp Ser Asp Ala Ser Ser Pro Arg Ser Asn Cys Ser Asp
195         200         205
Gly Met Met Asp Tyr Ser Gly Pro Pro Ser Gly Ala Arg Arg Arg Asn
210         215         220
Cys Tyr Glu Gly Ala Tyr Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Glu Pro Arg Pro
225         230         235         240
Gly Lys Ser Ala Ala Val Ser Ser Leu Asp Cys Leu Ser Ser Ile Val
245         250         255
Glu Arg Ile Ser Thr Glu Ser Pro Ala Ala Pro Ala Leu Leu Leu Ala
260         265         270
Asp Val Pro Ser Glu Ser Pro Pro Arg Arg Gln Glu Ala Ala Ala Pro
275         280         285
Ser Glu Gly Glu Ser Ser Gly Asp Pro Thr Gln Ser Pro Asp Ala Ala
290         295         300
Pro Gln Cys Pro Ala Gly Ala Asn Pro Asn Pro Ile Tyr Gln Val Leu
305         310         315         320

```

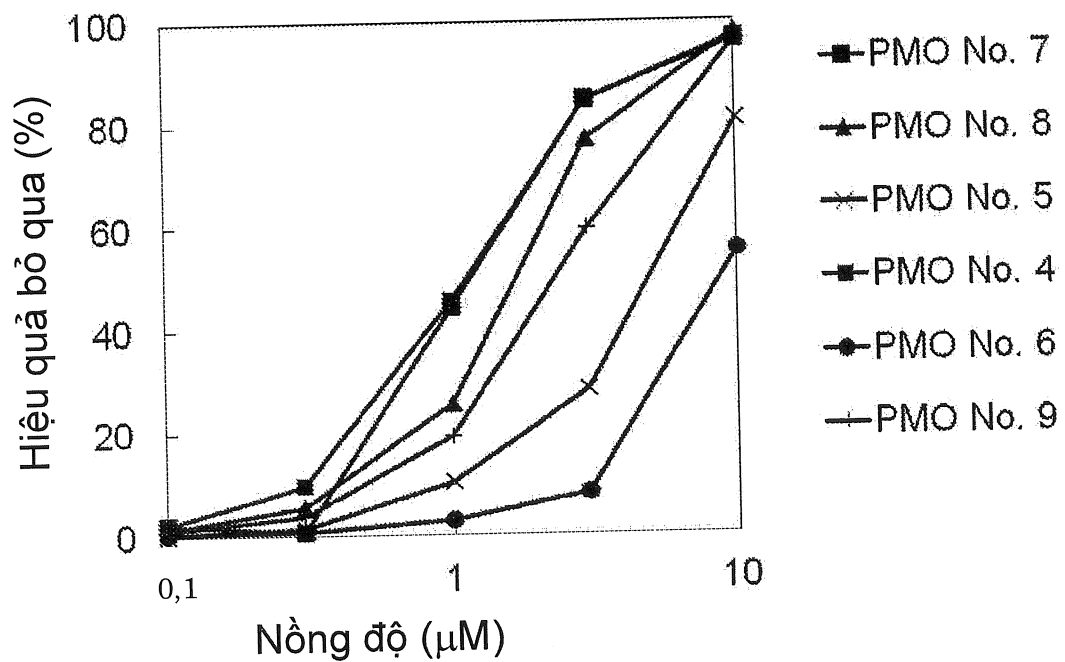
[FIG. 1]



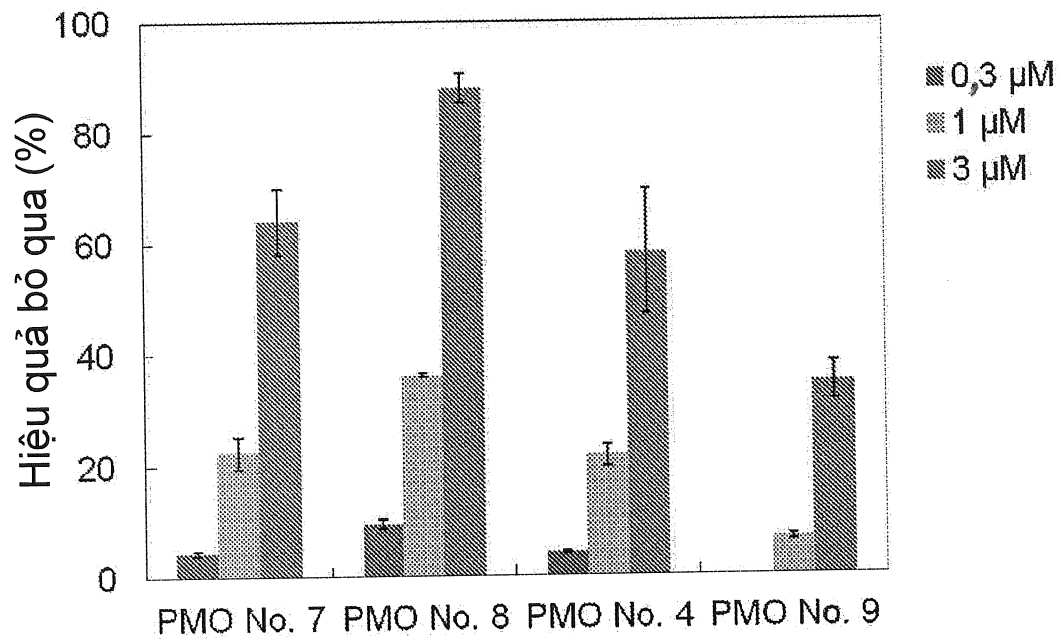
[FIG. 2]



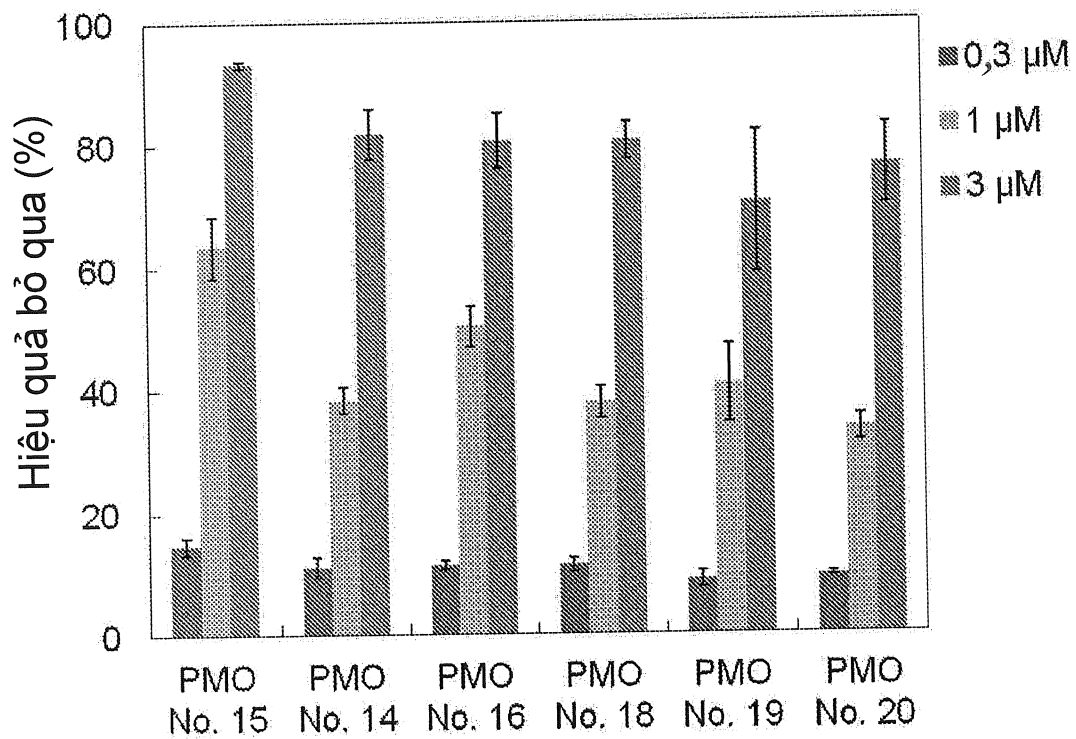
[FIG. 3]



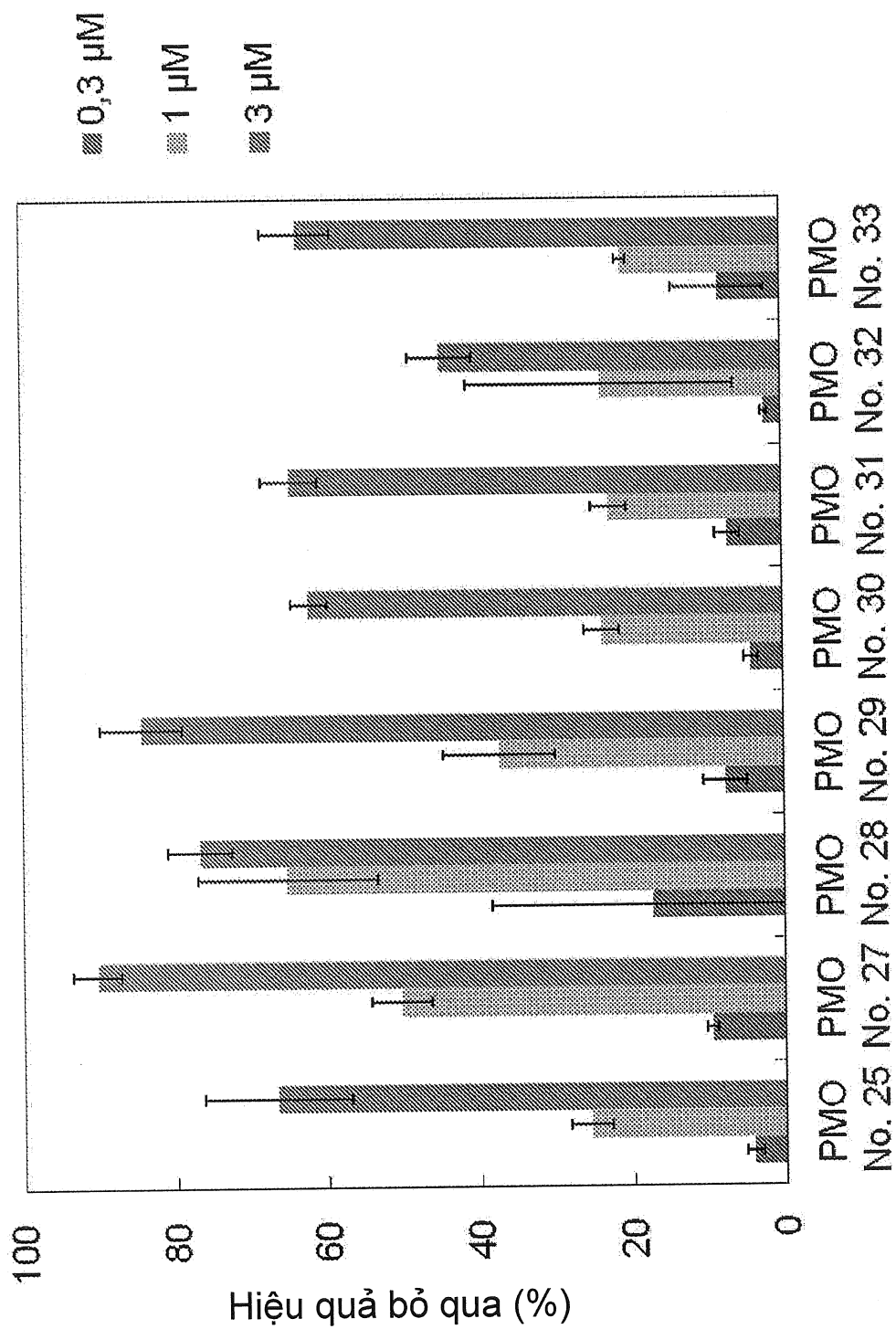
[FIG. 4]



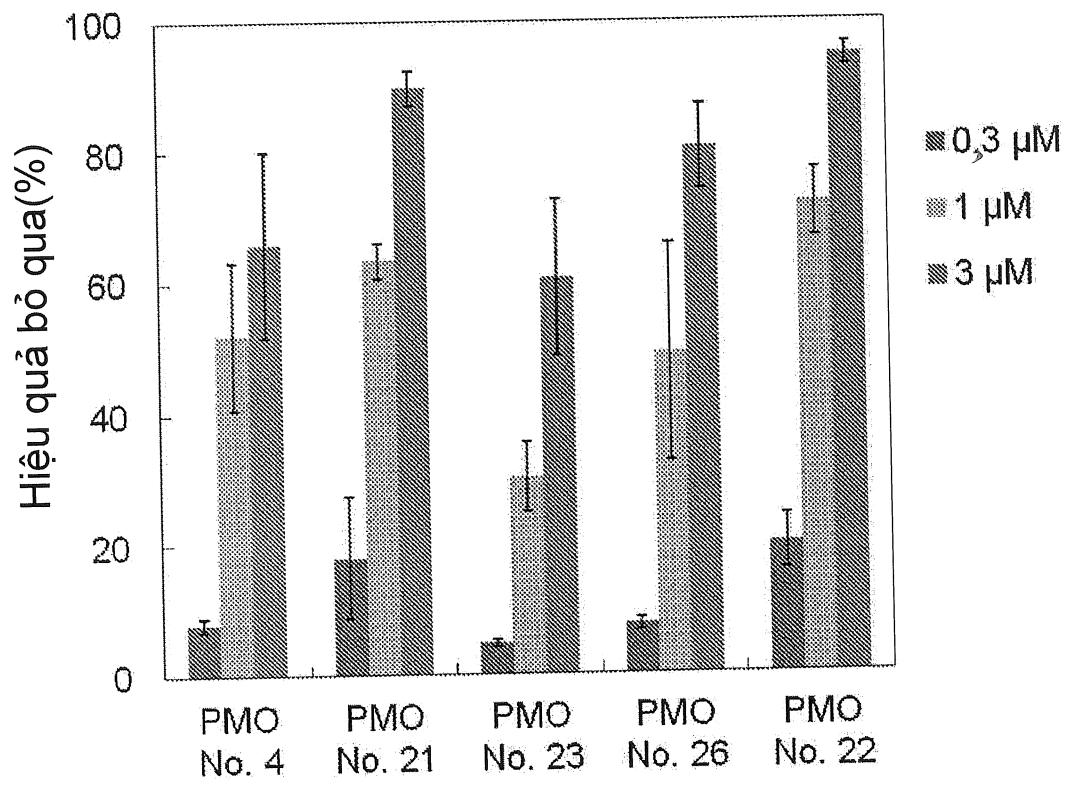
[FIG. 5]



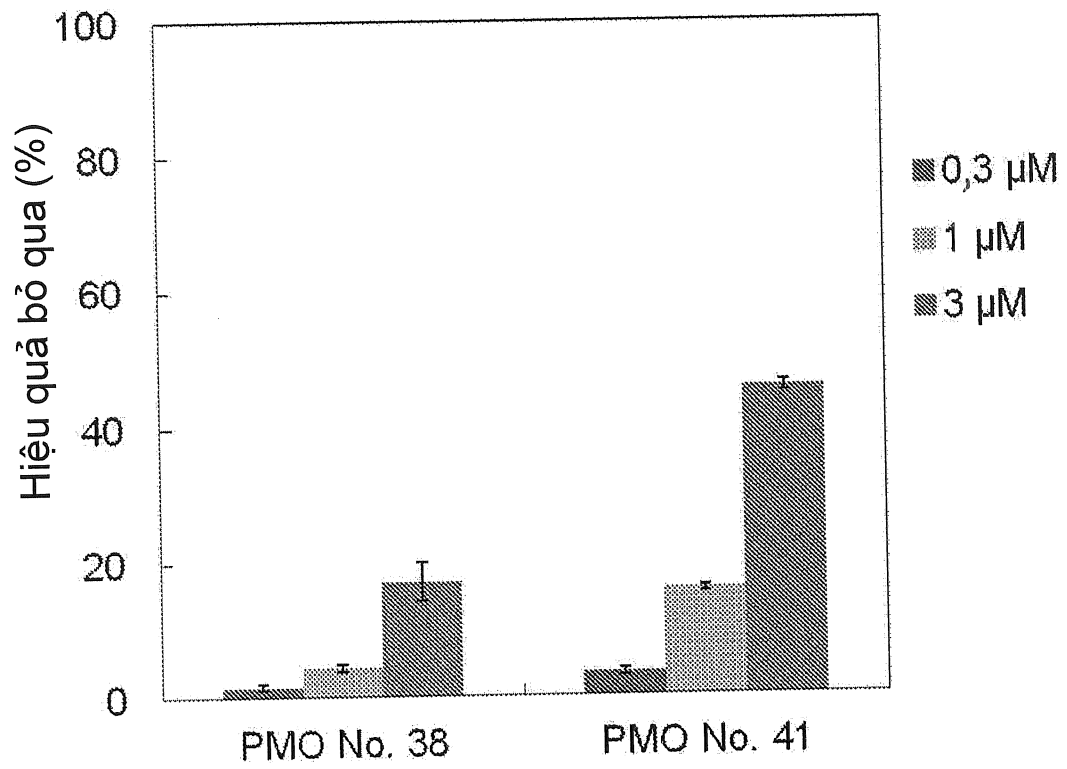
[FIG. 6]



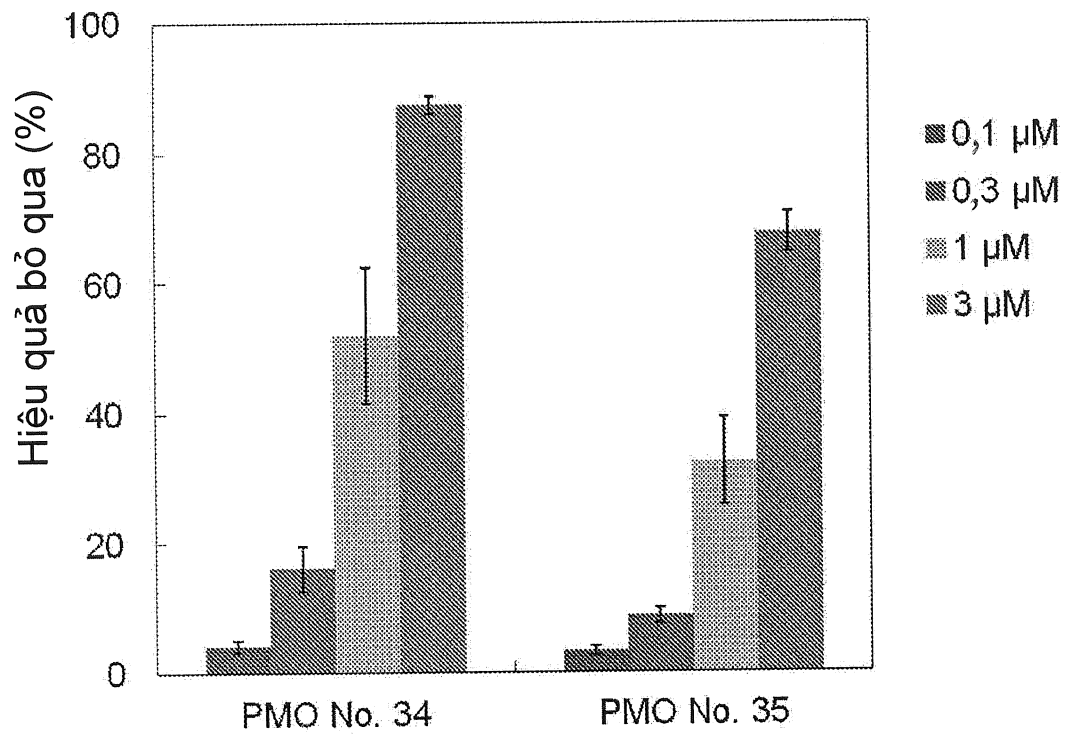
[FIG. 7]



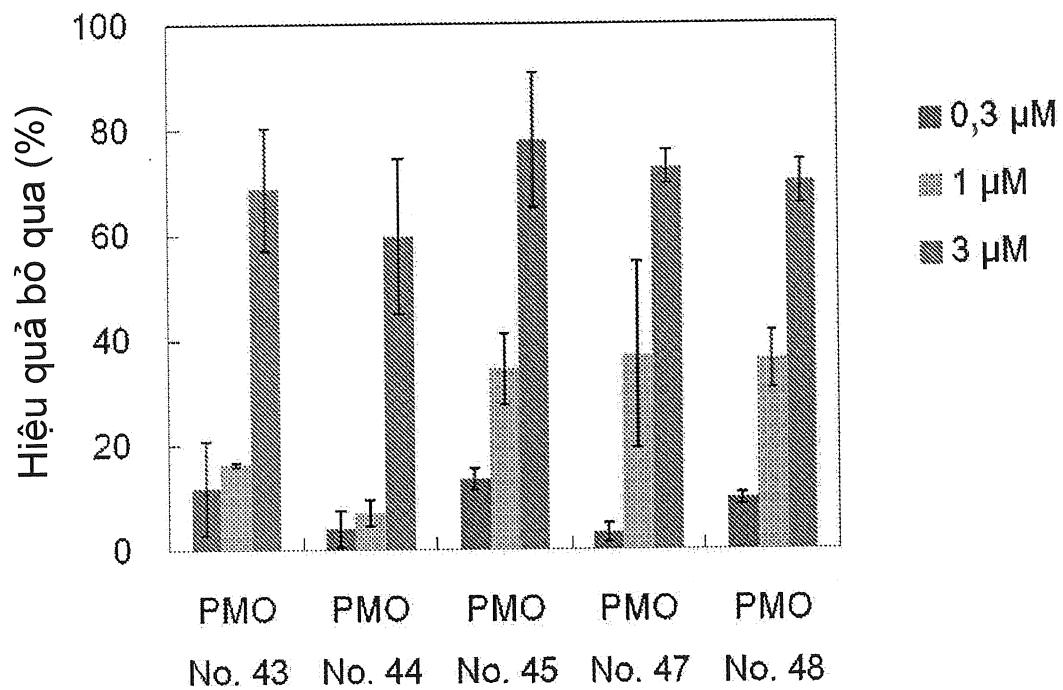
[FIG. 8]



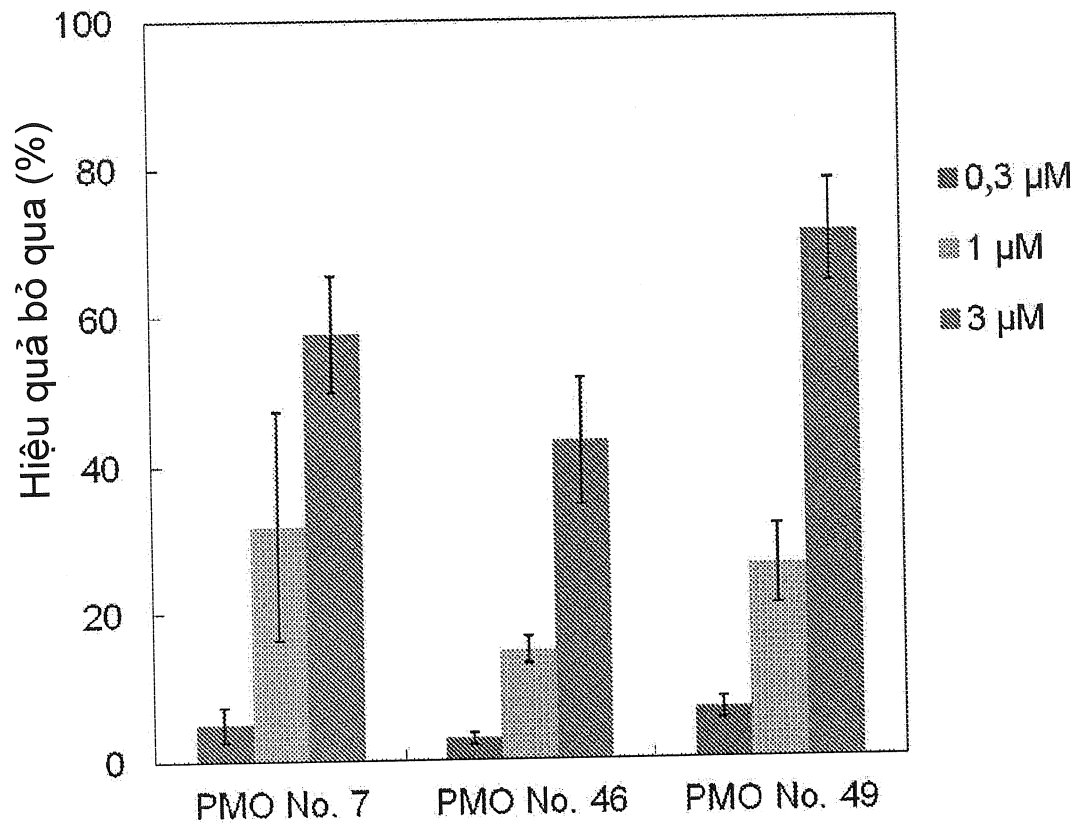
[FIG. 9]



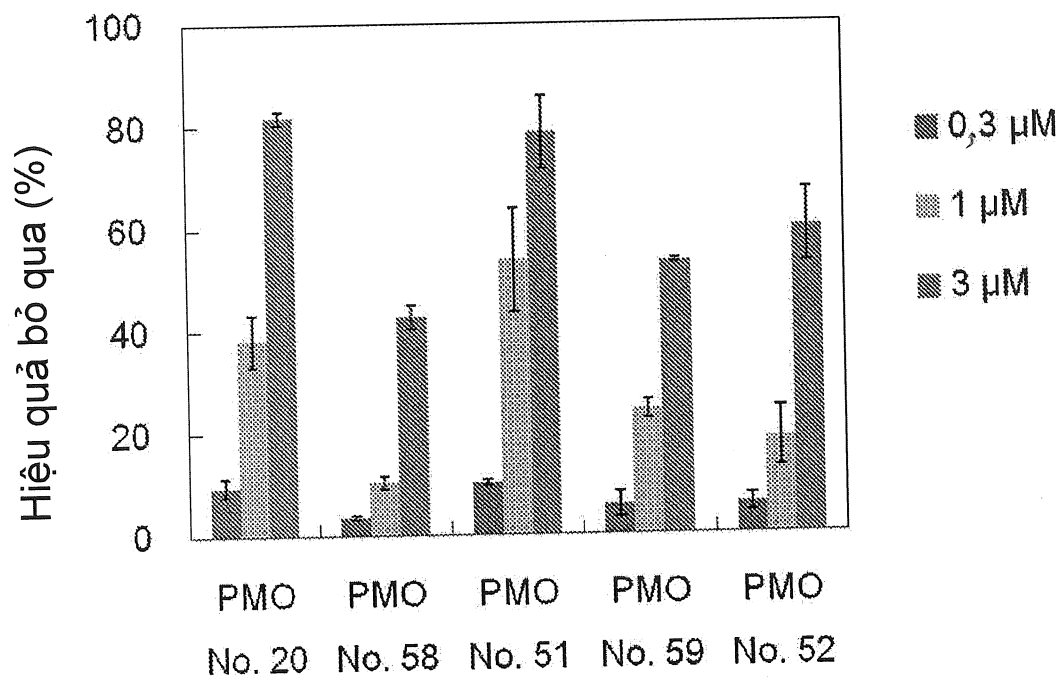
[FIG. 10]



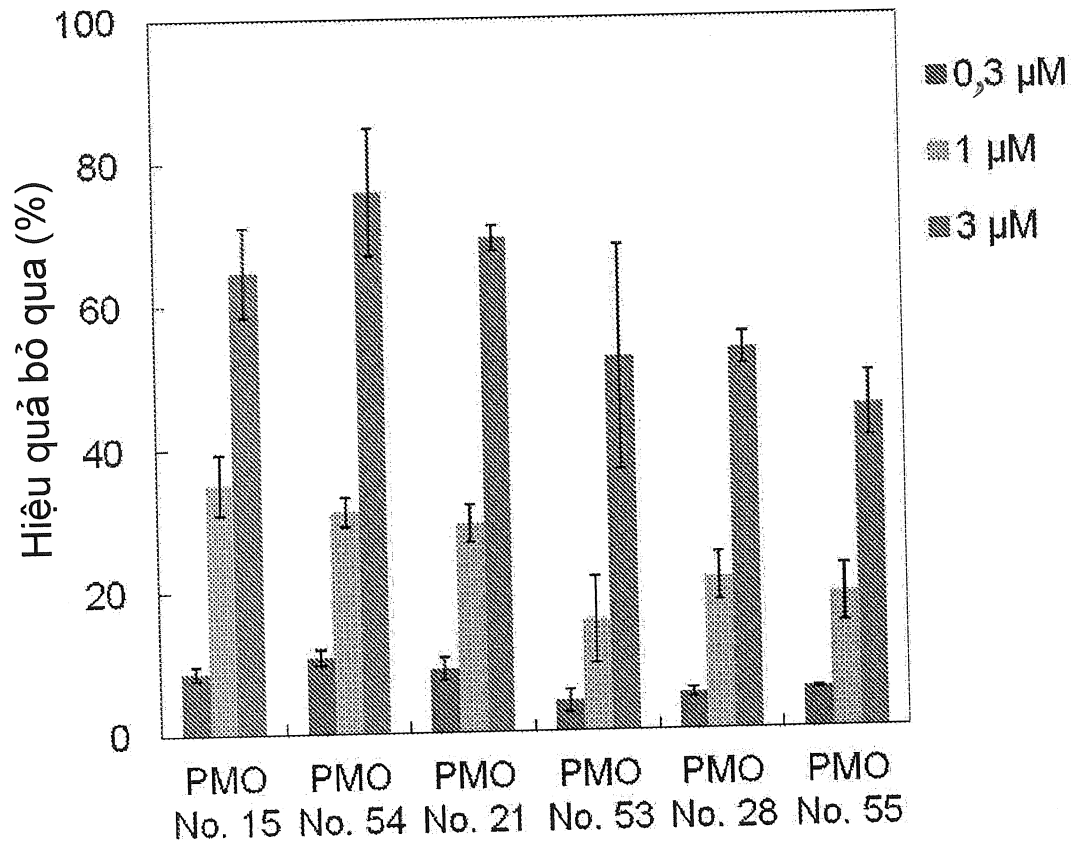
[FIG. 11]



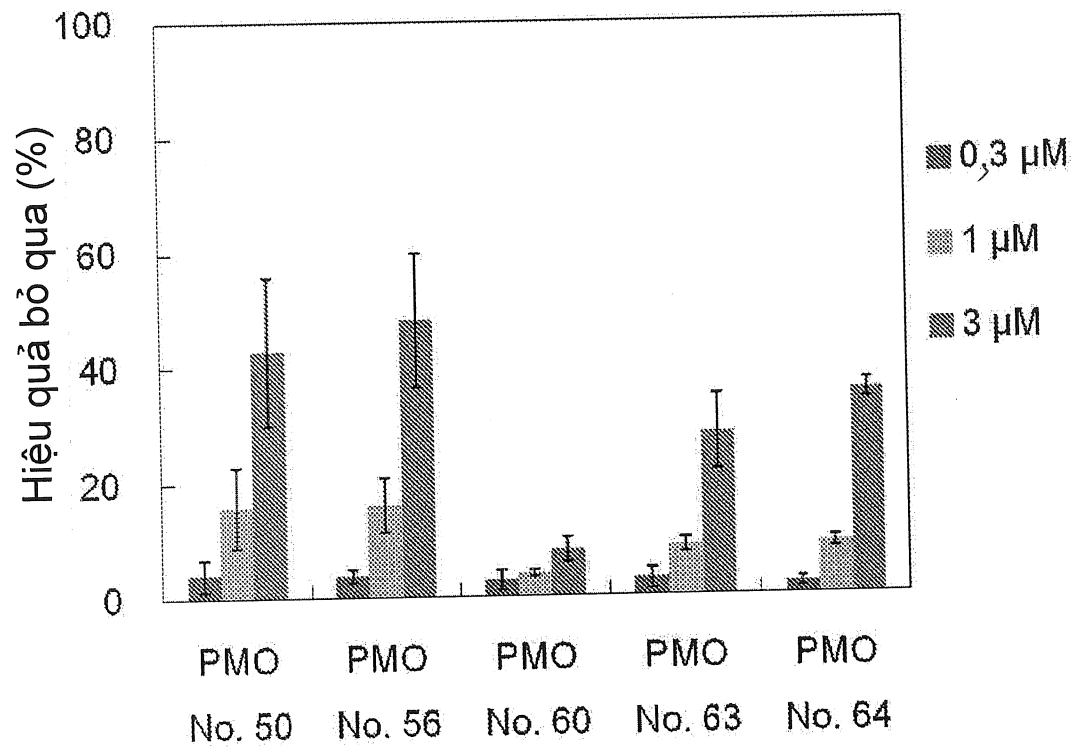
[FIG. 12]



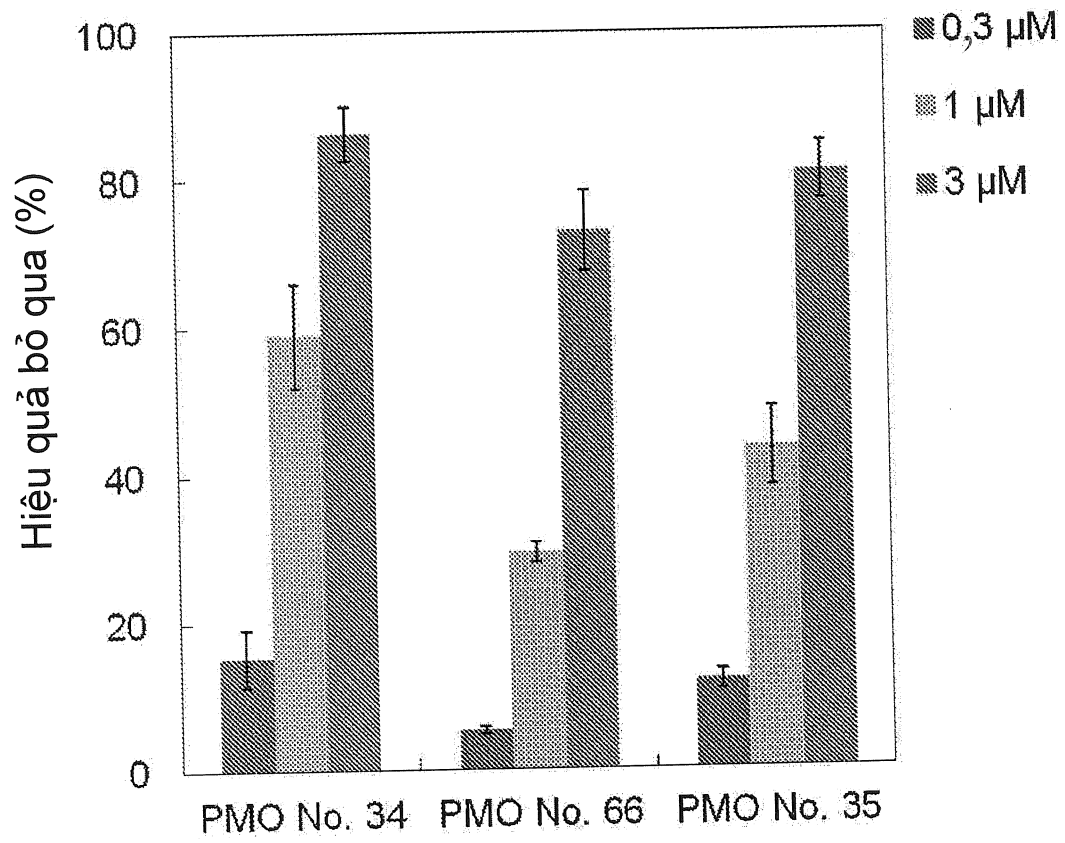
[FIG. 13]



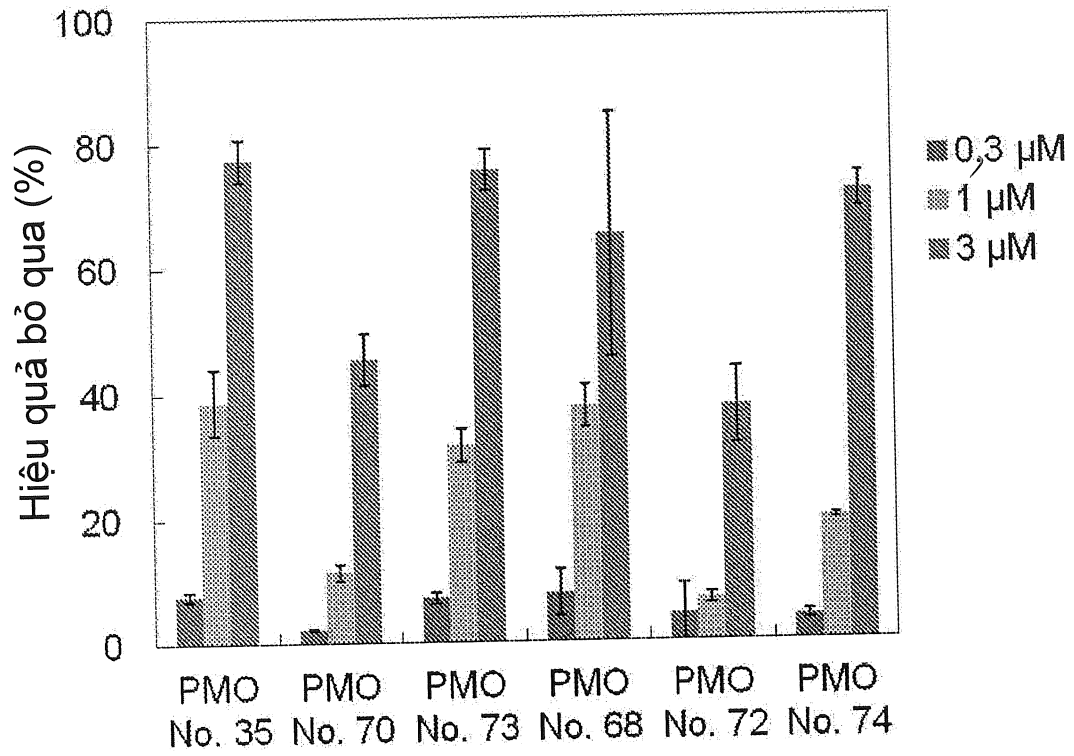
[FIG. 14]



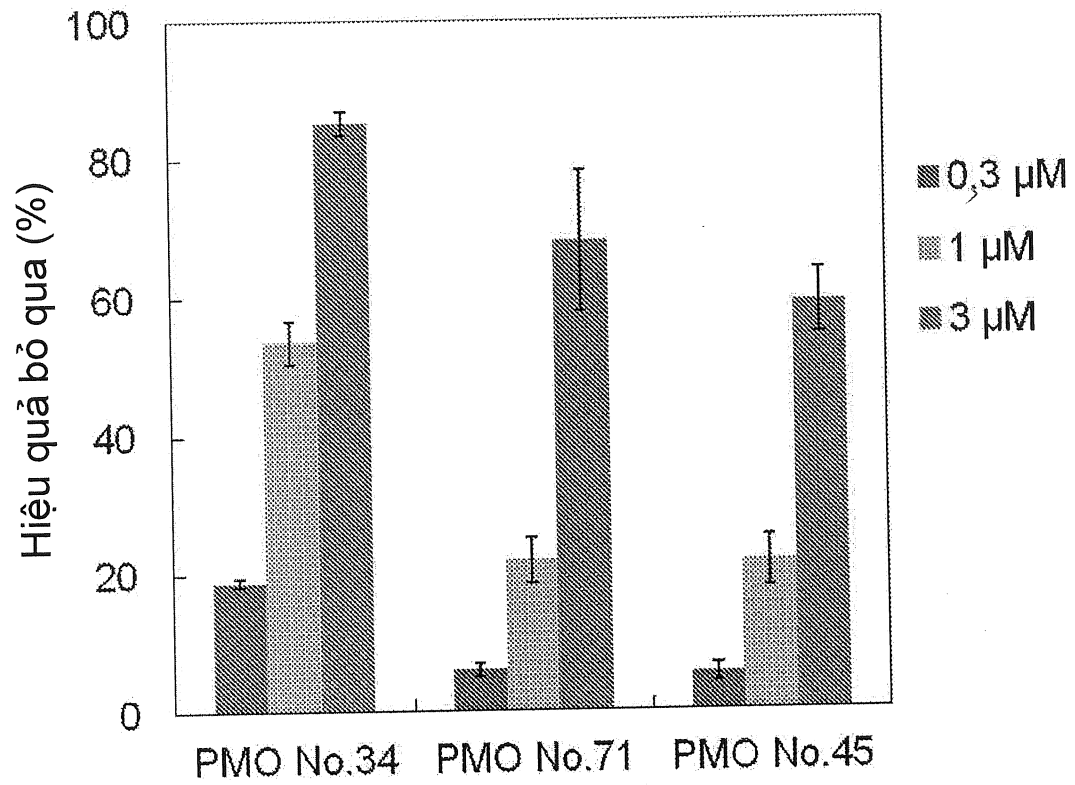
[FIG. 15]



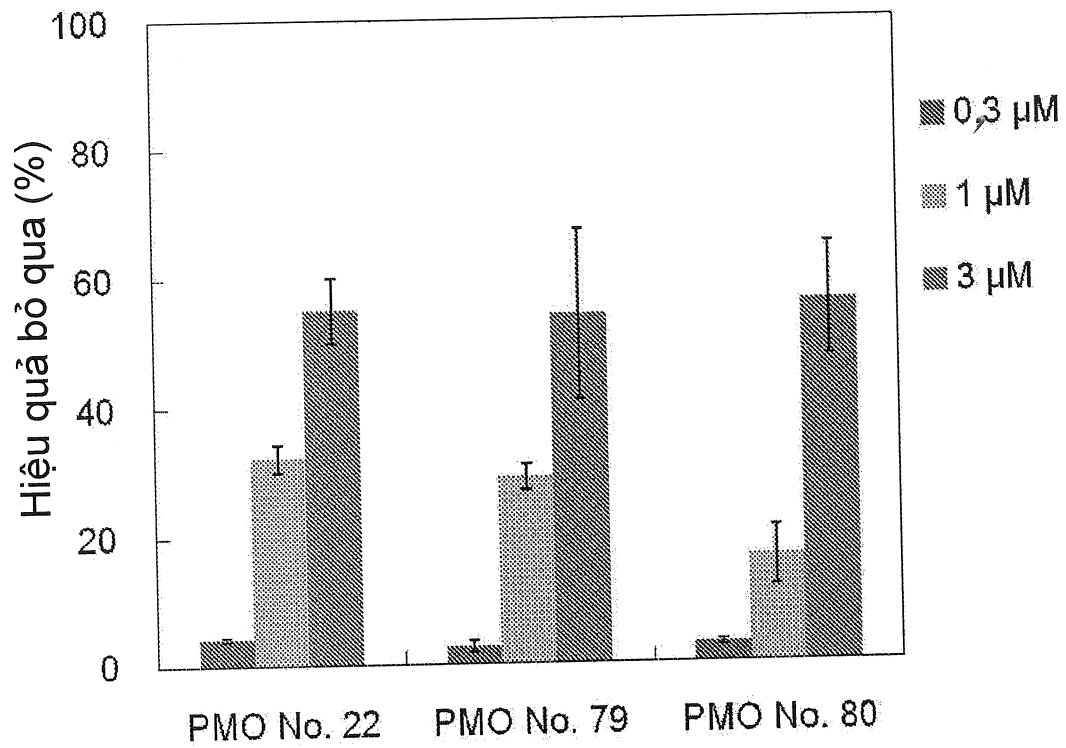
[FIG. 16]



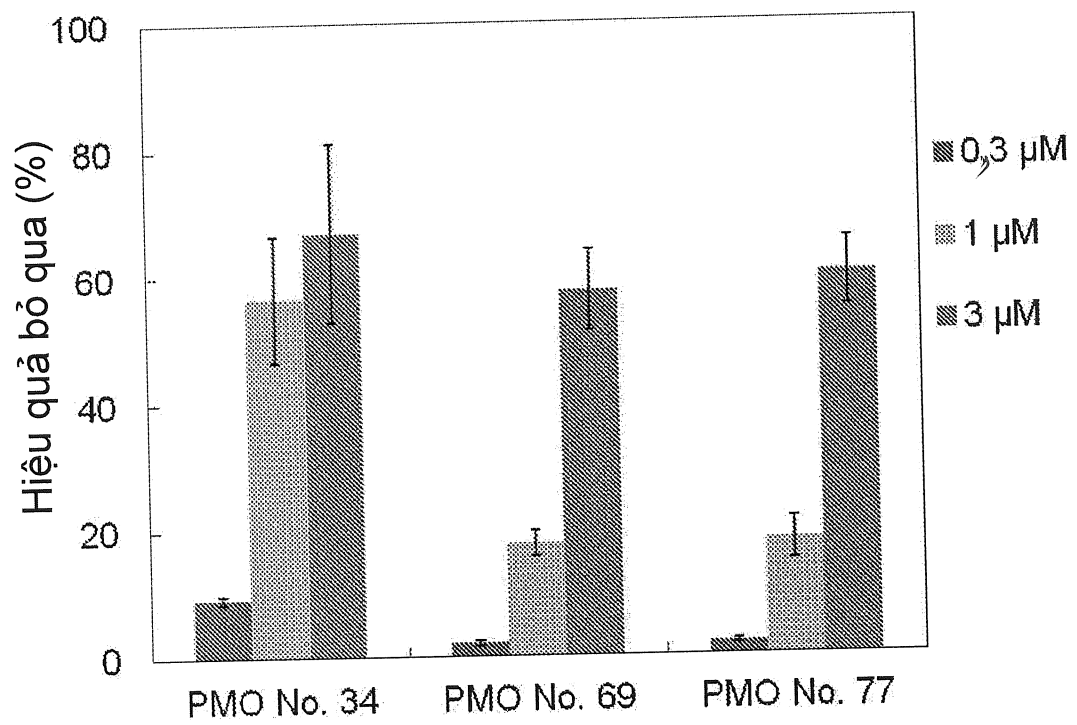
[FIG. 17]



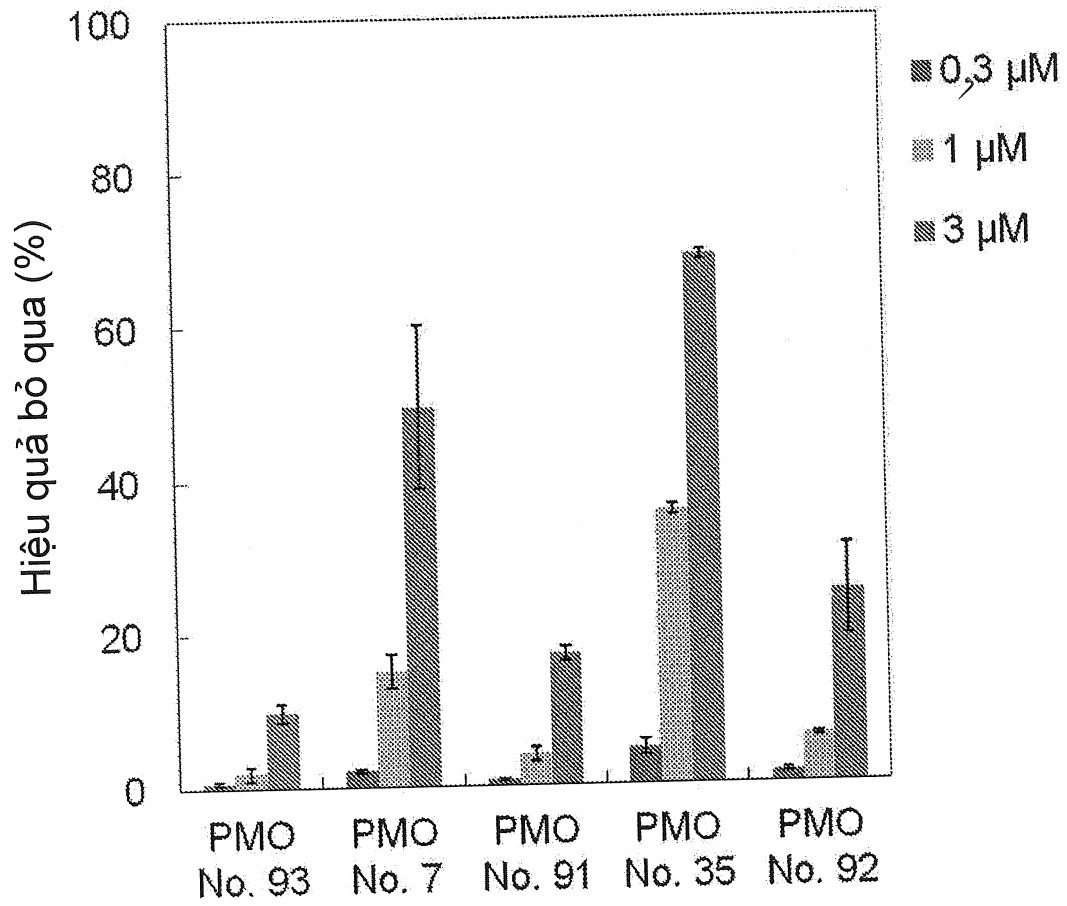
[FIG. 18]



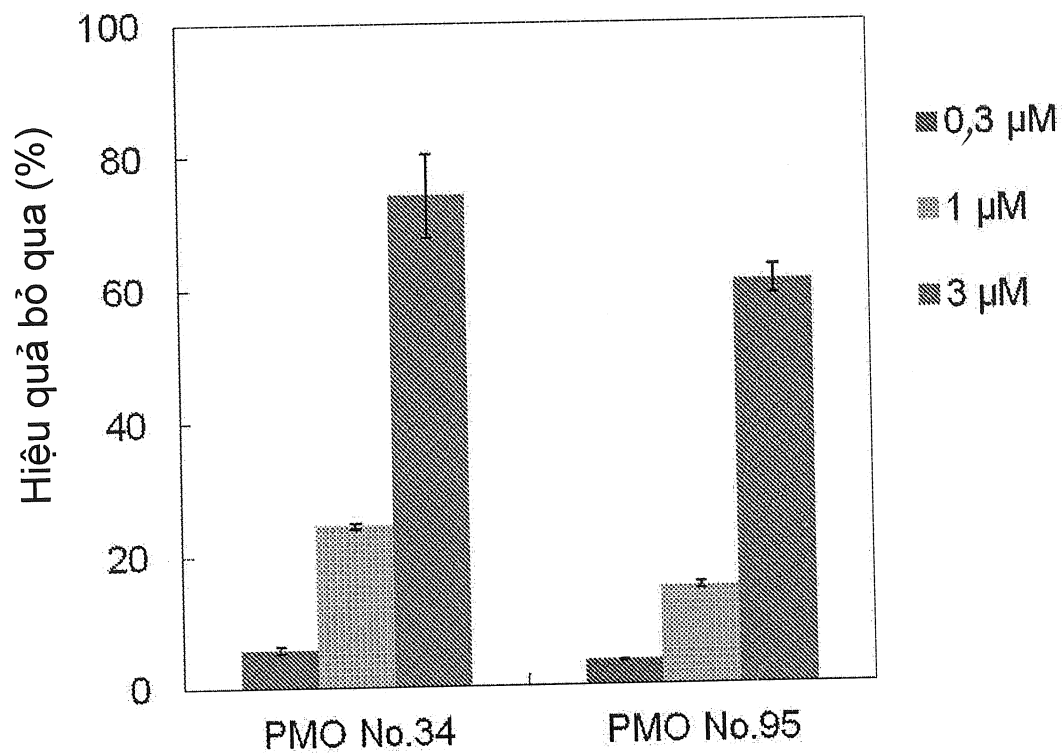
[FIG. 19]



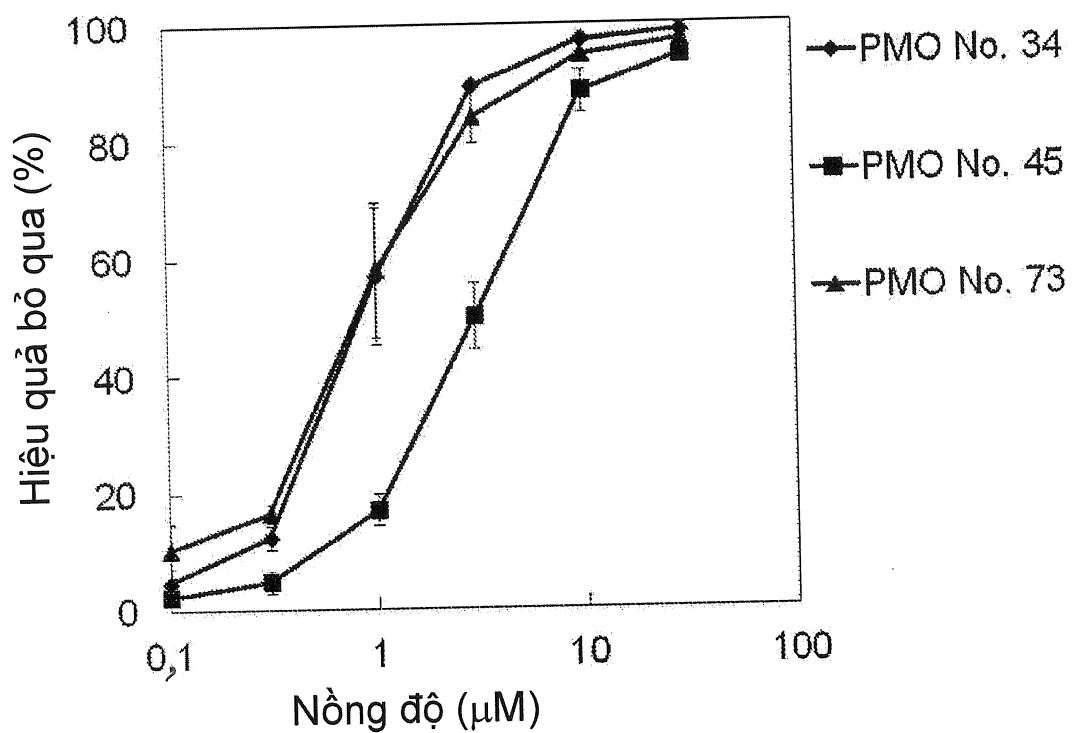
[FIG. 20]



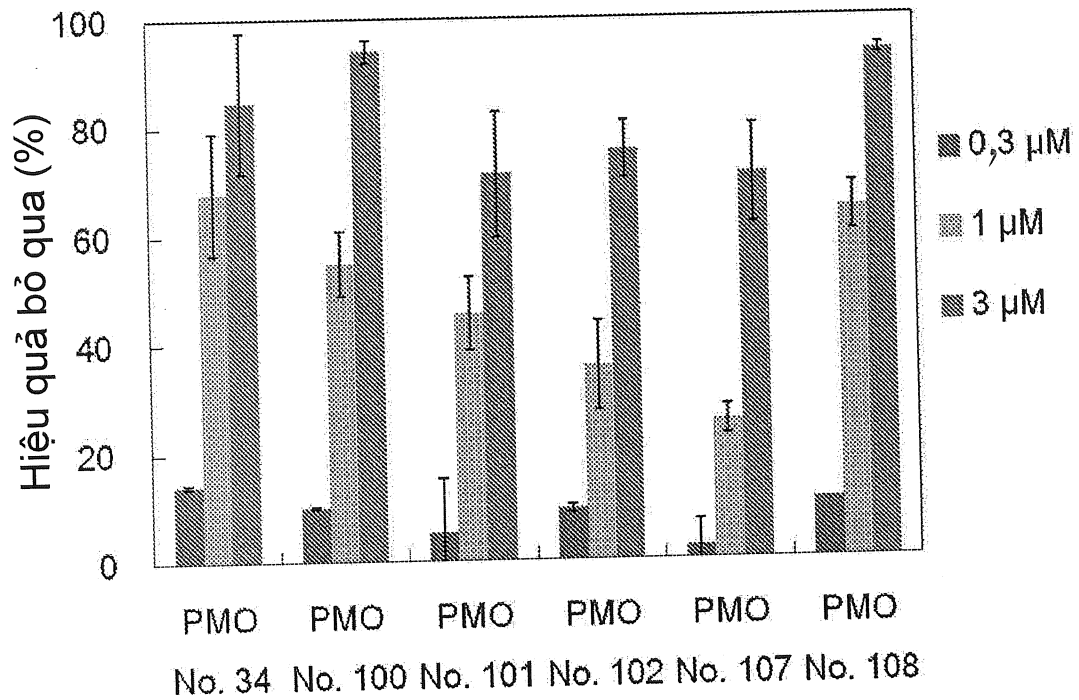
[FIG. 21]



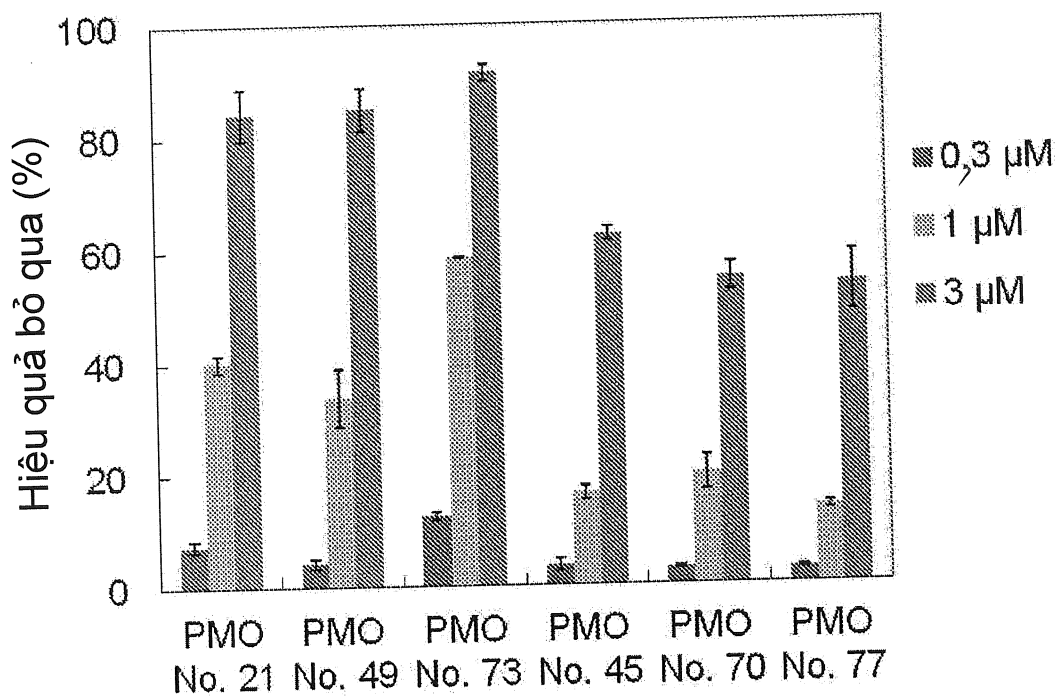
[FIG. 22]



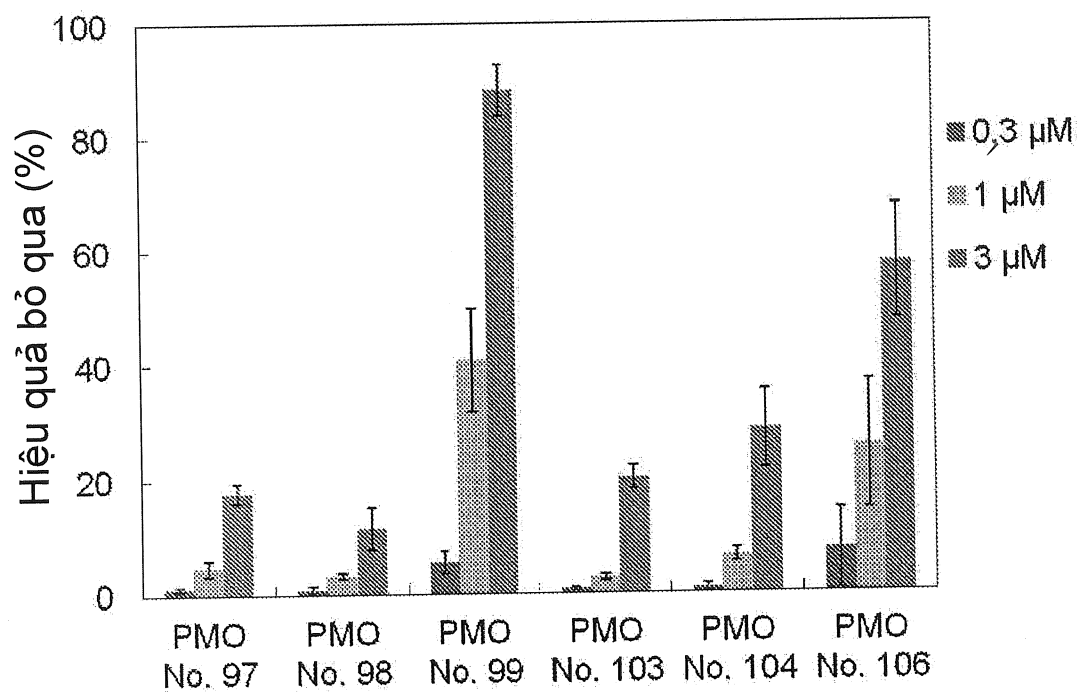
[FIG. 23]



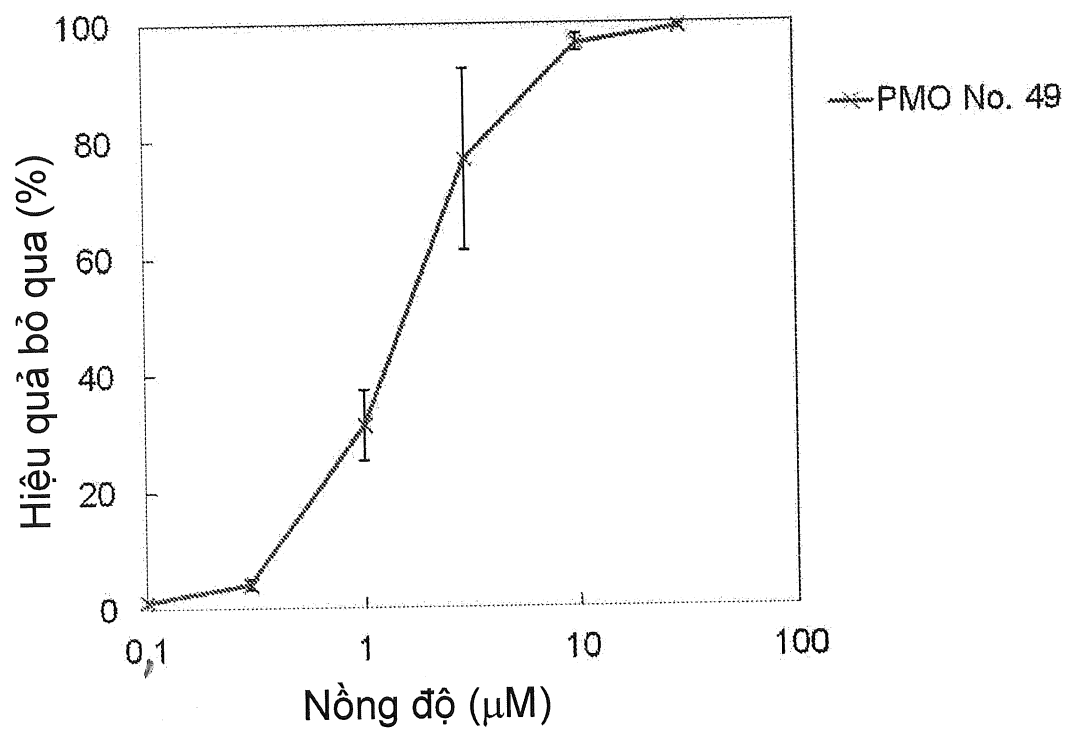
[FIG. 24]



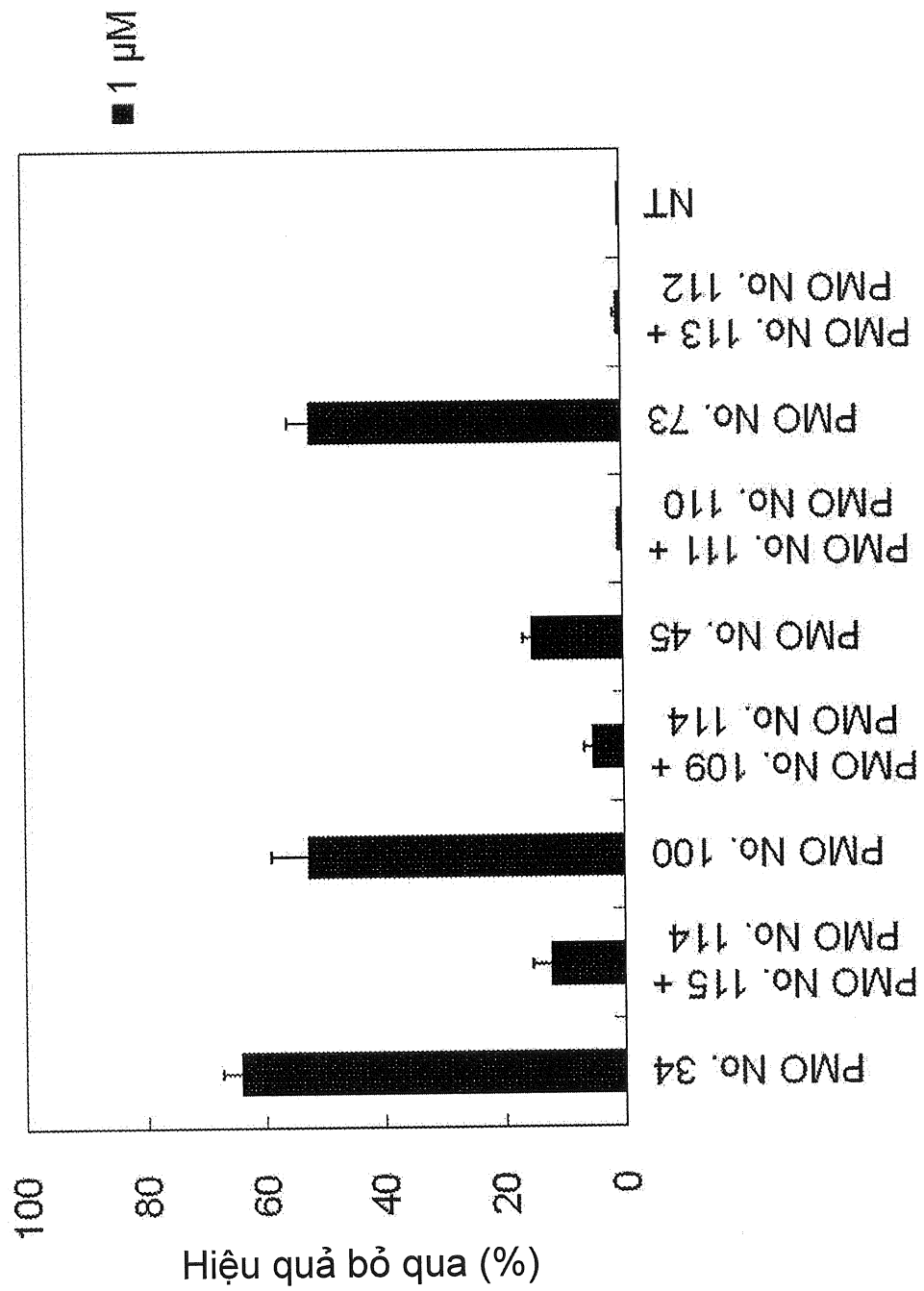
[FIG. 25]



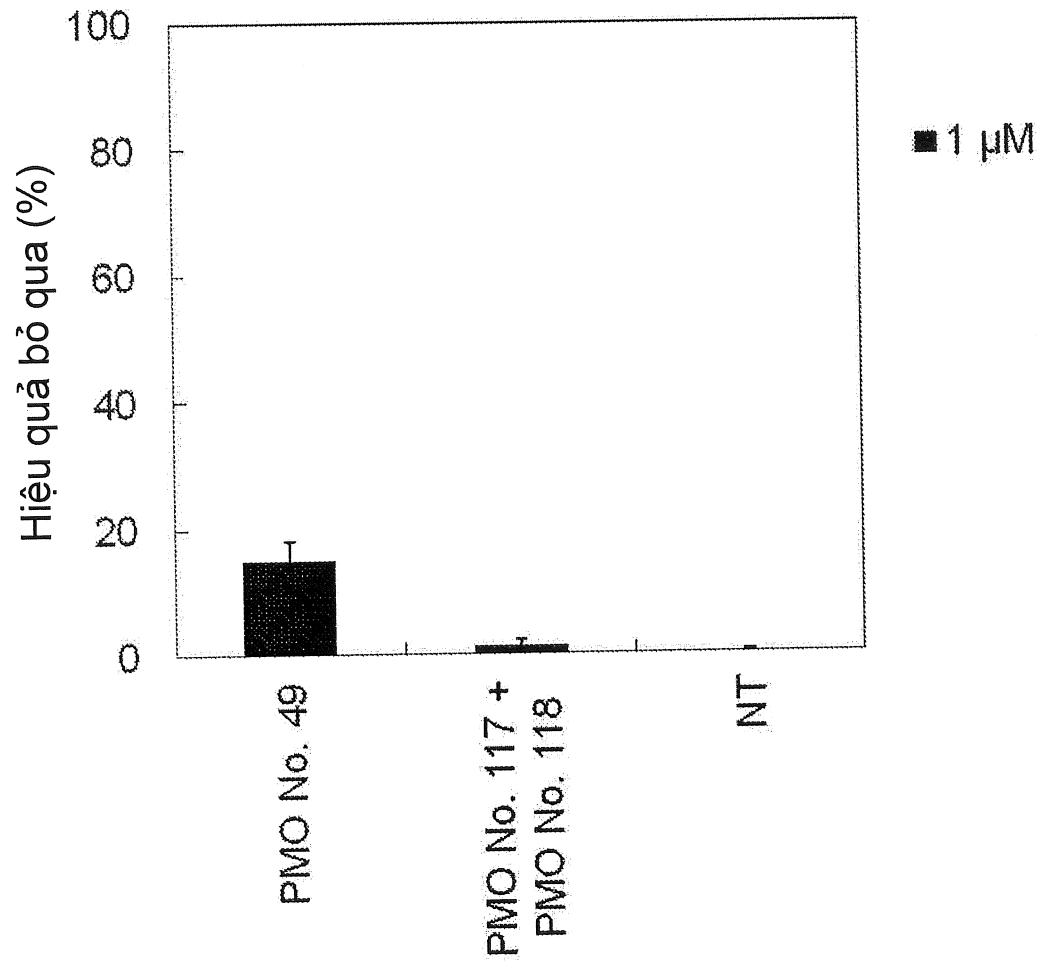
[FIG. 26]



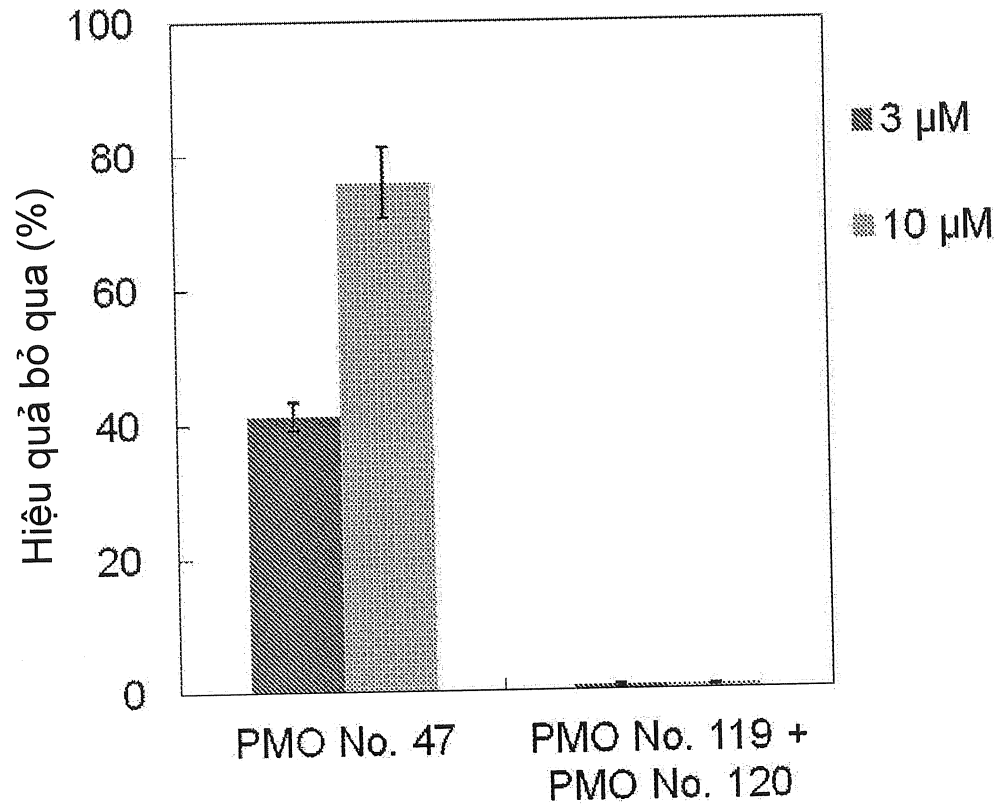
[FIG. 27]



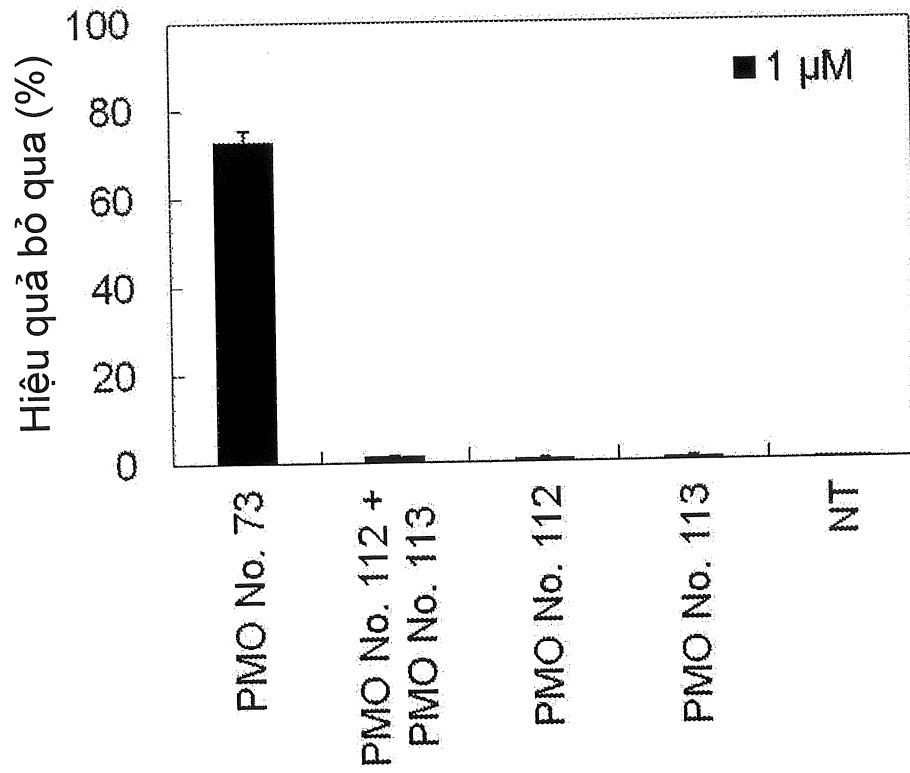
[FIG. 28]



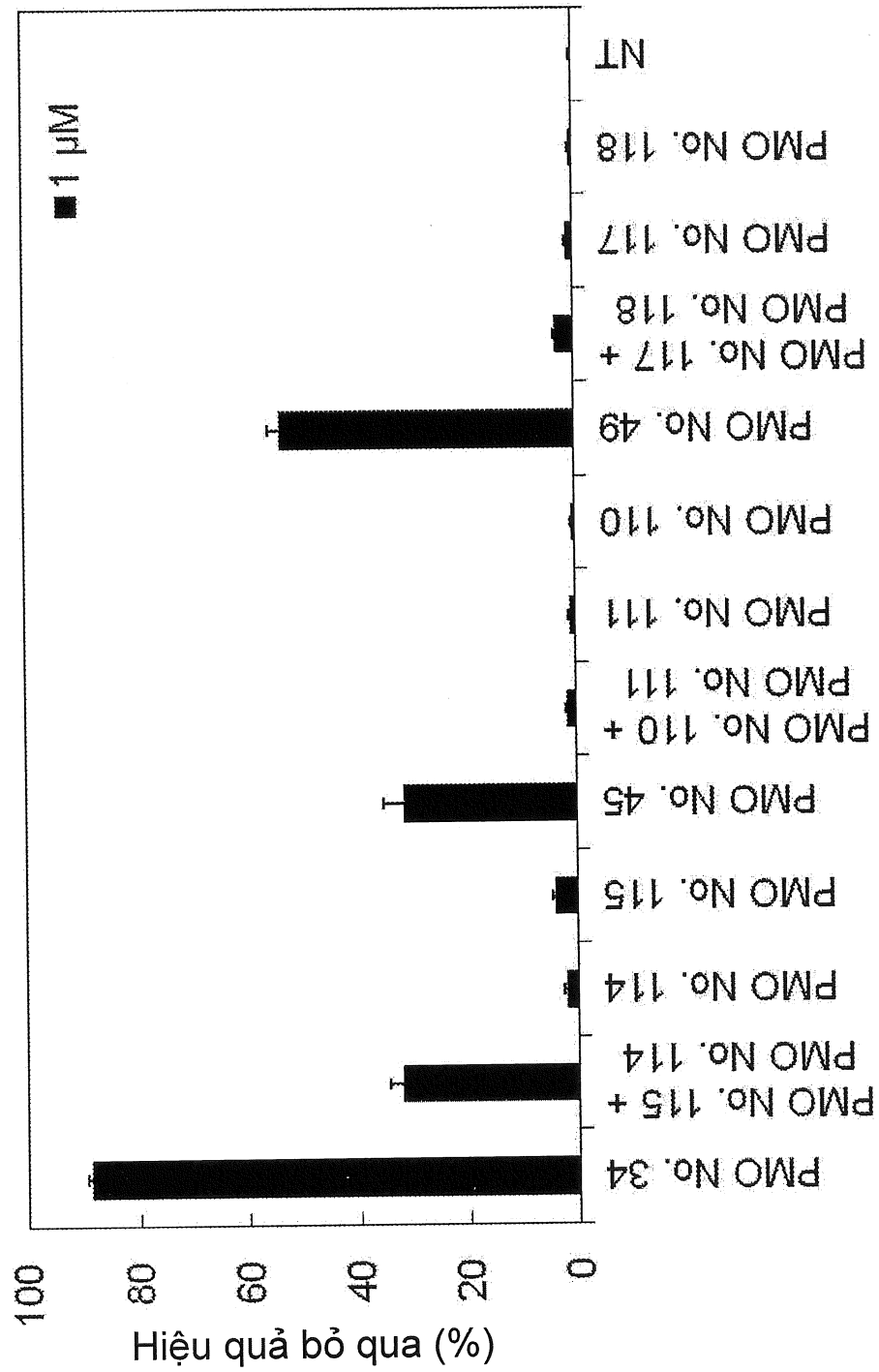
[FIG. 29]



[FIG. 30]



[FIG. 31]



[FIG. 32]

