



(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)



1-0031720

(51)⁸ C12N 15/113; A61K 48/00; C07H
21/04; A61K 31/712; A61P 21/00

(13) B

(21) 1-2018-01427

(22) 15/09/2016

(86) PCT/JP2016/077305 15/09/2016

(87) WO2017/047707 23/03/2017

(30) 2015-182145 15/09/2015 JP

(45) 25/04/2022 409

(43) 25/09/2018 366A

(73) 1. NIPPON SHINYAKU CO., LTD. (JP)

14, Kisshoin Nishinosho Monguchicho, Minami-ku, Kyoto-shi, Kyoto 6018550,
Japan

2. NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY (JP)

1-1, Ogawahigashi-cho 4-chome, Kodaira-shi, Tokyo 1878551, Japan

(72) ENYA Yukiko (JP); TONE Yuichiro (JP); TAKEDA Shin'ichi (JP); AOKI
Yoshitsugu (JP).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

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

(57) Sáng chế đề cập đến oligome đối nghĩa mà cho phép sự bỏ qua exon 45 ở gen dystrophin người. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các dược phẩm chứa oligome này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến oligome đối nghĩa mà cho phép bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người, và được phẩm chứa oligome này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne (Duchenne muscular dystrophy - DMD) là bệnh cơ tiến triển di truyền với tỷ lệ mắc phải cao nhất mà xảy ra với tần xuất khoảng một trên 3500 bé trai sơ sinh. Trong thời kỳ bú mẹ, các bệnh nhân DMD hầu hết thể hiện chức năng vận động giống như trẻ bình thường, nhưng chúng thể hiện các dấu hiệu yếu cơ ở độ tuổi khoảng 4 đến 5 tuổi. Sau đó chứng yếu cơ của chúng tiến triển đến mức mất khả năng đi lại cho đến độ tuổi khoảng 12 tuổi và cuối cùng dẫn đến tử vong ở độ tuổi hai mươi do suy tim hoặc suy hô hấp. DMD là một bệnh nghiêm trọng. Hiện tại, không có liệu pháp hữu hiệu đối với DMD, và do đó sự phát triển các tác nhân trị liệu mới là cực kỳ cần thiết.

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 này được phiên mã thành tiền chất mARN và tiếp theo được cắt nối để loại bỏ các intron, do đó dẫn đến mARN gồm 79 exon được liên kết với nhau, mà có chiều dài là 13.993 bazơ. mARN này được dịch mã thành 3.685 axit amin để tạo thành protein dystrophin. Protein dystrophin có liên quan đến sự duy trì tính ổn định màng của các tế bào cơ và là cần thiết để khiến cho các tế bào cơ ít bị thương tổn đến mức phá hủy. Các bệnh nhân DMD có đột biến ở gen dystrophin và do đó hầu hết là thể hiện không có sự biểu hiện protein dystrophin chức năng trong các tế bào cơ của họ. Vì lý do này, trong cơ thể các bệnh nhân DMD, các tế bào cơ có thể không còn giữ cấu trúc của chúng và rất nhiều ion canxi chảy vào trong các tế bào cơ. Kết quả là, phản ứng tương tự như phản ứng viêm sẽ diễn ra để thúc đẩy sự xơ hóa, do đó các tế bào cơ rất khó phục hồi.

Chứng loạn dưỡng cơ Becker (Becker Muscular Dystrophy - BMD) cũng được

gây ra bởi sự đột biến trong gen dystrophin. Triệu chứng của nó là sự yếu cơ được thấy, nhưng thường nhẹ hơn và tiến triển chậm hơn so với DMD, do đó BMD phát triển ở thời kỳ trưởng thành trong hầu hết các trường hợp. Các khác biệt về các triệu chứng lâm sàng giữa DMD và BMD thể hiện là phát sinh từ việc liệu các đột biến phá vỡ hay duy trì khung đọc axit amin trong quá trình dịch mã từ mARN dystrophin thành protein dystrophin (tài liệu phi sáng chế 1). Cụ thể là, các bệnh nhân DMD thể hiện hầu hết là không có sự biểu hiện protein dystrophin chức năng vì có sự đột biến gây ra sự biến đổi khung đọc axit amin, trong khi đó ở các bệnh nhân BMD, sự đột biến gây ra sự xóa bỏ một số exon nhưng khung đọc axit amin vẫn được duy trì, do đó sản sinh ra protein dystrophin chức năng mặc dù không hoàn thiện.

Về liệu pháp đối với DMD, liệu pháp bỏ qua exon là liệu pháp có nhiều triển vọng. Liệu pháp này liên quan đến sự cải biến cắt nối để khôi phục khung đọc axit amin trong mARN dystrophin, nhờ đó gây cảm ứng sự biểu hiện của protein dystrophin có chức năng được khôi phục một phần (tài liệu phi sáng chế 2). Các vùng trình tự axit amin được hướng đích bởi sự bỏ qua exon được xóa bỏ trong liệu pháp này. Vì lý do này, protein dystrophin được biểu hiện trong liệu pháp này là ngắn hơn protein bình thường, nhưng giữ lại một phần chức năng ổn định hóa các tế bào cơ vì khung đọc axit amin được duy trì. Do đó, việc bỏ qua exon được trông đợi là cho phép DMD thể hiện các triệu chứng nhẹ hơn giống như được thấy ở BMD. Liệu pháp bỏ qua exon này hiện đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng ở các bệnh nhân DMD sau khi thử nghiệm trên chuột nhắt và chó.

Sự bỏ qua exon có thể được cảm ứng bằng sự gắn kết của các axit nucleic đối nghĩa được định hướng đối nghịch ở hoặc cả hai vị trí cắt nối 5' và 3' hoặc đối nghịch các trình tự bên trong exon. Exon được chứa trong mARN chỉ khi cả hai vị trí cắt nối của nó được nhận diện bởi phức hợp thể cắt nối. Do đó, sự bỏ qua exon có thể được cảm ứng khi các vị trí cắt nối được hướng đích bằng các axit nucleic đối nghĩa. Hơn nữa, để cảm ứng sự nhận diện exon bằng cơ chế cắt nối, các protein SR giàu serin và arginin sẽ được yêu cầu gắn kết với các vùng trình tự tăng cường exon (exon splicing enhancer -

ESE); và do đó sự bỏ qua exon cũng có thể được cảm ứng khi hướng đích vào các ESE. Các bệnh nhân DMD có sự đột biến khác nhau trong gen dystrophin của họ, và do đó các axit nucleic đối nghĩa khác nhau là cần thiết tùy thuộc vào vị trí và loại đột biến gen. Có một số báo cáo về axit nucleic đối nghĩa được thiết kế để gây cảm ứng bỏ qua exon đối với một exon duy nhất trong gen dystrophin bằng cách hướng đích trình tự liên tục duy nhất (các tài liệu sáng chế 1 đến 6, cũng như các tài liệu phi sáng chế 1 và 2). Ngoài ra, có báo cáo thể hiện rằng nếu hai axit nucleic đối nghĩa khác nhau mà được hướng đối nghịch với cùng một exon trong gen dystrophin được cho phép hoạt động trong hỗn hợp (hướng đích kép), thì hoạt tính bỏ qua có thể được tăng cường so với khi mỗi axit nucleic đối nghĩa được sử dụng một mình (tài liệu sáng chế 7).

Tuy nhiên, không có báo cáo nào thể hiện rằng các axit nucleic đối nghĩa sợi đơn được kết nối được hướng đối nghịch với hai hoặc nhiều vị trí trong cùng exon (tức là, axit nucleic đối nghĩa thuộc loại kết nối) có thể hiện hoạt tính bỏ qua.

Các tài liệu về tình trạng kỹ thuật

Các tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO2004/048570

Tài liệu sáng chế 2: WO2009/139630

Tài liệu sáng chế 3: WO2010/048586

Tài liệu sáng chế 4: US2010/0168212

Tài liệu sáng chế 5: WO2011/057350

Tài liệu sáng chế 6: WO2006/000057

Tài liệu sáng chế 7: WO2007/135105

Các 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 như được mô tả trên đây, mục đích chính của sáng chế là đề xuất oligome đối nghĩa mới thuộc loại được kết nối mà được thiết kế để cảm ứng sự bỏ qua exon bằng cách hướng đích hai trình tự nucleotit riêng biệt trong cùng exon của gen dystrophin, và tác nhân điều trị bệnh loạn dưỡng cơ chứa oligome này.

Biện pháp giải quyết vấn đề

Là kết quả của các nghiên cứu chi tiết về các nội dung kỹ thuật được nêu trong các tài liệu trên đây và về cấu trúc của gen dystrophin, v.v., các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng các oligome được định hướng đối nghịch với hai vị trí riêng biệt trong exon 45 của gen dystrophin người được kết nối với nhau và oligome đối nghĩa thu được có thể cảm ứng sự bỏ qua exon này. Các tác giả sáng chế đã hoàn thành sáng chế trên cơ sở phát hiện này.

Cụ thể, sáng chế là như sau.

[1] Oligome đối nghĩa có độ dài từ 14 đến 32 bazơ gồm hai oligome đơn vị được kết nối với nhau được chọn từ nhóm gồm từ oligome (a) đến oligome (e) được thể hiện dưới đây, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó, trong đó hai oligome đơn vị này là không tiếp giáp nhau và không chồng lấn với nhau:

(a) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí -5 đến 15 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người;

(b) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí 48 đến 70 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người;

(c) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí 128 đến 150 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người;

(d) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí 15 đến 40 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người; và

(e) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí 110 đến 125 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người.

[2] Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm [1] trên đây, trong đó một trong số hai oligome đơn vị này là oligome (a).

[3] Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm [1] hoặc [2] trên đây, mà gồm một trình tự nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 7 đến 12, 14 đến 33, 40 đến 52, 57, 64, 65 và 79 đến 86.

[4] Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] hoặc [3] trên đây, mà gồm một trình tự nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 8, 10, 25, 30, 33, 79 và 80.

[5] Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [4] trên đây, mà là oligonucleotit.

[6] Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm [5] trên đây, trong đó ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit được cải biến ở gốc đường và/hoặc ở gốc liên kết phosphat.

[7] Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm [5] hoặc [6] trên đây, trong đó gốc đường của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit là riboza trong đó nhóm -OH ở vị trí số 2' được thay thế bằng nhóm bất kỳ được chọn từ 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 alkyl).

[8] Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm [6] hoặc [7] trên đây, trong đó gốc liên kết phosphat của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit là gốc được chọn từ nhóm bao gồm liên kết phosphorothioat, liên kết phosphorodithioat, liên kết alkylphosphonat, liên kết phosphoroamidat và liên kết boranophosphat.

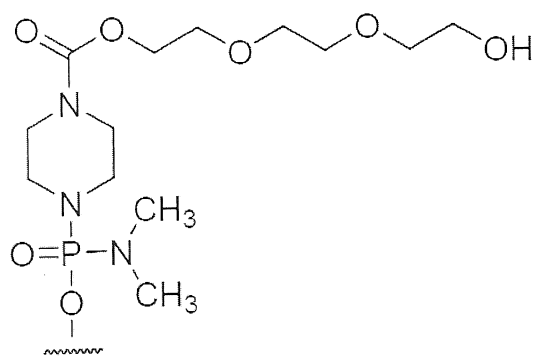
[9] Oligome đối nghĩa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [4] trên đây, mà là morpholino oligome, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[10] Oligome đối nghĩa theo điểm [9] trên đây, mà là phosphorodiamidat morpholino oligome, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

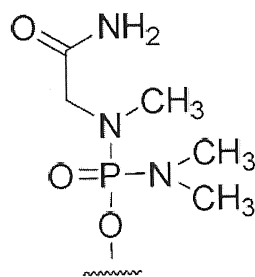
[11] Oligome đối nghĩa theo điểm [4] trên đây, mà là phosphorodiamidat morpholino oligome, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[12] Oligome đối nghĩa theo điểm bất kỳ trong số các điểm [9] đến [11] trên đây, trong đó đầu tận cùng 5' của nó là nhóm bất kỳ thuộc các nhóm được biểu thị bằng các công thức hóa học (1) đến (3) được thể hiện dưới đây, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[Công thức 1]



(1)



(2)



(3)

[13] Dược phẩm để điều trị bệnh loạn dưỡng cơ, dược phẩm này chứa oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [12] trên đây làm thành phần hoạt tính.

[14] Dược phẩm theo điểm [13] trên đây, trong đó dược phẩm này còn chứa chất mang

được dụng.

[15] Phương pháp điều trị bệnh loạn dưỡng cơ, bao gồm bước cho bệnh nhân bị bệnh 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] trên đây hoặc được phẩm theo điểm [13] hoặc [14] trên đây.

[16] Phương pháp điều trị theo điểm [15] trên đây, trong đó bệnh nhân bị bệnh loạn dưỡng cơ là bệnh nhân có sự đột biến cần được hướng đích bằng sự bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin.

[17] Phương pháp điều trị theo điểm [15] hoặc [16] trên đây, trong đó bệnh nhân là người bệnh.

[18] 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] trên đây trong sản xuất được phẩm để điều trị bệnh loạn dưỡng cơ.

[19] Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [12] trên đây, để sử dụng trong điều trị bệnh loạn dưỡng cơ.

[20] Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm [19] trên đây, trong đó trong quá trình điều trị, bệnh nhân bị loạn dưỡng cơ có sự đột biến cần được hướng đích bằng việc bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin.

[21] Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm [19] hoặc [20] trên đây, trong đó bệnh nhân là người bệnh.

Hiệu quả của sáng chế

Oligome đối nghĩa theo sáng chế cho phép cảm ứng hiệu quả sự bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người. Ngoài ra, được phẩm theo sáng chế, khi được dùng, sẽ cho phép làm thuyên giảm hiệu quả các triệu chứng của bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne. Các exon được xóa bỏ trong các bệnh nhân cần được hướng đích gồm các exon 18-44, 44, 46, 46-47, 46-48, 46-49, 46-51, 46-53, v.v.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.2 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.3 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.4 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.5 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.6 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân (các tế bào RD).

Fig.7 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.8 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.9 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân (các tế bào RD).

Fig.10 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.11 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.12 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân (các tế bào RD).

Fig.13 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của

người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.14 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.15 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân (các tế bào RD).

Fig.16 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.17 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.18 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân (các tế bào RD).

Fig.19 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.20 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.21 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân (các tế bào RD).

Fig.22 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.23 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig.24 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân (các tế bào RD).

Fig.25 là biểu đồ thể hiện hiệu suất bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người ở các tế bào sarcoma cơ vân của người (các tế bào RD).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Các phương án sau được minh họa để mô tả sáng chế, và không được dự định để giới hạn sáng chế chỉ ở các phương án này. Sáng chế có thể được thực hành theo nhiều cách khác nhau mà không chệch khỏi tinh thần của sáng chế.

Cần lưu ý rằng tất cả các công bố được viện dẫn trong bản mô tả, bao gồm các tài liệu về giải pháp kỹ thuật đã biết, các công báo sáng chế và các tài liệu patent khác, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Hơn nữa, phần mô tả kết hợp các nội dung được bộc lộ trong phần mô tả và các hình vẽ của đơn yêu cầu cấp Patent Nhật số 2015-182145 (nộp ngày 15 tháng 9 năm 2015), sáng chế yêu cầu được hưởng quyền ưu tiên dựa trên đơn này.

1. Oligome đối nghĩa

Sáng chế đề xuất oligome đối nghĩa mà cho phép bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó (dưới đây được gọi chung là “oligome theo sáng chế”).

[Exon 45 trong gen dystrophin của người]

Trong văn cảnh của sáng chế, thuật ngữ “gen” được dự tính là không chỉ gồm gen thuộc hệ gen, mà còn bao gồm cADN, tiền chất mARN, và mARN. Gen này tốt hơn là tiền chất mARN, tức là, pre-mARN.

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 trong gen dystrophin của người chỉ gồm 14kb và được phân bố trên 79 exon trong gen dystrophin (Roberts, RG. et al., Genomics, 16: 536-538 (1993)). Pre-mARN mà được phiên mã từ gen dystrophin của người được cắt nối để tạo ra mARN trưởng thành gồm 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 45 trong gen dystrophin kiểu đại của người được thể hiện trong SEQ ID NO: 13. Hơn nữa, trong trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 13) của exon

45 trong gen dystrophin kiểu đại của người, trình tự bao gồm các bazơ ở các vị trí -5 đến 15 tính từ đầu tận cùng 5' được thể hiện trong SEQ ID NO: 3. Tương tự, trình tự gồm các bazơ ở các vị trí 48 đến 70, trình tự gồm các bazơ ở các vị trí 128 đến 150, trình tự gồm các bazơ ở các vị trí 15 đến 40 và trình tự gồm các bazơ ở các vị trí 110 đến 125 lần lượt được thể hiện trong các SEQ ID NO: 4 đến 6 và 143.

Oligome theo sáng chế hiện đã được điều chế để gây ra sự bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người nhằm mục đích cải biến protein được mã hóa bởi gen dystrophin DMD thành protein dystrophin BMD. Do đó, exon 45 trong gen dystrophin cần được bỏ qua bằng oligome theo sáng chế không chỉ gồm dạng kiểu đại mà còn gồm dạng đột biến.

Cụ thể hơn, exon 45 đột biến trong gen dystrophin của người hoặc một phần của nó là polynucleotit được thể hiện trong công thức (I) hoặc (II) dưới đây:

(I) polynucleotit có khả năng lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với polynucleotit gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 143; hoặc

(II) polynucleotit gồm trình tự nucleotit có mức độ tương đồng bằng hoặc lớn hơn 90% so với trình bất kỳ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 143.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit” được dự định để chỉ ADN hoặc ARN.

Như được sử dụng ở đây, việc biểu thị “polynucleotit có khả năng lai trong các điều kiện nghiêm ngặt” được dự định để chỉ, ví dụ, polynucleotit mà có thể thu được bằng cách lai khuôn lạc, lai vết tan, lai Southern hoặc các kỹ thuật lai khác bằng cách sử dụng mẫu dò là toàn bộ hoặc một phần của polynucleotit chứa trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 143. Để lại, có thể sử

dụng các kỹ thuật được mô tả trong tài liệu, ví dụ, "Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001" và "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997."

Như được sử dụng ở đây, việc biểu thị “trình tự nucleotit bổ trợ” là không chỉ giới hạn ở trình tự nucleotit tạo thành các cặp Watson-Crick với trình tự nucleotit đích mà còn gồm các trình tự nucleotit tạo thành các cặp bazơ linh hoạt với trình tự nucleotit đích. Về vấn đề này, cặp Watson-Crick được dự định để chỉ cặp bazơ mà tạo thành liên kết hydro giữa adenin và thymin, giữa adenin và uracil hoặc giữa guanin và xytosin, trong khi đó cặp bazơ linh hoạt được dự định để chỉ cặp bazơ mà tạo thành liên kết hydro giữa guanin và uracil, giữa inosin và uracil, giữa inosin và adenin hoặc giữa inosin và xytosin. Hơn nữa, “trình tự nucleotit bổ trợ” này không nhất thiết phải có mức độ bổ trợ 100% với trình tự nucleotit đích và có thể chứa các bazơ không bổ trợ (ví dụ, 1 đến 3 bazơ, 1 hoặc 2 bazơ, hoặc một bazơ duy nhất) cho trình tự nucleotit đích.

Như được sử dụng ở đây, 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 và các điều kiện nghiêm ngặt cao. “Các điều kiện nghiêm ngặt thấp” được dùng để chỉ, ví dụ, các điều kiện $5 \times \text{SSC}$, $5 \times$ dung dịch Denhardt, 0,5% SDS, 50% formamit ở 32°C . Tương tự, “các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải” được dùng để chỉ, ví dụ, các điều kiện $5 \times \text{SSC}$, $5 \times$ dung dịch Denhardt, 0,5% SDS, 50% formamit ở 42°C hoặc các điều kiện $5 \times \text{SSC}$, 1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50% formamit ở 42°C . “Các điều kiện nghiêm ngặt cao” được dùng để chỉ, ví dụ, các điều kiện $5 \times \text{SSC}$, $5 \times$ dung dịch Denhardt, 0,5% SDS, 50% formamit ở 50°C hoặc các điều kiện $0,2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS ở 65°C . Trong các điều kiện này, có thể trông đợi thu được một cách hiệu quả hơn polynucleotit có độ tương đồng cao hơn ở nhiệt độ cao hơn. Tuy nhiên, độ nghiêm ngặt của phép lai có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, bao gồm nhiệt độ, nồng độ mẫu dò, độ dài mẫu dò, lượng ion, thời gian phản ứng, nồng độ muối và v.v.. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ có thể đạt được cùng độ nghiêm ngặt bằng cách chọn các yếu tố này cho thích hợp.

Cần lưu ý rằng nếu sử dụng kit có bán trên thị trường để lai, có thể sử dụng hệ thống phát hiện và đánh dấu trực tiếp Alkphos (GE Healthcare) cho mục đích này, chẳng hạn. Trong trường hợp này, phép lai có thể được thực hiện theo quy trình kèm theo kit, tức là, sau khi màng được ủ qua đêm với mẫu dò được đánh dấu và sau đó được rửa bằng dung dịch đệm rửa sơ cấp chứa SDS 0,1% (khối lượng/thể tích) ở 55°C, polynucleotit đã lai có thể được phát hiện. Theo cách khác, nếu dùng chất phản ứng có bán trên thị trường (ví dụ, hỗn hợp đánh dấu PCR (Roche Diagnostics)) để đánh dấu digoxigenin (DIG) đối với mẫu dò trong khi chuẩn bị mẫu dựa trên toàn bộ hoặc một phần trình tự nucleotit hỗ trợ cho trình tự nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 143 hoặc được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 143, thì kit phát hiện axit nucleic DIG (Roche Diagnostics) có thể được sử dụng để phát hiện phép lai.

Ngoài các polynucleotit được liệt kê trên đây, các polynucleotit có khả năng lai khác bao gồm các polynucleotit có độ tương đồng là 90% hoặc lớn hơn, 91% hoặc lớn hơn, 92% hoặc lớn hơn, 93% hoặc lớn hơn, 94% hoặc lớn hơn, 95% hoặc lớn hơn, 96% hoặc lớn hơn, 97% hoặc lớn hơn, 98% hoặc lớn hơn, 99% hoặc lớn hơn, 99,1% hoặc lớn hơn, 99,2% hoặc lớn hơn, 99,3% hoặc lớn hơn, 99,4% hoặc lớn hơn, 99,5% hoặc lớn hơn, 99,6% hoặc lớn hơn, 99,7% hoặc lớn hơn, 99,8% hoặc lớn hơn, hoặc 99,9% hoặc lớn hơn so với trình tự gồm polynucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 143, như được tính bởi phần mềm tra cứu mức độ đồng nhất BLAST sử dụng các thông số mặc định.

Cần lưu ý rằng độ tương đồng của các trình tự nucleotit có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của Karlin và Altschul, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990; Proc Natl Acad Sci USA 90: 5873, 1993). Dựa trên thuật toán BLAST, các chương trình gọi là BLASTN và BLASTX đã được phát triển (Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990). Nếu sử

dùng BLASTN để phân tích trình tự nucleotit thì các thông số có thể được đặt, chẳng hạn, điểm = 100 và độ dài từ = 12. Nếu sử dụng các chương trình BLAST và Gapped BLAST, có thể dùng các thông số mặc định trong mỗi chương trình này.

Theo phương án nhất định, oligome theo sáng chế là oligome đối nghĩa có độ dài 14 đến 32 bazơ gồm hai oligome đơn vị đã kết nối được chọn từ nhóm bao gồm các oligome (a) đến (e) được thể hiện dưới đây, hoặc muối được dùng hoặc hydrat của nó:

- (a) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí -5 đến 15 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người;
- (b) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí 48 đến 70 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người;
- (c) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí 128 đến 150 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người;
- (d) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí 15 đến 40 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người; và
- (e) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí 110 đến 125 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người.

Mỗi oligome đơn vị (a) đến (e) nêu trên (dưới đây còn đơn giản được gọi là “các đơn vị”) có kích thước chiều dài là 7 đến 16 bazơ, tốt hơn là 8 đến 16 bazơ, tốt hơn nữa là 9 đến 16 bazơ. Các đơn vị tương ứng có thể có kích thước giống hoặc khác nhau.

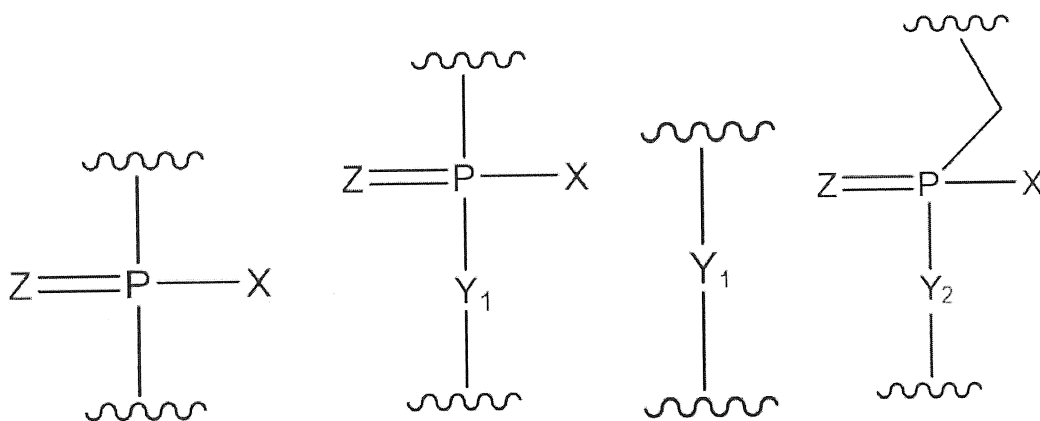
Hơn nữa, nếu hai oligome đơn vị được chọn từ nhóm gồm các oligome (a) đến (e), thì hai oligome đơn vị này có thể là kết hợp của các đơn vị giống nhau (tức là, (a) và (a), (b) và (b), (c) và (c), (d) và (d), hoặc (e) và (e)) hoặc có thể là kết hợp của các

đơn vị khác nhau, nhưng tốt hơn là kết hợp của các đơn vị khác nhau. Ví dụ, nếu (a) được chọn là một đơn vị thì đơn vị còn lại tốt hơn là đơn vị bất kỳ trong số các đơn vị (b) đến (e). Tương tự, nếu (b) được chọn là một đơn vị, thì đơn vị còn lại tốt hơn là (a), (c), (d) hoặc (e), trong khi nếu (c) được chọn là một đơn vị thì đơn vị còn lại được chọn là một đơn vị mà tốt hơn là (a), (b), (d) hoặc (e).

Nếu hai đơn vị được chọn từ các đơn vị (a) đến (e), thì một trong hai đơn vị được chọn này có thể nằm ở phía đầu tận cùng 5'. Nếu (a) và (b) được chọn thì đơn vị (a) tốt hơn là được kết nối với phía đầu tận cùng 3'. Nếu (b) và (c) được chọn thì đơn vị (b) tốt hơn là được kết nối với phía đầu tận cùng 3'. Nếu (a) và (c) được chọn thì đơn vị (a) tốt hơn là được kết nối với phía đầu tận cùng 3'. Nếu (a) và (d) được chọn thì đơn vị (a) tốt hơn là được kết nối với phía đầu tận cùng 3'. Nếu (a) và (e) được chọn thì đơn vị (a) tốt hơn là được kết nối với phía đầu tận cùng 3'.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được kết nối” được dự định có nghĩa là hai đơn vị được chọn từ (a) đến (e) được kết nối trực tiếp với nhau. Cụ thể là, nếu hai đơn vị được kết nối thì có nghĩa là đầu tận cùng 3' của đơn vị nằm ở phía tận cùng 5' và đầu tận cùng 5' của đơn vị nằm ở phía tận cùng 3' tạo thành liên kết phosphat hoặc nhóm bất kỳ trong số các nhóm dưới đây:

[Công thức 2]



(trong đó X là -OH, -CH₂R¹, -O-CH₂R¹, -S-CH₂R¹, -NR²R³ hoặc F;

R¹ là H hoặc alkyl;

R^2 và R^3 , mà giống hoặc khác nhau, mỗi nhóm này là H, alkyl, xycloalkyl hoặc aryl;

Y_1 biểu diễn O, S, CH_2 hoặc NR^1 ;

Y_2 là O, S hoặc NR^1 ; và

Z là O hoặc S).

Việc biểu thị “cho phép sự bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin của người” được dự định có nghĩa là khi gắn kết oligome theo sáng chế vào vị trí tương ứng với exon 45 trong thể phiên mã (ví dụ, pre-mARN) của gen dystrophin của người, thể phiên mã này được cắt nối để thiết lập sự kết nối giữa bazơ tương ứng với đầu tận cùng 3' của exon 43 và bazơ tương ứng với đầu tận cùng 5' của exon 46 trong trường hợp bệnh nhân DMD có sự xóa bỏ exon 44, ví dụ, để nhờ đó tạo thành mARN trưởng thành không chứa sự dịch chuyển khung codon.

Thuật ngữ “gắn kết” được sử dụng ở đây có nghĩa là khi oligome theo sáng chế đã được trộn với thể phiên mã của gen dystrophin của người, thì cả hai sẽ được lai với nhau trong các điều kiện sinh lý để tạo thành phức kếp. Việc biểu thị “trong các điều kiện sinh lý” được sử dụng ở đây để chỉ các điều kiện được điều chỉnh để phỏng theo độ pH, thành phần muối và nhiệt độ *in vivo*, như được minh họa bằng các điều kiện nhiệt độ 25°C đến 40°C, tốt hơn là 37°C, độ pH từ 5 đến 8, tốt hơn là độ pH bằng 7,4, và nồng độ muối natri clorua là 150 mM.

Để xác nhận liệu sự bỏ qua exon 45 có được gây ra trong gen dystrophin của người hay không, oligome theo sáng chế có thể được chuyển nhiễm vào trong các tế bào biểu hiện dystrophin (ví dụ, các tế bào sarcoma cơ vân của người) và vùng xung quanh exon 45 trong mARN của gen dystrophin của người có thể được khuếch đại bằng RT-PCR từ ARN toàn bộ của các tế bào biểu hiện dystrophin nêu trên, sau đó bằng PCR lỏng hoặc phân tích giải trình tự trên sản phẩm khuếch đại. Hiệu suất bỏ qua có thể được xác định như sau: mARN của gen dystrophin của người được thu gom từ các tế bào thử nghiệm và mARN được đo mức polynucleotit “A” trong dải với sự bỏ qua exon 45 và

mức polynucleotit “B” trong dải mà không có sự bỏ qua exon 45, sau đó là tính toán trên cơ sở các giá trị đo được “A” và “B” này theo phương trình sau.

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

Oligome theo sáng chế tốt hơn là gây ra sự bỏ qua exon 45 với hiệu suất 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.

Để tính hiệu suất bỏ qua, có thể tham khảo WO2012/029986.

Oligome theo sáng chế có thể được ví dụ bằng oligonucleotit, morpholino oligome hoặc axit nucleic peptit (PNA) oligome, mỗi oligome này có độ dài từ 14 đến 32 bazơ. Oligome theo sáng chế tốt hơn là có độ dài 16 đến 30 bazơ, 17 đến 30 bazơ, 18 đến 30 bazơ, 19 đến 30 bazơ, 20 đến 30 bazơ, 20 đến 29 bazơ, 20 đến 28 bazơ, 20 đến 27 bazơ, 20 đến 26 bazơ hoặc 21 đến 26 bazơ, và tốt hơn là morpholino oligome.

Oligonucleotit nêu trên (dưới đây được gọi là “oligonucleotit theo sáng chế”) là oligome theo sáng chế, mà đơn vị cấu thành của nó là nucleotit, và nucleotit này có thể là nucleotit bất kỳ trong số ribonucleotit, deoxyribonucleotit hoặc nucleotit cải biến.

Nucleotit cải biến được dùng để chỉ ribonucleotit hoặc deoxyribonucleotit mà nucleobazơ, gốc đường và gốc liên kết phosphat của nó được cải biến toàn bộ hoặc được cải biến một phần.

Ví dụ về nucleobazơ bao gồm adenin, guanin, hypoxanthin, xytosin, thymine, uracil, hoặc các bazơ cải biến của chúng. Các bazơ cải biến này có thể được ví dụ bằng pseudouracil, 3-methyluracil, dihydrouracil, các 5-alkylxytosin (ví dụ, 5-methylxytosin), các 5-alkyluracil (ví dụ, 5-ethyluracil), các 5-halouracil (ví dụ, 5-bromouracil), 6-azapyrimidin, các 6-alkylpyrimidin (ví dụ, 6-methyluracil), 2-thiouracil, 4-thiouracil, 4-axetylxytosin, 5-(carboxyhydroxymetyl)uracil, 5'-carboxymethylaminometyl-2-thiouracil, 5-carboxymethylaminometyluracil, 1-metyladenin, 1-methylhypoxanthin, 2,2-dimethylguanin, 3-methylxytosin, 2-metyladenin, 2-methylguanin, N6-metyladenin, 7-methylguanin, 5-metoxymethylaminometyl-2-thiouracil, 5-methylaminometyluracil, 5-

methylcarbonylmethyluracil, 5-metyloxyuracil, 5-metyl-2-thiouracil, 2-metylthio-N6-isopentenyladenin, axit uracil-5-oxyaxetic, 2-thioxytosin, purin, 2,6-diaminopurin, 2-aminopurin, isoguanin, indol, imidazol, xanthin v.v., nhưng không chỉ giới hạn ở các hợp chất này.

Các cải biến đối với gốc đường có thể được ví dụ bằng các cải biến ở vị trí 2' của riboza và các cải biến ở các vị trí khác của đường. Các ví dụ về các cải biến ở vị trí 2' của riboza bao gồm các cải biến được dự tính để thay thế nhóm -OH ở vị trí 2' của riboza bằng 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.

Các ví dụ về các cải biến ở các vị trí khác của đường bao gồm sự thay thế O bằng S ở vị trí 4' của riboza hoặc deoxyriboza, và sự tạo cầu nối giữa các vị trí 2' và 4' của đường, ví dụ như bằng các LNA (locked nucleic acids: các axit nucleic bị khóa) hoặc các ENA (2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids: các axit nucleic được tạo cầu nối bằng 2'-O,4'-C-etylen), nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Các cải biến đối với gốc liên kết phosphat có thể được ví dụ bằng các cải biến được dự tính để thay thế liên kết phosphodiester bằng liên kết phosphorothioat, liên kết phosphorodithioat, liên kết alkylphosphonat, liên kết phosphoroamidat hoặc liên kết boranophosphat (Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (xem, ví dụ, JP WO2006/129594 và JP WO2006/038608).

Alkyl tốt hơn là alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Cụ thể hơn là, ví dụ gồm methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, n-pentyl, isopentyl, neopentyl, tert-pentyl, n-hexyl và isohexyl. Alkyl này có thể được thế bằng 1 đến 3 nhóm thế gồm halogen, alkoxy, xyano, nitro, v.v.

Xycloalkyl tốt hơn là xycloalkyl chứa 5 đến 12 nguyên tử cacbon. Cụ thể hơn là, các ví dụ gồm xyclopentyl, xyclohexyl, xycloheptyl, xyclooctyl, xyclodexyl và xyclododexyl.

Các halogen gồm flo, clo, brom và iot.

Alkoxy có thể là alkoxy mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa 1 đến 6 nguyên tử cacbon, như được ví dụ bằng metoxy, etoxy, n-propoxy, isopropoxy, n-butoxy, isobutoxy, sec-butoxy, tert-butoxy, n-pentyloxy, isopentyloxy, n-hexyloxy, isohexyloxy v.v.. Đặc biệt được ưu tiên là alkoxy chứa 1 đến 3 nguyên tử cacbon.

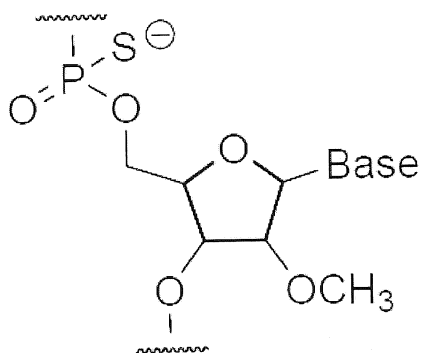
Aryl tốt hơn là aryl chứa 6 đến 10 nguyên tử cacbon. Cụ thể hơn là, các ví dụ bao gồm phenyl, α -naphtyl và β -naphtyl. Đặc biệt được ưu tiên là phenyl. Aryl này có thể được thế bằng 1 đến 3 nhóm thế bao gồm alkyl, halogen, alkoxy, xyano, nitro, v.v.

Alkylen tốt hơn là alkylen mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Cụ thể hơn là, các ví dụ bao gồm metylen, etylen, trimetylen, tetrametylen, pentametylen, hexametylen, 2-(etyl)trimetylen và 1-(metyl)tetrametylen.

Axyl có thể là alkanoyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh hoặc aroyl. Các ví dụ về alkanoyl này bao gồm formyl, axetyl, 2-metylaxetyl, 2,2-dimetylaxetyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, pentanoyl, 2,2-dimetylpropionyl, hexanoyl v.v. Các ví dụ về aroyl bao gồm benzoyl, toluoyl và naphtoyl. Aroyl này có thể được thế ở vị trí bất kỳ có thể thế được và có thể được thế bằng (các) alkyl.

Oligonucleotit theo sáng chế tốt hơn là oligome theo sáng chế trong đó đơn vị cấu thành của nó là nhóm được biểu thị bằng công thức chung dưới đây, trong đó nhóm -OH ở vị trí 2' của riboza được thế bằng metoxy và gốc liên kết phosphat là liên kết phosphorothioat:

[Công thức 3]

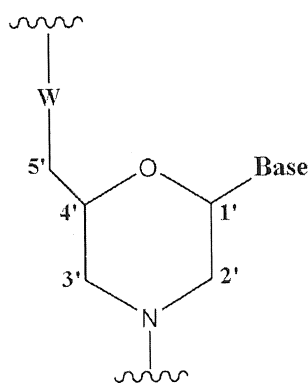


(trong đó Base là nucleobazơ).

Oligonucleotit theo sáng chế có thể dễ dàng được tổng hợp bằng nhiều thiết bị tổng hợp tự động khác nhau (ví dụ, AKTA oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)), hoặc theo cách khác, có thể được tổng hợp bởi bên thứ ba (ví dụ, Promega hoặc Takara), v.v..

Morpholino oligome trên đây là oligome theo sáng chế, trong đó đơn vị cấu thành của nó là nhóm được biểu thị bằng công thức chung dưới đây:

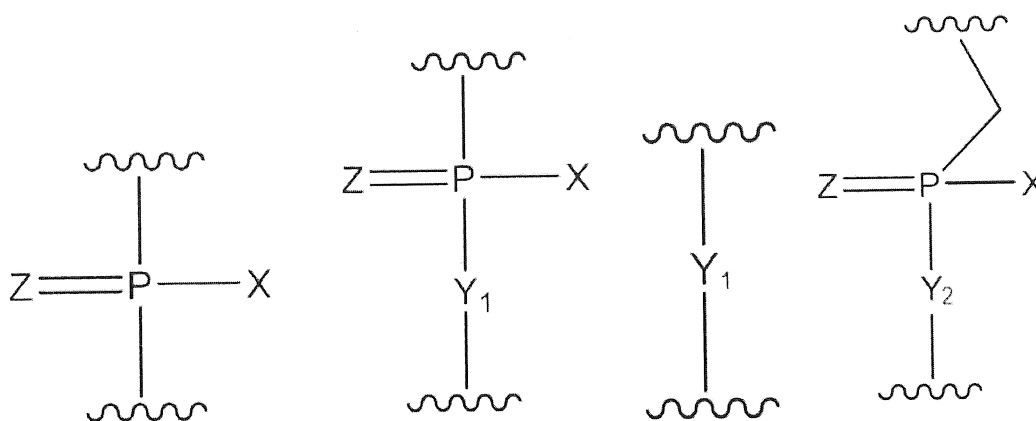
[Công thức 4]



(trong đó Base là giống như được xác định trên đây; và

W là nhóm được thể hiện bằng công thức bất kỳ trong số các công thức dưới đây:

[Công thức 5]



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

R^1 là H hoặc alkyl;

R^2 và R^3 , mà giống hoặc khác nhau, mỗi nhóm này là H, alkyl, xycloalkyl hoặc aryl;

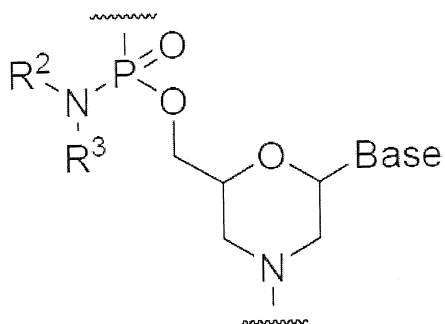
Y_1 biểu diễn O, S, CH_2 hoặc NR^1 ;

Y_2 là O, S hoặc NR^1 ; và

Z là O hoặc S)).

Morpholino oligome tốt hơn là oligome trong đó đơn vị cấu thành của nó là nhóm được biểu thị bằng công thức dưới đây (tức là, phosphorodiamidat morpholino oligome (dưới đây được gọi là “PMO”)):

[Công thức 6]



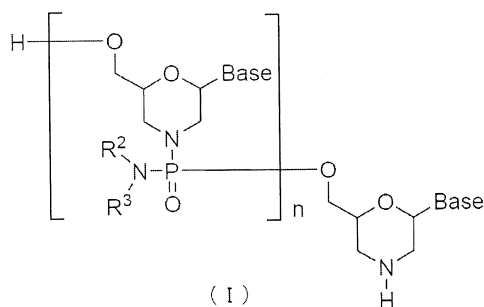
(trong đó Base, R^2 và R^3 là giống như được xác định trên đây).

Ví dụ, morpholino oligome có thể được điều chế theo WO1991/009033 hoặc WO2009/064471. Cụ thể, PMO có thể được điều chế theo các quy trình được mô tả trong WO2009/064471 hoặc có thể được điều chế theo các quy trình được mô tả trong WO2013/100190.

[Quy trình điều chế PMO]

Theo một phương án về PMO, hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (I) dưới đây (dưới đây được gọi là PMO (I)) có thể được nêu bằng cách ví dụ:

[Công thức 7]



[trong đó mỗi Base, R^2 và R^3 là giống như được xác định trên đây; và

n là số nguyên bất kỳ nằm trong khoảng từ 1 đến 99, tốt hơn là số nguyên bất kỳ nằm trong khoảng từ 13 đến 31].

PMO (I) có thể được điều chế theo các quy trình đã biết, ví dụ, bằng cách thực hiện các thao tác được thể hiện trong các bước dưới đây.

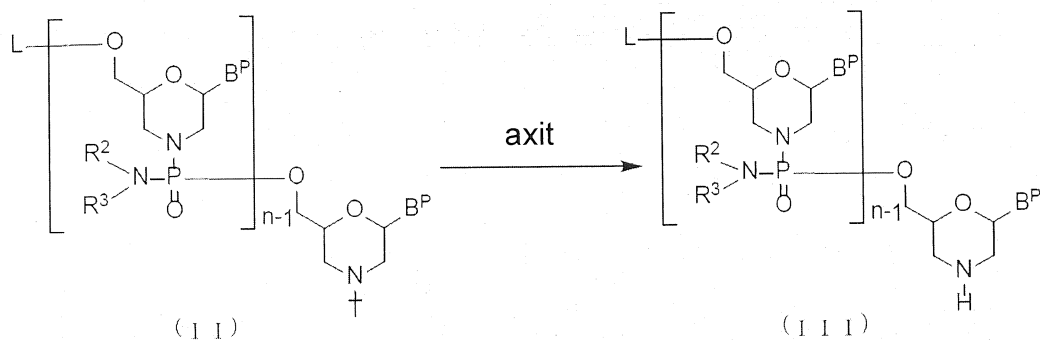
Các hợp chất và các chất phản ứng được sử dụng trong các bước dưới đây không chỉ giới hạn ở cách bất kỳ miễn là chúng thường được sử dụng để điều chế PMO.

Hơn nữa, tất cả các bước dưới đây có thể được thực hiện bằng phương pháp pha lỏng hoặc phương pháp pha rắn (lặp lại các phản ứng gián đoạn hoặc sử dụng bộ tổng hợp tự động pha rắn bán trên thị trường). Nếu PMO được điều chế bằng phương pháp pha rắn thì mong muốn là sử dụng bộ tổng hợp tự động xét về mặt thao tác đơn giản và tổng hợp chính xác.

(1) Bước A:

Đây là bước trong đó hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (II) dưới đây (dưới đây được gọi là hợp chất (II)) được xử lý với axit để điều chế hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (III) dưới đây (dưới đây được gọi là hợp chất (III)):

[Công thức 8]



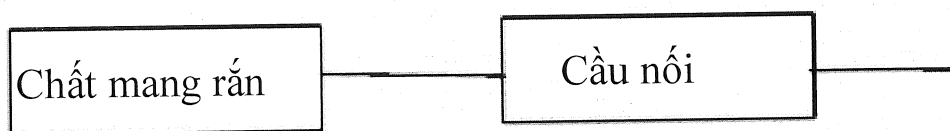
[trong đó n, R² và R³ là giống như được xác định trên đây;

mỗi B^P độc lập là nucleobazơ mà có thể được bảo vệ;

T là nhóm trityl, nhóm monometoxytrityl hoặc nhóm dimetoxyltrityl; và

L là hydro, axyl hoặc nhóm được biểu thị bằng công thức chung (IV) dưới đây (dưới đây được gọi là nhóm (IV))]:

[Công thức 9]



(I V)

Các “nucleobazơ” khả dĩ đối với B^P có thể được ví dụ bằng các “nucleobazơ” giống như được liệt kê cho Base, với điều kiện là các nhóm amino hoặc các nhóm hydroxyl trong các nucleobazơ đối với B^P này có thể được bảo vệ.

Các nhóm bảo vệ đối với các nhóm amino này không bị giới hạn theo cách bất kỳ miễn là chúng được sử dụng làm nhóm bảo vệ cho axit nucleic. Cụ thể hơn, các ví dụ bao gồm benzoyl, 4-metoxylbenzoyl, axetyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, phenylaxetyl, phenoxyaxetyl, 4-tert-butylphenoxyaxetyl, 4-isopropylphenoxyaxetyl, và (dimetylamino)metylen. Các nhóm bảo vệ đối với các nhóm hydroxyl bao gồm, ví dụ,

2-xyanoethyl, 4-nitrophenethyl, phenylsulfonylethyl, methylsulfonylethyl, trimethylsilylethyl, phenyl mà có thể được thế bằng 1 đến 5 nhóm thu electron ở các vị trí bất kỳ thế được, diphenylcarbamoyl, dimethylcarbamoyl, diethylcarbamoyl, methylphenylcarbamoyl, 1-pyrolidinylcarbamoyl, morpholinocarbamoyl, 4-(tert-butylcarboxy)benzyl, 4-[(dimethylamino)carboxy]benzyl, và 4-(phenylcarboxy)benzyl (xem, ví dụ, WO2009/064471).

“Chất mang rắn” không bị giới hạn theo cách bất kỳ miễn là nó là chất mang có sẵn để sử dụng trong phản ứng pha rắn của các axit nucleic, nhưng mong muốn là sử dụng, ví dụ, chất mang mà (i) ít tan trong các chất phản ứng có sẵn để sử dụng trong tổng hợp các dẫn xuất axit morpholino nucleic (ví dụ, diclometan, axetonitril, tetrazol, N-metylimidazol, pyridin, anhydrit axetic, lutidin, axit trifloaxetic), (ii) bền về mặt hóa học đối với các chất phản ứng có sẵn để sử dụng trong tổng hợp các dẫn xuất axit morpholino nucleic, (iii) có thể được cải biến về mặt hóa học, (iv) có thể được tải bằng các dẫn xuất axit morpholino nucleic mong muốn, (v) có độ bền đủ để chịu áp suất cao trong quá trình xử lý, và (vi) có khoảng cỡ hạt và phân bố nhất định. Cụ thể hơn, các ví dụ bao gồm polystyren có thể trương phồng (ví dụ, nhựa aminomethyl polystyren được liên kết ngang với 1% divinylbenzen (cỡ 200 đến 400 mesh) (2,4 đến 3,0 mmol/g) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Japan), Nhựa Polystyren được Aminomethyl hóa HCl [divinylbenzen 1%, cỡ 100 đến 200 mesh] (Peptide Institute, Inc., Japan)), polystyren không trương phồng (ví dụ, Primer Support (GE Healthcare)), các polystyren liên kết với PEG (ví dụ, nhựa NH₂-PEG (Watanabe Chemical Industries, Ltd., Japan), nhựa TentaGel), thủy tinh xốp được điều chỉnh (controlled pore glass - CPG) (ví dụ, CPG Inc.), thủy tinh xốp được oxalyl hóa được điều chỉnh (xem, ví dụ, Alul et al., Nucleic Acids Research, Vol. 19, 1527 (1991)), chất phụ trợ tạo dẫn xuất với aminopolyetylen glycol TentaGel (xem, ví dụ, Wright et al., Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993)), và copolyme Poros-polystyren/divinylbenzen.

Để làm “cầu nối”, có thể sử dụng cầu nối đã biết mà thường được sử dụng để liên kết axit nucleic hoặc dẫn xuất axit morpholino nucleic, và ví dụ bao gồm 3-

aminopropyl, succinyl, 2,2'-diethanol sulfonyl, và alkylamino mạch dài (LCAA).

Bước này có thể được thực hiện bằng cách xử lý hợp chất (II) với axit.

Các ví dụ về “axit” sẵn có để sử dụng trong bước này bao gồm axit trifloaxetic, axit dicloaxetic hoặc axit tricloaxetic. Lượng axit cần được sử dụng là, ví dụ, lượng hợp lý trong khoảng từ 0,1 đương lượng mol đến 1000 đương lượng mol, tốt hơn là trong khoảng từ 1 đương lượng mol đến 100 đương lượng mol, tính trên 1 mol hợp chất (II).

Hơn nữa, có thể sử dụng amin hữu cơ cùng với axit nêu trên. Amin hữu cơ bất kỳ có thể được sử dụng cho mục đích này, và ví dụ bao gồm triethylamin. Lượng amin hữu cơ cần được sử dụng là, ví dụ, lượng hợp lý trong khoảng từ 0,01 đương lượng mol đến 10 đương lượng mol, tốt hơn là trong khoảng từ 0,1 đương lượng mol đến 2 đương lượng mol, tính trên 1 mol axit.

Trong trường hợp mà axit và amin hữu cơ được sử dụng là muối hoặc hỗn hợp trong bước này, ví dụ gồm muối hoặc hỗn hợp của axit trifloaxetic và triethylamin, cụ thể hơn là hỗn hợp chứa 2 đương lượng của axit trifloaxetic và 1 đương lượng của triethylamin.

Axit có sẵn để sử dụng trong bước này có thể được sử dụng bằng cách pha loãng với dung môi thích hợp đến nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1% đến 30%. Dung môi bất kỳ có thể được sử dụng nhằm mục đích này miễn là nó trơ đối với phản ứng, và các ví dụ bao gồm diclometan, axetonitril, rượu (ví dụ, etanol, isopropanol, trifloetanol), nước, hoặc các hỗn hợp của chúng.

Nhiệt độ phản ứng trong phản ứng trên tốt hơn là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 10°C đến 50°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C, và thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 25°C đến 35°C.

Thời gian phản ứng sẽ thay đổi tùy thuộc vào loại axit được sử dụng và/hoặc nhiệt độ phản ứng, nhưng thường hợp lý là trong khoảng từ 0,1 phút đến 24 giờ, và tốt hơn là trong khoảng từ 1 phút đến 5 giờ.

Hơn nữa, sau khi hoàn thành bước này, bazơ có thể tùy ý được bổ sung để trung

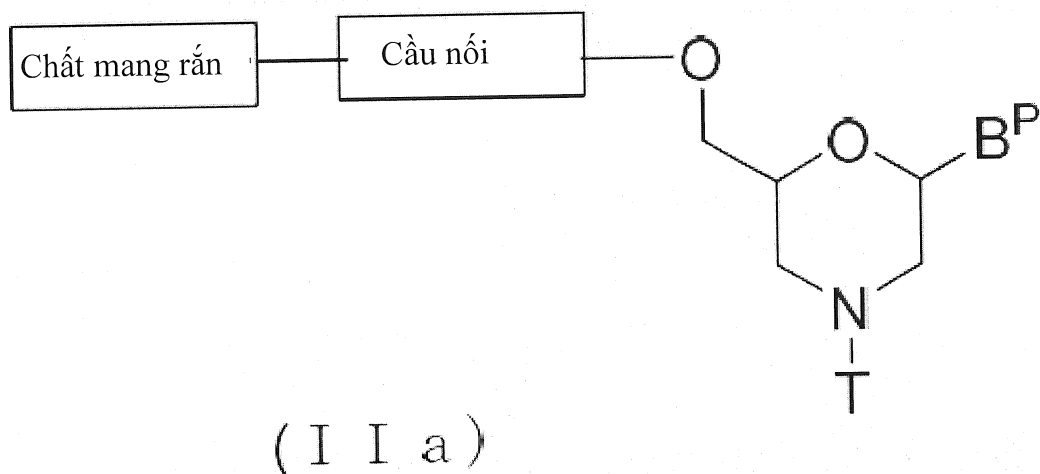
hòa axit còn lại trong hệ. “Bazơ” bất kỳ có thể được sử dụng nhằm mục đích này và ví dụ gồm diisopropyletylamin. Bazơ này có thể được sử dụng bằng cách được pha loãng với dung môi thích hợp để đem lại nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1% (thể tích/thể tích) đến 30% (thể tích/thể tích).

Dung môi bất kỳ có thể được sử dụng trong bước này miễn là nó trơ đối với phản ứng, và các ví dụ bao gồm diclometan, axetonitril, rượu (ví dụ, etanol, isopropanol, trifloetanol), nước, hoặc các hỗn hợp của chúng. Nhiệt độ phản ứng tốt hơn là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 10°C đến 50°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C, và thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 25°C đến 35°C.

Thời gian phản ứng sẽ thay đổi tùy thuộc vào loại bazơ được sử dụng và/hoặc nhiệt độ phản ứng, nhưng thường hợp lý là trong khoảng từ 0,1 phút đến 24 giờ, và tốt hơn là trong khoảng từ 1 phút đến 5 giờ.

Cần lưu ý là hợp chất (II) trong đó $n = 1$ và L là nhóm (IV), tức là, hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (IIa) dưới đây (dưới đây được gọi là hợp chất (IIa)) có thể được điều chế theo quy trình sau:

[Công thức 10]

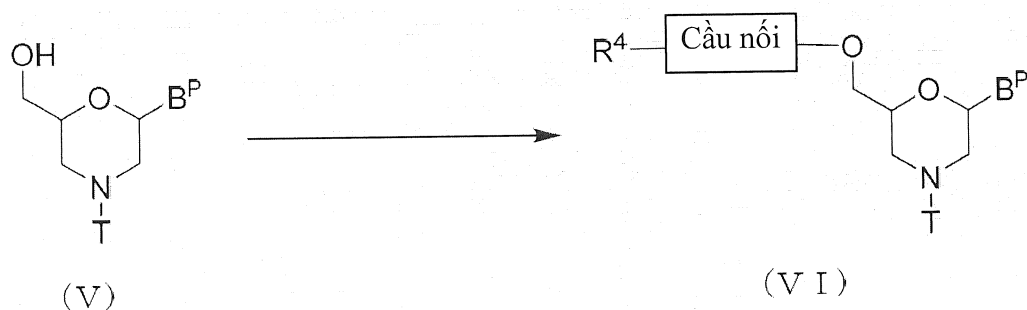


[trong đó B^P , T, Cầu nối và chất mang rắn là giống như được định nghĩa trên đây].

Bước 1:

Đây là bước trong đó hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (V) dưới đây được xử lý với tác nhân axyl hóa để điều chế hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (VI) dưới đây (dưới đây được gọi là hợp chất (VI)):

[Công thức 11]

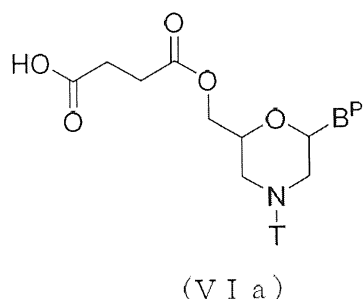


[trong đó B^P, T và cầu nối là giống như được định nghĩa trên đây; và R⁴ là nhóm hydroxyl, halogen hoặc amino].

Bước này có thể được thực hiện bắt đầu từ hợp chất (V) bằng phản ứng bất kỳ đã biết để đưa vào cầu nối.

Cụ thể là, hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (VIa) dưới đây có thể được điều chế bằng quy trình bất kỳ đã biết như phản ứng este hóa với việc sử dụng hợp chất (V) và anhydrit succinic:

[Công thức 12]

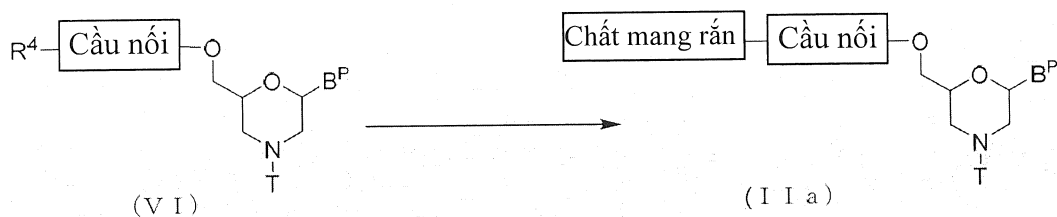


[trong đó B^P và T là giống như được định nghĩa trên đây].

Bước 2:

Đây là bước trong đó hợp chất (VI) được phản ứng với chất mang rắn bằng cách được xử lý với tác nhân ngưng tụ hoặc chất tương tự để điều chế hợp chất (IIa):

[Công thức 13]

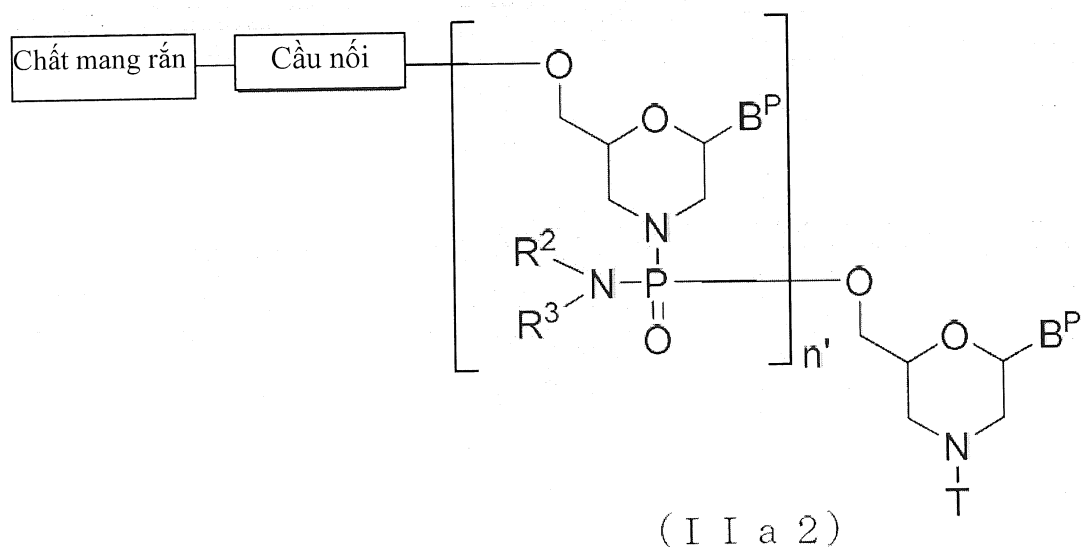


[trong đó B^p , R^4 , T, Cầu nối và chất mang rắn là giống như được định nghĩa trên đây].

Bước này có thể được thực hiện bằng quy trình bất kỳ đã biết như phản ứng ngưng tụ với việc sử dụng hợp chất (VI) và chất mang rắn.

Hợp chất (II) trong đó $n = 2$ đến 99 và L là nhóm (IV), tức là, hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (IIa2) dưới đây có thể được điều chế bắt đầu từ hợp chất (IIa) bằng cách lặp lại số lần mong muốn các bước A và B của quy trình để điều chế PMO được bộc lộ ở đây:

[Công thức 14]

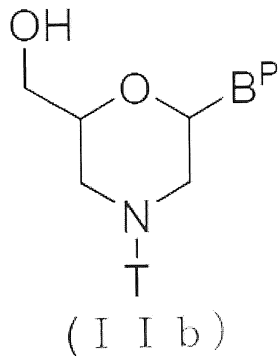


[trong đó B^p , R^2 , R^3 , T, Cầu nối và chất mang rắn là giống như được xác định trên đây; và n' là 1 đến 98].

Tương tự, hợp chất (II) trong đó $n = 1$ và L là hydro, tức là hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (IIb) dưới đây có thể được điều chế, ví dụ, bằng các quy trình

được mô tả trong WO1991/009033:

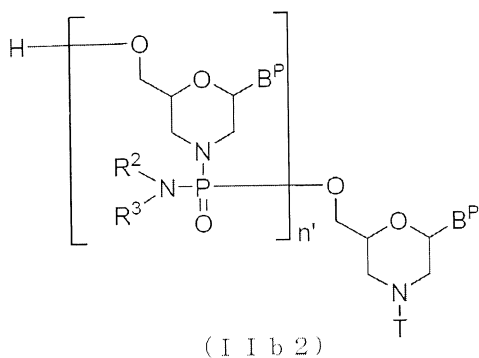
[Công thức 15]



[trong đó B^P và T là giống như được định nghĩa trên đây].

Hợp chất (II) trong đó n = 2 đến 99 và L là hydro, tức là, hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (IIb2) dưới đây có thể được điều chế bắt đầu từ hợp chất (IIb) bằng cách lặp lại số lần mong muốn các bước A và B của quy trình để điều chế PMO được bộc lộ ở đây:

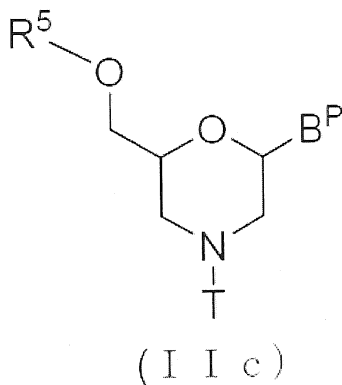
[Công thức 16]



[trong đó B^P, n', R², R³ và T là giống như được định nghĩa trên đây].

Tương tự, hợp chất (II) trong đó n = 1 và L là axyl, tức là, hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (IIc) dưới đây có thể được điều chế từ hợp chất (IIb) bằng quy trình bất kỳ đã biết như phản ứng axyl hóa:

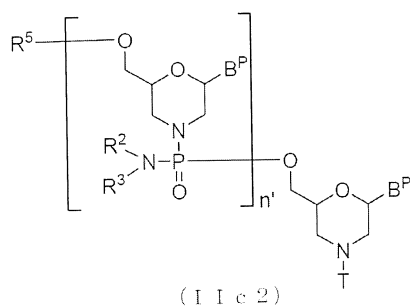
[Công thức 17]



[trong đó B^P và T là giống như được định nghĩa trên đây; và R⁵ là axyl].

Hợp chất (II) trong đó n = 2 đến 99 và L là axyl, tức là, hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (IIc2) dưới đây có thể được điều chế bắt đầu từ hợp chất (IIc) bằng cách lặp lại số lần mong muốn các bước A và B của quy trình để điều chế PMO được bộc lộ ở đây:

[Công thức 18]

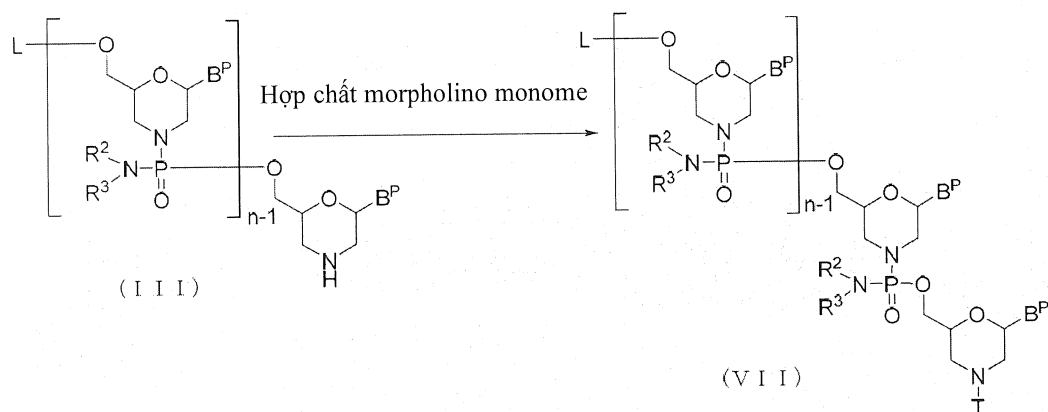


[trong đó B^P, n', R², R³, R⁵ và T là giống như được định nghĩa trên đây].

(2) Bước B:

Đây là bước trong đó hợp chất (III) được xử lý với hợp chất morpholino monome với sự có mặt của bazơ để điều chế hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (VII) dưới đây (dưới đây được gọi là hợp chất (VII)):

[Công thức 19]

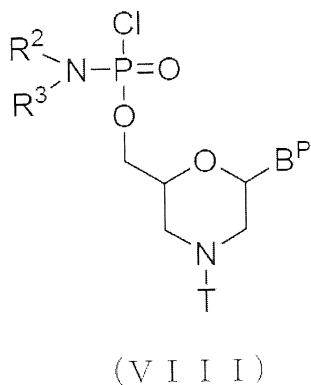


[trong đó mỗi B^P , L , n , R^2 , R^3 và T là giống như được định nghĩa trên đây].

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

Hợp chất morpholino monome này có thể được lấy làm ví dụ bằng hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (VIII) dưới đây:

[Công thức 20]



[trong đó B^P , R^2 , R^3 và T là giống như được định nghĩa trên đây].

Các ví dụ về “bazơ” thích hợp để sử dụng trong bước này bao gồm diisopropyletylamin, trietylamin hoặc N-etylmorpholin. Lượng bazơ cần được sử dụng là, ví dụ, lượng hợp lý trong khoảng từ 1 đương lượng mol đến 1000 đương lượng mol, tốt hơn là trong khoảng từ 10 đương lượng mol đến 100 đương lượng mol, tính trên 1 mol hợp chất (III).

Hợp chất morpholino monome và bazơ có sẵn để sử dụng trong bước này có thể

được sử dụng bằng cách pha loãng với dung môi thích hợp đến nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1% đến 30%. Dung môi bất kỳ có thể được sử dụng nhằm mục đích này miễn là nó là trơ đối với phản ứng, và ví dụ bao gồm N,N-dimetylimidazolidinon, N-metylpiperidon, DMF, diclometan, axetonitril, tetrahydrofuran, hoặc các hỗn hợp của chúng.

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

Thời gian phản ứng sẽ thay đổi tùy thuộc vào loại bazơ được sử dụng và/hoặc nhiệt độ phản ứng, nhưng thường hợp lý là trong khoảng từ 1 phút đến 48 giờ, và tốt hơn là trong khoảng từ 30 phút đến 24 giờ.

Hơn nữa, sau khi hoàn thành bước này, tác nhân axyl hóa có thể tùy ý được bổ sung. Các ví dụ về “tác nhân axyl hóa” bao gồm anhydrit axetic, axetyl clorua và anhydrit phenoxyaxetic. Tác nhân axyl hóa này có thể được sử dụng bằng cách được pha loãng với dung môi thích hợp để thu được nồng độ, ví dụ, trong khoảng từ 0,1% đến 30%. Dung môi bất kỳ có thể được sử dụng nhằm mục đích này miễn là nó trơ đối với phản ứng, và các ví dụ bao gồm diclometan, axetonitril, rượu (ví dụ, etanol, isopropanol, trifloetanol), nước, hoặc các hỗn hợp của chúng.

Nếu cần, có thể sử dụng bazơ (ví dụ, pyridin, lutidin, collidin, trietylamin, diisopropyletylamin, N-etylmorpholin) cùng với tác nhân axyl hóa. Lượng tác nhân axyl hóa được sử dụng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đương lượng mol đến 10000 đương lượng mol, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đương lượng mol đến 1000 đương lượng mol. Lượng bazơ cần được sử dụng là, ví dụ, lượng hợp lý trong khoảng từ 0,1 đương lượng mol đến 100 đương lượng mol, tốt hơn là trong khoảng từ 1 đương lượng mol đến 10 đương lượng mol, tính trên 1 mol tác nhân axyl hóa.

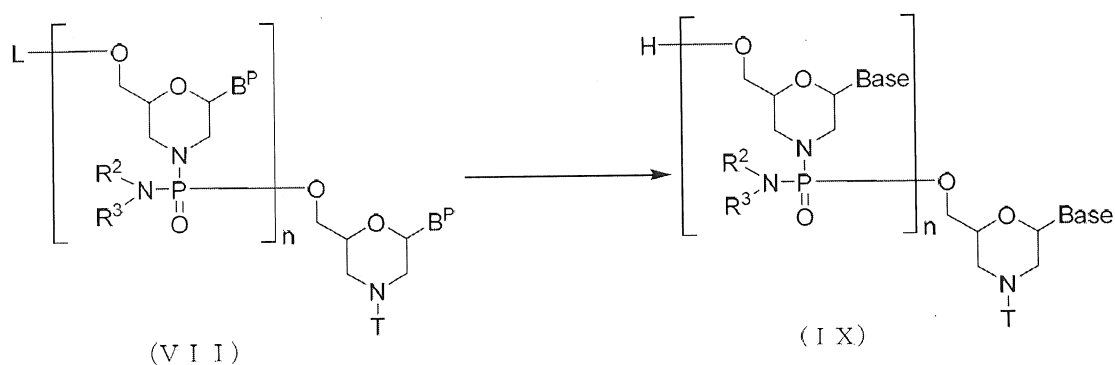
Nhiệt độ phản ứng trong phản ứng này tốt hơn là trong khoảng từ 10°C đến 50°C, tốt hơn nữa là, trong khoảng từ 10°C đến 50°C, thậm chí tốt hơn nữa là trong khoảng từ 20°C đến 40°C, và thậm chí còn tốt hơn nữa là trong khoảng từ 25°C đến 35°C. Thời gian phản ứng sẽ thay đổi, ví dụ, tùy thuộc vào loại tác nhân axyl hóa được

sử dụng và/hoặc nhiệt độ phản ứng, nhưng thường hợp lý là trong khoảng từ 0,1 phút đến 24 giờ, và tốt hơn là trong khoảng từ 1 phút đến 5 giờ.

(3) Bước C:

Đây là bước trong đó tác nhân khử bảo vệ được sử dụng để loại bỏ các nhóm bảo vệ ra khỏi hợp chất (VII) được điều chế trong bước B, nhờ đó điều chế được hợp chất được biểu thị bằng công thức chung (IX):

[Công thức 21]



[trong đó Base, B^p, L, n, R², R³ và T là giống như được định nghĩa trên đây].

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

Ví dụ về “tác nhân khử bảo vệ” bao gồm dung dịch nước amoniac đặc và metylamin. Tác nhân “khử bảo vệ” có sẵn để sử dụng trong bước này có thể được sử dụng bằng cách được pha loãng với nước, metanol, etanol, rượu isopropylic, axetonitril, tetrahydrofuran, DMF, N,N-dimetylimidazolidinon, N-metylpiperidon, hoặc dung môi hỗn hợp của chúng. Trong số này, được ưu tiên là etanol. Lượng tác nhân khử bảo vệ cần được sử dụng là, ví dụ, lượng hợp lý trong khoảng từ 1 đương lượng mol đến 100000 đương lượng mol, tốt hơn là trong khoảng từ 10 đương lượng mol đến 1000 đương lượng mol, tính trên 1 mol hợp chất (VII).

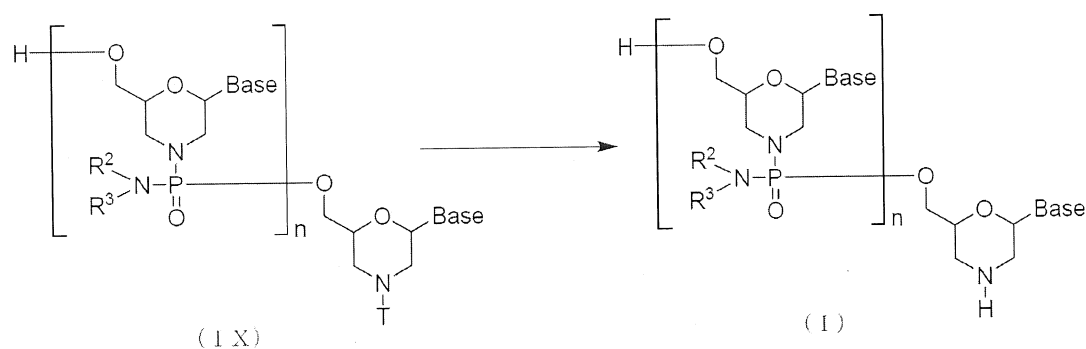
Nhiệt độ phản ứng hợp lý là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 15°C đến 75°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 40°C đến 70°C, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50°C đến 60°C. Thời gian phản ứng để khử bảo vệ sẽ thay đổi tùy thuộc vào loại hợp chất

(VII) và/hoặc nhiệt độ phản ứng, v.v., nhưng hợp lý 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:

Đây là bước trong đó hợp chất (IX) điều chế được trong Bước C được xử lý với axit để tạo ra PMO (I):

[Công thức 22]



[trong đó Base, n, R², R³ và T là giống như được định nghĩa trên đây].

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

Ví dụ về “axit” có sẵn để sử dụng trong bước này gồm axit tricloaxetic, axit dicloaxetic, axit axetic, axit phosphoric và axit clohydric, v.v. Đối với lượng axit được sử dụng, hợp lý là sử dụng axit với lượng để tạo ra độ pH của dung dịch, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1,0 đến 4,0, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1,0 đến 3,0. Dung môi bất kỳ có thể được sử dụng trong bước này miễn là nó trơ đối với phản ứng, và các ví dụ bao gồm axetonitril, nước, hoặc các dung môi hỗn hợp của chúng.

Nhiệt độ phản ứng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10°C đến 50°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C, và thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 25°C đến 35°C. Thời gian phản ứng để khử bảo vệ sẽ thay đổi tùy thuộc vào loại hợp chất (IX) và/hoặc nhiệt độ phản ứng, v.v., nhưng hợp lý là trong khoảng từ 0,1 phút đến 5 giờ, tốt hơn là trong khoảng 1 phút đến 1 giờ, và tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1 phút đến 30 phút.

PMO (I) có thể thu được từ hỗn hợp phản ứng thu được trong bước này bằng

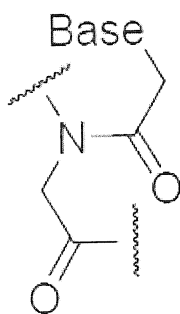
biện pháp tách và tinh chế thường dùng bao gồm phương pháp chiết, cô đặc, trung hòa, lọc, ly tâm, tái kết tinh, sắc ký cột pha đảo C_8 đến C_{18} , sắc ký cột trao đổi cation, sắc ký cột trao đổi anion, sắc ký cột lọc gel, sắc ký lỏng hiệu năng cao, thẩm tách, siêu lọc, và các biện pháp khác, mà có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp, nhờ đó PMO (I) mong muốn có thể được tách và tinh chế (xem, ví dụ, WO1991/09033).

Trong trường hợp sử dụng phương pháp sắc ký pha đảo để tinh chế PMO (I), ví dụ, dung dịch hỗn hợp chứa 20mM dung dịch đệm triethylamin/axetat và axetonitril có thể được sử dụng làm dung môi rửa giải.

Tương tự, trong trường hợp sử dụng phương pháp sắc ký trao đổi ion để tinh chế PMO (I), ví dụ, dung dịch hỗn hợp chứa 1M nước natri clorua và 10mM nước natri hydroxit có thể được sử dụng.

Oligome axit nucleic peptit trên đây là oligome theo sáng chế, trong đó đơn vị cấu thành của nó là nhóm được biểu thị bằng công thức chung dưới đây:

[Công thức 23]



(trong đó Base là giống như được định nghĩa trên đây).

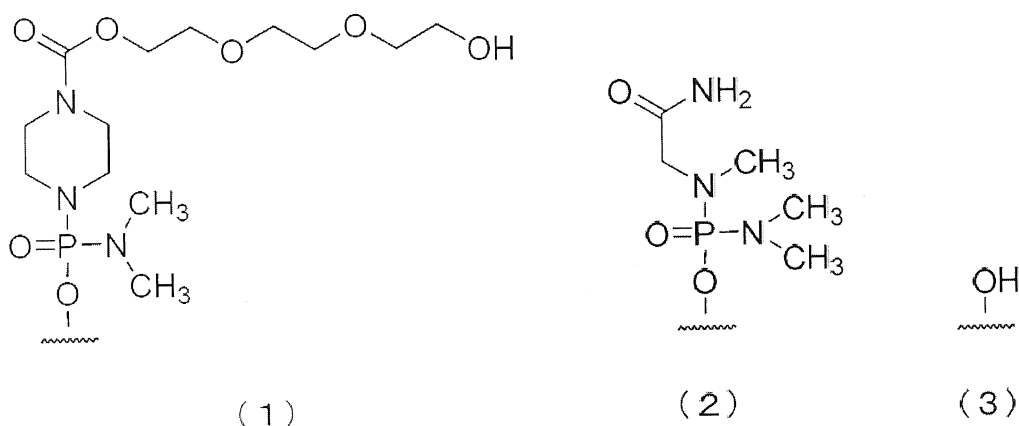
Các axit nucleic peptit có thể được điều chế, ví dụ, theo các tài liệu được liệt kê dưới đây.

- 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)

Hơn nữa, oligome theo sáng chế có thể được tạo cấu hình sao cho đầu tận cùng 5' là nhóm bất kỳ trong số các nhóm được biểu thị bằng các công thức hóa học (1) đến (3) được thể hiện dưới đây, trong đó nhóm (3) -OH là nhóm được ưu tiên.

[Công thức 24]



Các nhóm được biểu thị bằng các công thức (1), (2) và (3) trên đây dưới đây lần lượt được gọi là “nhóm (1),” “nhóm (2)” và “nhóm (3)”.

2. Dược phẩm

Oligome theo sáng chế cho phép sự bỏ qua exon 45 trong gen dystrophin. Do đó, các triệu chứng của bệnh loạn dưỡng cơ sẽ được trông đợi là có thể được làm thuyên giảm khi dược phẩm chứa oligome theo sáng chế được dùng cho các bệnh nhân DMD có sự đột biến được hướng đích bởi sự bỏ qua exon 45 (tức là, sự đột biến được chuyển hóa để đột bỏ bằng sự bỏ qua exon 45) ở gen dystrophin của họ. Hơn nữa, vì chiều dài mạch của nó là ngắn nên oligome theo sáng chế là có lợi ở chỗ các bước điều chế nó là đơn giản và còn ở chỗ là chi phí điều chế nó có thể được giảm.

Do đó, theo phương án khác, sáng chế đề xuất được phẩm để điều trị bệnh loạn dưỡng cơ, mà chứa oligome theo sáng chế, muối hoặc hydrat được dụng của nó làm thành phần hoạt tính (dưới đây được gọi là “chế phẩm theo sáng chế”).

Các ví dụ về muối được dụng của oligome theo sáng chế được chứa trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm các muối của kim loại kiềm (ví dụ, muối natri, muối kali, muối lithi); các muối của kim loại kiềm thổ (ví dụ, muối canxi, muối magie); các muối của kim loại khác (ví dụ, muối nhôm, muối sắt, muối kẽm, muối đồng, muối niken, muối coban); muối amoni; các muối amin hữu cơ (ví dụ, muối t-octylamin, muối dibenzylamin, muối morpholin, muối glucosamin, muối phenylglyxin alkyl este, muối etylendiamin, muối N-metylglucamin, muối guanidin, muối diethylamin, muối triethylamin, muối dicyclohexylamin, muối N,N'-dibenzyletylendiamin, muối cloprocain, muối procain, muối dietanolamin, muối N-benzyl-phenetylamin, muối piperazin, muối tetrametylamoni, muối tris(hydroxymetyl)aminometan); các muối hydroaxit được halogen hóa (ví dụ, muối hydroflorua, muối hydroclorua, muối hydrobromua, muối hydroiodua); muối của axit vô cơ (tức là, muối nitrat, muối perclorat, muối sulfat, muối phosphat); các muối của axit alkansulfonic thấp (ví dụ, muối metansulfonat, muối triflometansulfonat, muối etansulfonat); các muối của axit arylsulfonic (ví dụ, muối benzensulfonat, muối p-toluensulfonat); các muối của axit hữu cơ (ví dụ, muối axetat, muối malat, muối fumarat, muối succinat, muối xitrat, muối tartrat, muối oxalat, muối maleat); các muối axit amin (ví dụ, muối glyxin, muối lysin, muối arginin, muối ornithin, muối glutamat, muối aspartat), v.v. Các muối này có thể được điều chế theo cách thức bất kỳ đã biết. Theo cách khác, oligome theo sáng chế chứa trong được phẩm theo sáng chế có thể ở dạng hydrat của nó.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng dưới cách thức được dụng bất kỳ, mà có thể được chọn nếu thích hợp cho phương pháp điều trị dự định. Tuy nhiên, xét về mặt dễ phân phát đến mô cơ, được ưu tiên là phương pháp dùng trong tĩnh mạch, dùng trong động mạch, dùng trong cơ, dùng dưới da, dùng qua đường miệng, dùng qua kẽ, dùng qua da, v.v.. Hơn nữa, chế phẩm theo sáng chế có thể ở dạng liều lượng bất kỳ, và ví dụ

gồm các loại thuốc tiêm, các chế phẩm phối chế dùng qua đường miệng, thuốc nhỏ giọt, thuốc hít, thuốc mỡ, thuốc xức, v.v.

Trong trường hợp mà oligome theo sáng chế được dùng cho bệnh nhân bị loạn dưỡng cơ, chế phẩm theo sáng chế tốt hơn là chứa chất mang mà thúc đẩy sự phân phát oligome đến mô cơ. Chất mang này không bị giới hạn theo cách bất kỳ miễn là nó là được dụng, và các ví dụ bao gồm các chất mang cation (ví dụ, liposom cation, polyme cation) hoặc các chất mang trên cơ sở vỏ virus. Ví dụ về các liposom cation bao gồm các liposom được tạo thành từ các thành tố cấu thành chủ yếu là 2-O-(2-diethylaminoethyl)carbamoyl-1,3-O-dioleoyl glyxerol và phospholipit (dưới đây được gọi là “liposom A”), Oligofectamine[®] (Invitrogen), Lipofectin[®] (Invitrogen), Lipofectamine[®] (Invitrogen), Lipofectamine 2000[®] (Invitrogen), DMRIE-C[®] (Invitrogen), GeneSilencer[®] (Gene Therapy Systems), TransMessenger[®] (QIAGEN), TransIT TKO[®] (Mirus) và Nucleofector II (Lonza). Trong số này, được ưu tiên là liposom A. Các ví dụ về các polyme cation bao gồm JetSI[®] (Qbiogene) và Jet-PEI[®] (polyetylenimin, Qbiogene). Các ví dụ về các chất mang trên cơ sở vỏ virus bao gồm GenomeOne[®] (các liposom HVJ-E, Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd., Japan). Cách khác, có thể sử dụng dụng cụ được lý được thể hiện trong patent Nhật Bản số 2924179 hoặc các chất mang cation được thể hiện trong WO2006/129594 và WO2008/096690.

Nồng độ của oligome theo sáng chế được chứa trong chế phẩm theo sáng chế sẽ thay đổi, ví dụ, tùy thuộc vào loại chất mang, nhưng hợp lý là nằm trong khoảng từ 0,1 nM đến 100 μ M, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 nM đến 10 μ M, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10 nM đến 1 μ M. Tương tự, tỷ lệ khối lượng của chất mang trên oligome theo sáng chế được chứa trong chế phẩm theo sáng chế (tức là, tỷ lệ chất mang/oligome) sẽ thay đổi, ví dụ, tùy thuộc vào tính chất của oligome và loại chất mang, nhưng hợp lý là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 50, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10 đến 20.

Chế phẩm theo sáng chế có thể tùy ý chứa chất phụ gia được dụng, ngoài oligome theo sáng chế và chất mang được mô tả trên đây. Các ví dụ về chất phụ gia này

bao gồm chất hỗ trợ nhũ hóa (ví dụ, axit béo chứa 6 đến 22 nguyên tử cacbon hoặc muối được dụng của chúng, albumin, dextran), chất làm ổn định (ví dụ, cholesterol, axit phosphatidic), chất làm tăng trương (ví dụ, natri clorua, glucoza, maltoza, lactoza, sucroza, trehaloza), và chất điều chỉnh độ pH (ví dụ, axit clohydric, axit sulfuric, axit phosphoric, axit axetic, natri hydroxit, kali hydroxit, trietanolamin). Các chất phụ gia này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với nhau. Hàm lượng của (các) chất phụ gia trong chế phẩm theo sáng chế hợp lý là chiếm 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 điều chế bằng cách bổ sung oligome theo sáng chế vào thể phân tán của chất mang, sau đó khuấy một cách thích hợp. (Các) chất phụ gia có thể được bổ sung vào ở giai đoạn thích hợp, trước hoặc sau khi bổ sung oligome theo sáng chế. Dung môi nước bất kỳ có thể được sử dụng để bổ sung oligome theo sáng chế miễn là dung môi này là được dụng, và ví dụ bao gồm nước tiêm được, nước cất tiêm được, các dung dịch chất điện giải (ví dụ, nước muối sinh lý), và các dung dịch đường (ví dụ, dung dịch glucoza, dung dịch maltoza). Hơn nữa, trong trường hợp này, các điều kiện bao gồm độ pH và nhiệt độ có thể được chọn nếu thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được phối chế, ví dụ, thành dung dịch hoặc chế phẩm phối chế được làm đông khô của nó. Chế phẩm phối chế được làm đông khô này có thể được điều chế theo cách thức chuẩn bằng cách sấy đông khô chế phẩm theo sáng chế ở dạng dung dịch. Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế dưới dạng dung dịch có thể được làm tiệt trùng nếu thích hợp và sau đó được phân phối với lượng nhất định vào các chai nhỏ, sau đó làm lạnh đông sơ bộ trong điều kiện từ khoảng -40°C đến -20°C trong khoảng 2 giờ, làm khô sơ cấp ở khoảng 0°C đến 10°C trong điều kiện áp suất giảm và sau đó được làm khô thứ cấp ở khoảng 15°C đến 25°C trong điều kiện áp suất giảm. Hơn nữa, trong hầu hết các trường hợp, các lọ có thể được làm sạch bằng khí nitơ và sau đó được đậy nắp, nhờ đó tạo ra chế phẩm phối chế được làm đông khô của chế phẩm

theo sáng chế.

Chế phẩm phối chế được làm đông khô của chế phẩm theo sáng chế thường có thể được sử dụng sau khi được hoàn nguyên bằng cách bổ sung dung dịch thích hợp bất kỳ (tức là, dung dịch hoàn nguyên). Các ví dụ về dung dịch hoàn nguyên này bao gồm nước tiêm được, nước muối sinh lý, và các dung dịch truyền thường dùng khác. Thể tích dung dịch hoàn nguyên này sẽ thay đổi, ví dụ, tùy thuộc vào ứng dụng dự tính và không bị giới hạn theo cách bất kỳ, nhưng hợp lý là lớn hơn từ 0,5 đến 2 lần so với thể tích dung dịch trước khi làm đông khô, hoặc 500 mL hoặc nhỏ hơn.

Liều lượng dùng chế phẩm theo sáng chế được điều chỉnh một cách mong muốn có tính đến loại oligome theo sáng chế được chứa trong đó, dạng liều lượng dự tính, tình trạng của bệnh nhân như tuổi tác và thể trọng, đường dùng, và bản chất và độ nặng của bệnh. Tuy nhiên, liều lượng dùng hàng ngày đối với người lớn thường nằm trong khoảng từ 0,1 mg đến 10 g/người, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 mg đến 1 g/người, tính theo lượng oligome theo sáng chế. Khoảng số liệu này có thể thay đổi tùy thuộc vào loại bệnh được hướng đích, cách dùng, và/hoặc loại phân tử đích. Do đó, liều lượng thấp hơn khoảng này có thể là đủ trong một số trường hợp, hoặc ngược lại, liều lượng cao hơn khoảng này có thể cần thiết trong một số trường hợp. Hơn nữa, chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng một đến vài lần một ngày hoặc cách quãng một đến vài ngày.

Theo phương án khác, chế phẩm theo sáng chế có thể là dược phẩm chứa vector có khả năng biểu hiện oligonucleotit theo sáng chế và chất mang như được mô tả trên đây. Vector biểu hiện như vậy có thể có khả năng biểu hiện nhiều oligonucleotit theo sáng chế. Chế phẩm như vậy có thể tùy ý chứa chất phụ gia được dùng, như trong trường hợp các chế phẩm theo sáng chế chứa oligome theo sáng chế. Nồng độ của vector biểu hiện được chứa trong chế phẩm này sẽ thay đổi, ví dụ, tùy thuộc vào loại chất mang, nhưng hợp lý là nằm trong khoảng từ 0,1 nM đến 100 μ M, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 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 chất mang trên vector biểu hiện chứa trong chế phẩm này (tức là, tỷ lệ chất mang/vector biểu hiện) sẽ thay đổi, ví dụ, tùy thuộc vào tính chất của vector biểu hiện và

loại chất mang, nhưng hợp lý là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 50, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10 đến 20. Hơn nữa, hàm lượng chất mang có trong chế phẩm này là giống như trong trường hợp chế phẩm theo sáng chế chứa oligome theo sáng chế, và quy trình điều chế nó cũng giống như trong trường hợp với chế phẩm theo sáng chế.

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn như dưới đây bằng các ví dụ minh họa và các ví dụ thử nghiệm dưới đây, nhưng sáng chế không bị giới hạn phạm vi 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]methoxy}-4-oxobutanoic được tải lên nhựa aminopolystyren

Bước 1: Điều chế axit 4-{[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-4-tritylmorpholin-2-yl]methoxy}-4-oxobutanoic

Trong môi trường khí argon, N-{1-[(2R,6S)-6-(hydroxymethyl)-4-tritylmorpholin-2-yl]-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl}benzamid (3,44 g) và 4-dimethylaminopyridin (4-DMAP) (1,1 g) được tạo huyền phù trong diclometan (50 mL), và sau đó anhydrit succinic (0,90 g) được bổ sung vào đó, sau đó khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Dung dịch phản ứng được trộn với metanol (10 mL) và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn còn lại được chiết bằng etyl axetat và dung dịch nước natri hydro phosphat 0,5M. Lớp hữu cơ thu được được rửa liên tục bằng dung dịch nước kali dihydro phosphat 0,5M, nước và dung dịch nước natri clorua bão hòa. Lớp hữu cơ thu được được làm khô qua natri sulfat và được cô đặc trong điều kiện áp suất giảm để thu được 4,0 g sản phẩm mong muốn.

Bước 2: Điều chế axit 4-{[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopyrimidin-1-yl)-4-tritylmorpholin-2-yl]methoxy}-4-oxobutanoic được tải lên nhựa aminopolystyren

Hòa tan axit 4-{[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-4-

tritylmorpholin-2-yl]metoxy}-4-oxobutanoic (4,0 g) trong pyridin (đã được khử nước) (200 mL), sau đó bổ sung 4-DMAP (0,73 g) và 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydroclorua (11,5 g) vào đó. Sau đó, chất nền Primer nhựa aminopolystyren 200 amino (GE Healthcare Japan, 17-5214-97) (25,0 g) và triethylamin (8,5 mL) được bổ sung vào hỗn hợp này, sau đó là lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 4 ngày. Sau phản ứng này, nhựa được thu gom bằng cách lọc. Nhựa thu được được rửa lần lượt bằng pyridin, metanol và diclometan, và sau đó được làm khô trong điều kiện áp suất giảm. Bổ sung vào nhựa thu được này tetrahydrofuran (đã được khử nước) (200 mL), anhydrit axetic (15 mL) và 2,6-lutidin (15 mL), sau đó lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Nhựa được thu gom bằng cách lọc, rửa lần lượt bằng pyridin, metanol và diclometan, và sau đó được làm khô trong điều kiện áp suất giảm để thu được 26,7 g sản phẩm mong muốn.

Để xác định lượng tải sản phẩm mong muốn, lượng mol trityl trên mỗi gam nhựa được đo theo phương pháp đã biết dưới dạng độ hấp thụ UV ở 409 nm. Lượng tải lên nhựa được phát hiện là 129,2 $\mu\text{mol/g}$.

Các điều kiện đo UV

Thiết bị: U-2910 (Hitachi, Ltd., Japan)

Dung môi: axit metansulfonic

Bước sóng: 409 nm

Giá trị ϵ : 45000

Ví dụ tham chiếu 2

Axit 4-{[(2S,6R)-6-(5-methyl-2,4-dioxypyrimidin-1-yl)-4-tritylmorpholin-2-yl]metoxy}-4-oxobutanoic được tải lên nhựa aminopolystyren

Các quy trình giống như được thể hiện trong ví dụ tham chiếu 1 được lặp lại để điều chế hợp chất nêu ở đề mục này, ngoại trừ việc N-{1-[(2R,6S)-6-(hydroxymethyl)-4-

tritylmorpholin-2-yl]-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl}benzamidit được sử dụng trong bước 1 của ví dụ tham chiếu 1 được thay thế trong bước này bằng 1-[(2R,6S)-6-(hydroxymetyl)-4-tritylmorpholin-2-yl]-5-metylpyrimidin-2,4(1H,3H)-dion.

Để xác định lượng tải sản phẩm mong muốn, lượng mol trityl trên mỗi gam nhựa được đo theo phương pháp đã biết dưới dạng độ hấp thụ UV ở 409 nm. Lượng tải lên nhựa được phát hiện là 164,0 $\mu\text{mol/g}$.

Ví dụ tham chiếu 3

Axit 4-{[(2S,6R)-6-(6-benzamidopurin-9-yl)-4-tritylmorpholin-2-yl]metoxy}-4-oxobutanoic được tải lên nhựa aminopolystyren

Các quy trình giống như được thể hiện trong ví dụ tham chiếu 1 được lặp lại để điều chế hợp chất nêu ở đề mục này, ngoại trừ việc N-{1-[(2R,6S)-6-(hydroxymetyl)-4-tritylmorpholin-2-yl]-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl}benzamidit được sử dụng trong bước 1 của ví dụ tham chiếu 1 được thay thế trong bước này bằng N-{9-[(2R,6S)-6-(hydroxymetyl)-4-tritylmorpholin-2-yl]purin-6-yl}benzamidit.

Để xác định lượng tải sản phẩm mong muốn, lượng mol trityl trên mỗi gam nhựa được đo theo phương pháp đã biết dưới dạng độ hấp thụ UV ở 409 nm. Lượng tải lên nhựa được phát hiện là 185,7 $\mu\text{mol/g}$.

Ví dụ tham chiếu 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 aminopolystyren

Các quy trình giống như được thể hiện trong ví dụ tham chiếu 1 được lặp lại để điều chế hợp chất nêu ở đề mục này, ngoại trừ việc N-{1-[(2R,6S)-6-(hydroxymetyl)-4-tritylmorpholin-2-yl]-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl}benzamidit được sử dụng trong bước 1 của ví dụ tham chiếu 1 được thay thế trong bước này bằng N-{6-(2-xyanoetoxy)-

9-[(2R,6S)-6-(hydroxymethyl)-4-tritylmorpholin-2-yl]purin-2-yl}-2-phenoxyacetamit.

Để xác định lượng tải sản phẩm mong muốn, lượng mol trityl trên mỗi gam nhựa được đo theo phương pháp đã biết dưới dạng độ hấp thụ UV ở 409 nm. Lượng tải lên nhựa được phát hiện là 164,8 $\mu\text{mol/g}$.

Theo các phân mô tả trong ví dụ 1 được thể hiện dưới đây, các PMO có trình tự nucleotit của PMO số 1 đến 81 được thể hiện trong bảng 1 được tổng hợp (trong đó mỗi R^2 và R^3 là methyl, và đầu tận cùng 5' là nhóm (3)). Mỗi PMO tổng hợp được như vậy được hòa tan trong nước để tiêm (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Japan).

Bảng 1-1

PMO số	Trình tự nucleotit	Tên trình tự	SEQ ID NO:
1	TTGCCGCTGCCCACATCCTGGAGT TC	H45_1-13_18-30	14
2	GTTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTC CT	H45_-2-11_20-32	7
3	GCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTC CT	H45_-2-13_18-28	15
4	CCGCTGCCCAATGTCCTGGAGTTC CT	H45_-2-11_15-27	16
5	TTGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTC CT	H45_-2-11_18-30	17
6	TTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC CT	H45_-2-13_21-31	18
7	TTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTCC	H45_-1-11_20-31	19
8	TGCCGCTGCCCCGCCATCCTGGAGT TC	H45_1-15_19-29	20
9	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	H45_-2-10_21-32	8
10	CAGTTTGCCGCTGCCCATCCTGGA	H45_-2-13_20-34	9

	G TTCCT		
11	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC CT	H45_-2-8_19-34	10
12	GTTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTT C	H45_1-12_20-32	21
13	CAGTTTGCCGCTGCTGGAGTTCCT	H45_-2-8_21-34	22
14	ACAGTTTGCCGCTCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_23-35	23
15	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCT	H45_-2-7_20-34	24
16	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_19-32	25
17	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCT G	H45_-3-7_20-34	26
18	CCGCTGCCCAATGTGGAGTTCCTG T	H45_-4-8_15-27	27
19	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	H45_1-8_19-34	28
20	CCGCTGCCCAATCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_16-27	29
21	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC C	H45_-1-8_19-34	30
22	TTGCCGCTGCCCAGTGGAGTTCCT	H45_-2-9_18-30	31
23	TTGCCGCTGCCCAGTGGAGTTCCT GT	H45_-4-9_18-30	32
24	ACAGTTTGCCGCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_25-35	33
25	GTTTGCCGCTGC	H45_21-32	34
26	CCTGGAGTTCCT	H45_-2-10	35
27	TGGAGTTCCT	H45_-2-8	36
28	CAGTTTGCCGCTGCCC	H45_19-34	37
29	TCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAG TT	H45_2-14_53-65	38
30	AGACCTCCTGCCACCATCCTGGAG TT	H45_2-14_136-148	39
31	TTCTTCCCCAGTTGCGCCATCCTG GAGTTC	H45_1-15_52-66	11

32	CAGACCTCCTGCCACGCCATCCTG GAGTTC	H45_1-15_135-149	12
33	GACCTCCTGCCACCATCCTGGAGT TC	H45_1-14_136-147	40

Bảng 1-2

34	TCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGT TC	H45_1-15_52-62	41
35	GACCTCCTGCCGCCATCCTGGAGT TC	H45_1-15_137-147	42
36	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGT TC	H45_1-14_53-64	43
37	TTCCCCAGTTGCACATCCTGGAGT TC	H45_1-13_51-63	44
38	CCTCCTGCCACCGCATCCTGGAGT TC	H45_1-13_133-145	45
39	ACCTCCTGCCACCCATCCTGGAGT TC	H45_1-13_134-146	46
40	TTTCTTCCCCAGTCATCCTGGAGTT C	H45_1-13_55-67	47
41	GCAGACCTCCTGCCATCCTGGAGT TC	H45_1-13_138-150	48
42	TTCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGA GTTC	H45_1-13_52-66	49
43	CCCCAGTTGCATCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_50-61	50
44	TTCTTCCCCAGTTGCCCTGGAGTT CC	H45_-1-10_52-66	51
45	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGT TCCT	H45_-2-13_52-64	52

46	CAGACCTCCTGCCACTCCTGGAGT TC	H45_1-11_135-149	53
47	TGCAGACCTCCTGCCTCCTGGAGT TC	H45_1-11_137-151	54
48	CTGTTTGCAGACCCATCCTGGAGT TC	H45_1-13_144-156	55
49	TTTGCAGACCTCCTGGAGTTCCTG TA	H45_-5-8_141-153	56
50	CCTGCCACCGCAGATGCCATCCTG GAGTTC	H45_1-15_128-142	57
51	ACCTCCTGCCACCGCTTGCCGCTG CCCAAT	H45_16-30_132-146	58
52	TCCTGTAGAATACCATCCTGGAGT TC	H45_1-13_98-110	59
53	CTCCTGCCACCGCTGGCATCTGTT TT	H45_85-97_132-144	60
54	ACCTCCTGCCACCGCTCTTCCCA GTTGCA	H45_51-65_132-146	61
55	TGGCATCTGTTTTTCATCCTGGAGTT C	H45_1-13_85-97	62
56	TTATTTCTTCCCCAGTTCCTGTAAG A	H45_-8-5_58-70	63
57	GCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTT CC	H45_-1-15_114-123	64
58	GGCTTCCCAATGCCATCCTGGAGT TC	H45_1-15_114-124	65
59	TTTCTGTCTGACAGCTCCTGCCAC CGCAGA	H45_129-143_156- 170	66
60	TCCTGCCACCGCAGAGAGGATTGC TGAATT	H45_69-83_129-143	67
61	TCCTGCCACCGCAGACTGGCATCT	H45_84-98_129-143	68

	GTTTTT		
62	TCCTGCCACCGCAGATTTTCCTGT AGAATA	H45_99-113_129-143	69
63	GCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15	70
64	TTCTTCCCCAGTTGC	H45_52-66	71
65	CAGACCTCCTGCCAC	H45_135-149	72
66	TCCTGGAGTTCCT	H45_-2-11	73
67	GTTTGCCGCTGCC	H45_20-32	74
68	CTCCTGCCACCGCGCCGCTGCCCA AT	H45_16-28_132-144	75

Bảng 1-3

69	ATTCAGGCTTCCCTTCCCCAGTTG CA	H45_51-63_117-129	76
70	TGGAGTTCC	H45_-1-8	77
71	TGGAGTTC	H45_1-8	78
72	CAGTTTGCCGCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_25-34	79
73	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_25-35	80
74	GTTTGCCGCTGCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_20-32	81
75	AACAGTTTGCCCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_26-36	82
76	CAGTTTGCCGCCTGGAGTTC	H45_1-10_25-34	83
77	CAGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	H45_1-11_24-34	84
78	AGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	H45_1-11_24-33	85
79	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	H45_-1-9_25-35	86
80	TGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCC	H45_-1-11_18-29	87
81	CTGCCACCGCAGCCGCTGCCCAAT GC	H45_14-27_130-141	88
82	CCTGGAGTTCC	H45_-1-10	144

83	CAGTTTGCCG	H45_25-34	145
84	ACAGTTTGCCG	H45_25-35	146

Ví dụ 1

Axit 4- $\{[(2S,6R)-6-(4\text{-benzamido-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-4-tritylmorpholin-2-yl]metoxy\}$ -4-oxobutanoic được tải lên nhựa aminopolystyren (Ví dụ tham chiếu 1) hoặc axit 4- $\{[(2S,6R)-6-(5\text{-metyl-2,4-dioxopyrimidin-1-yl)-4-tritylmorpholin-2-yl]metoxy\}$ -4-oxobutanoic được tải lên nhựa aminopolystyren (Ví dụ tham chiếu 2) hoặc axit 4- $\{[(2S,6R)-6-(6\text{-benzamidopurin-9-yl)-4-tritylmorpholin-2-yl]metoxy\}$ -4-oxobutanoic được tải lên nhựa aminopolystyren (Ví dụ tham chiếu 3) hoặc axit 4- $\{[(2S,6R)-6-\{6-(2\text{-xyanoetoxy})-2-[(2\text{-phenoxyaxetyl})amino]purin-9-yl\}-4\text{-tritylmorpholin-2-yl}\}metoxy\}$ -4-oxobutanoic được tải lên nhựa aminopolystyren (Ví dụ tham chiếu 4), mỗi hợp chất tương ứng với đầu tận cùng 5', được nạp với lượng 0,2 g vào cột được lắp bộ lọc để bắt đầu các chu trình tổng hợp dưới đây sử dụng thiết bị tổng hợp axit nucleic (AKTA Oligopilot 10 plus). Để tạo ra trình tự nucleotit của mỗi hợp chất được nêu trong bảng 1, hợp chất morpholino monome mong muốn được bổ sung trong mỗi chu trình kết hợp (xem bảng 2 dưới đây).

Bảng 2

Bước	Chất phản ứng	Thể tích (mL)	Thời gian (phút)
1	Dung dịch khử phong bế	18 đến 32	1,8 đến 3,2
2	Dung dịch trung hòa/rửa	30	1,5
3	Dung dịch kết hợp B	5	0,5
4	Dung dịch kết hợp A	1,3	0,25
5	Phản ứng kết hợp với tác nhân phản ứng được nạp trong các		120 đến 300

	bước 3 và 4		
6	Axetonitril	20	1,0
7	Dung dịch bột đầu	9	2,0
8	Axetonitril	30	2,0

(Lưu ý) Chỉ trong trường hợp axetyl hóa đầu tận cùng 3', các bước 1, 2, 7 và 8 được lặp lại lần nữa sau chu trình cuối cùng.

Cần lưu ý là dung dịch khử phong bế được sử dụng là dung dịch diclometan chứa 3% axit trifloaxetic (khối lượng/thể tích). Dung dịch trung hòa/rửa được sử dụng được điều chế bằng cách hòa tan N,N-diisopropyletylamin ở nồng độ 10% (thể tích/thể tích) và tetrahydrofuran ở nồng độ 5% (thể tích/thể tích) trong dung dịch diclometan chứa 35% (thể tích/thể tích) axetonitril. Dung dịch kết hợp A để sử dụng được điều chế bằng cách hòa tan hợp chất morpholino monome ở nồng độ 0,10M trong tetrahydrofuran. Dung dịch kết hợp B để sử dụng được điều chế bằng cách hòa tan N,N-diisopropyletylamin ở 20% (thể tích/thể tích) và tetrahydrofuran ở 10% (thể tích/thể tích) trong axetonitril. Dung dịch bột đầu để sử dụng được điều chế bằng cách hòa tan anhydrit axetic ở 20% (thể tích/thể tích) và 2,6-lutidin ở 30% (thể tích/thể tích) trong axetonitril.

Nhựa aminopolystyren được tải bằng PMO được tổng hợp như trên được thu gom từ bình phản ứng và được làm khô ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ hoặc lâu hơn trong điều kiện áp suất giảm. PMO đã được làm khô được tải lên nhựa aminopolystyren được nạp vào bình phản ứng và 5 mL dung dịch nước amoniac 28%-etanol (1/4) được bổ sung vào đó, sau đó là 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 còn lại thu được được hòa tan trong 10 mL dung môi hỗn hợp chứa dung dịch đệm 20 mM axit axetic-trietylamin (dung dịch đệm TEAA) và axetonitril (4/1), và sau đó lọc qua màng lọc. Dịch lọc thu được được tinh chế bằng HPLC pha đảo. Các điều kiện được sử dụng là như được thể hiện trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3]

Cột	XBridge 5 μ m C18 (Waters, $\phi 19 \times 50$ mm, 1 CV = 14 mL)
Tốc độ dòng	10 mL/phút
Nhiệt độ cột	nhiệt độ trong phòng
Dung dịch A	Dung dịch đệm TEAA 20 mM
Dung dịch B	CH ₃ CN
Gradient	(B) nồng độ 10% $\rightarrow$ 70%/15 CV

CV (column volume): thể tích cột

Mỗi phân đoạn được phân tích để thu gom sản phẩm mong muốn, sản phẩm này sau đó được cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn thu được được hòa tan bằng dung dịch nước axit phosphoric 2M (0,5 mL) và khuấy trong 15 phút. Hơn nữa, cặn này còn được tạo tính kiềm bằng dung dịch nước natri hydroxit 2M (2mL) và lọc qua màng lọc (0,45 μ m).

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

Bảng 4

Cột	Nguồn 15Q (GE Healthcare, $\phi 10 \times 108$ mm, 1 CV = 8,5 mL)
Tốc độ dòng	8,5 mL/phút
Nhiệt độ cột	nhiệt độ trong phòng
Dung dịch A	Dung dịch nước natri hydroxit 10 mM
Dung dịch B	Dung dịch nước natri hydroxit 10 mM, Dung dịch nước natri clorua 1 M

Gradient	(B) nồng độ 1% → 50%/40 CV
----------	----------------------------

Mỗi phân đoạn được phân tích (bằng HPLC) để thu được sản phẩm mong muốn dưới dạng dung dịch nước. Dung dịch nước thu được được trung hòa bằng dung dịch đệm phosphat 0,1 M (độ pH bằng 6,0) và sau đó được khử muối bằng HPLC pha đảo trong các điều kiện được thể hiện trên bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Cột	XBridge 5 μ m C8 (Waters, $\phi 10 \times 50$ 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) nồng độ 0% → 50%/20 CV

Sản phẩm mong muốn được thu gom và cô trong điều kiện áp suất giảm. Phần cặn thu được được hòa tan trong nước và được làm đông khô để thu được hợp chất mong muốn dưới dạng chất rắn kết bông màu trắng. Giá trị tính được và giá trị đo được của ESI-TOF-MS được thể hiện trên bảng 6.

Bảng 6-1

PMO số.	Trình tự nucleotit	Giá trị tính được	Giá trị đo được
1	TTGCCGCTGCCCACATCCTGGAGT TC	8520,95	8520,65
2	GTTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTC	8542,94	8542,57

	CT		
3	GCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTC CT	8505,95	8506,57
4	CCGCTGCCCCAATGTCCTGGAGTTC CT	8520,95	8521,37
5	TTGCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTC CT	8511,94	8511,70
6	TTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC CT	8526,94	8527,07
7	TTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTCC	7857,71	7857,32
8	TGCCGCTGCCCCGCCATCCTGGAGT TC	8521,95	8521,98
9	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	7897,72	7897,71
10	CAGTTTGCCGCTGCCCACATCCTGGA GTTCT	9851,40	9851,60
11	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC CT	8551,95	8551,80
12	GTTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTT C	8236,84	8236,69
13	CAGTTTGCCGCTGCTGGAGTTCCT	7921,73	7921,91
14	ACAGTTTGCCGCTCTGGAGTTCCT	7905,73	7905,53
15	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCT	7906,73	7906,65
16	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	7567,61	7567,35
17	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCT G	8261,85	8261,67
18	CCGCTGCCCCAATGTGGAGTTCCTG T	8245,85	8245,68
19	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	7906,73	7906,70
20	CCGCTGCCCCAATCTGGAGTTCCT	7520,61	7520,60
21	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC C	8221,84	8221,48

22	TTGCCGCTGCCCCACTGGAGTTCCT	7866,72	7866,77
23	TTGCCGCTGCCCCACTGGAGTTCCT GT	8551,95	8552,23
24	ACAGTTTGCCGCCTGGAGTTCC	7245,51	7245,48
25	GTTTGCCGCTGC	3912,36	3912,16
26	CCTGGAGTTCCT	3896,36	3896,12
27	TGGAGTTCCT	3266,14	3265,99
28	CAGTTTGCCGCTGCCC	5196,81	5196,30
29	TCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAG TT	8510,93	8511,8
30	AGACCTCCTGCCACCATCCTGGAG TT	8513,95	8513,72
31	TTCTTCCCCAGTTGCGCCATCCTGG AGTTC	9826,39	9826,15
32	CAGACCTCCTGCCACGCCATCCTG GAGTTC	9814,41	9813,82
33	GACCTCCTGCCACCATCCTGGAGT TC	8489,95	8490,01

Bảng 6-2

34	TCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGT TC	8520,95	8520,97
35	GACCTCCTGCCGCCATCCTGGAGT TC	8505,95	8506,48
36	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGT TC	8495,94	8495,43
37	TTCCCCAGTTGCACATCCTGGAGT TC	8519,95	8520,35

38	CCTCCTGCCACCGCATCCTGGAGT TC	8465,94	8466,23
39	ACCTCCTGCCACCCATCCTGGAGT TC	8449,94	8449,88
40	TTTCTTCCCCAGTCATCCTGGAGT TC	8485,93	8486,01
41	GCAGACCTCCTGCCATCCTGGAGT TC	8529,96	8529,54
42	TTCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGA GTTC	9156,16	9156,62
43	CCCCAGTTGCATCTGGAGTTCCT	7535,61	7535,92
44	TTCTTCCCCAGTTGCCCTGGAGTT CC	8486,93	8486,27
45	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGT TCCT	9141,16	9141,18
46	CAGACCTCCTGCCACTCCTGGAGT TC	8489,95	8489,65
47	TGCAGACCTCCTGCCTCCTGGAGT TC	8520,95	8520,58
48	CTGTTTGCAGACCCATCCTGGAGT TC	8559,96	8560,66
49	TTTGCAGACCTCCTGGAGTTCCTG TA	8574,96	8574,85
50	CCTGCCACCGCAGATGCCATCCTG GAGTTC	9854,42	9854,07
51	ACCTCCTGCCACCGCTTGCCGCTG CCCAAT	9750,39	9750,67
52	TCCTGTAGAATACCATCCTGGAGT TC	8567,97	8567,11
53	CTCCTGCCACCGCTGGCATCTGTT TT	8486,93	8486,39

54	ACCTCCTGCCACCGCTCTTCCCCA GTTGCA	9725,38	9725,57
55	TGGCATCTGTTTTTCATCCTGGAGT TC	8580,95	8580,81
56	TTATTTCTTCCCCAGTTCCTGTAAG A	8508,94	8508,7
57	GCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTT CC	8504,95	8504,88
58	GGCTTCCCAATGCCATCCTGGAGT TC	8544,96	8544,72
59	TTTCTGTCTGACAGCTCCTGCCAC CGCAGA	9844,41	9844,1
60	TCCTGCCACCGCAGAGAGGATTG CTGAATT	9957,45	9957,8
61	TCCTGCCACCGCAGACTGGCATCT GTTTTT	9850,4	9850,45
62	TCCTGCCACCGCAGATTTTCCTGT AGAATA	9867,42	9867,85
63	GCCATCCTGGAGTTC	4905,71	4905,02
64	TTCTTCCCCAGTTGC	4831,68	4831,14
65	CAGACCTCCTGCCAC	4819,7	4819,64
66	TCCTGGAGTTCCT	4226,47	4226,03
67	GTTTGCCGCTGCC	4227,47	4227,48
68	CTCCTGCCACCGCGCCGCTGCCCA AT	8435,93	8436,58

Bảng 6-3

69	ATTCAGGCTTCCCTTCCCCAGTTG	8479,93	8479,03
----	--------------------------	---------	---------

	CA		
70	TGGAGTTCC	2936,03	2936,07
71	TGGAGTTC	2620,92	2620,97
72	CAGTTTGCCGCCTGGAGTTCC	6906,39	6906,44
73	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCCT	7260,51	7260,67
74	GTTTGCCGCTGCCTGGAGTTCC	7252,5	7252,48
75	AACAGTTTGCCCCTGGAGTTCC	7229,51	7229,07
76	CAGTTTGCCGCCTGGAGTTC	6591,28	6591,07
77	CAGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	7236,5	7236,76
78	AGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	6921,39	6921,06
79	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	6930,4	6930,42
80	TGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCC	7851,72	7852,1
81	CTGCCACCGCAGCCGCTGCCCAAT	8484,96	8484,68
	GC		
82	CCTGGAGTTCC	3566,25	3566,51
83	CAGTTTGCCG	3251,14	3251,19
84	ACAGTTTGCCG	3590,26	3590,04

Ví dụ thử nghiệm 1

Thử nghiệm *in vitro*

Mỗi oligome đối nghĩa được thể hiện trong bảng 1 được chuyển nhiễm ở nồng độ 1 đến 10 μM vào $3,5 \times 10^5$ tế bào RD (dòng tế bào sacom cơ vân của người), thông qua Nucleofector II (Lonza) sử dụng kit Amaxa Cell Line Nucleofector L. Chương trình được sử dụng là T-030.

Sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được nuôi cấy trong ba đêm ở 37°C trong điều kiện 5% CO_2 trong 2 mL môi trường thiết yếu tối thiểu Eagle (Eagle's minimal essential medium - EMEM) (SIGMA; dưới đây được gọi là môi trường EMEM) chứa 10% huyết thanh thai bò (fetal bovine serum - FBS) (Invitrogen).

Sau khi các tế bào được rửa một lần bằng PBS (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Japan; dưới đây được gọi là môi trường PBS), 350 μ L dung dịch đệm RLT (QIAGEN) chứa 1% 2-mercaptoethanol (Nacalai Tesque, Inc., Japan) được bổ sung vào các tế bào, và các tế bào này được dung giải bằng cách để yên ở nhiệt độ trong phòng trong vài phút. Dịch dung giải tế bào được thu gom vào thiết bị làm đồng nhất QIAshredder (QIAGEN) và được ly tâm ở tốc độ 15000 vòng/phút trong 2 phút để tạo ra dịch đồng nhất. ARN toàn bộ được chiết ra theo phương thức gắn kèm với kit RNeasy Mini (QIAGEN). Nồng độ của ARN toàn bộ chiết được đo bằng quang phổ kế NanoDrop ND-1000 (LMS Co., Ltd., Japan).

RT-PCR một bước được thực hiện trên 400 ng ARN toàn bộ chiết được sử dụng kit QIAGEN OneStep RT-PCR (QIAGEN). Dung dịch phản ứng được chuẩn bị theo phương pháp đi kèm với kit. Bộ tuần hoàn nhiệt được sử dụng là PTC-100 (MJ Research) hoặc TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio Inc., Japan). Chương trình RT-PCR được sử dụng là như được thể hiện dưới đây.

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

95°C trong 15 phút: hoạt hóa polymeraza, vô hoạt transcriptaza ngược, biến tính nhiệt cADN

[94°C trong 30 giây; 60°C trong 30 giây; 72 °C trong 1 phút] $\times$ 35 chu trình:
Khuếch đại PCR

72°C trong 10 phút: phản ứng kéo dài cuối cùng

Các trình tự nucleotit của đoạn xuôi và đoạn ngược được sử dụng cho RT-PCR là như được thể hiện dưới đây.

Mũi xuôi: 5'-GCTCAGGTCGGATTGACATT-3' (SEQ ID NO: 1)

Mũi ngược: 5'-GGGCAACTCTTCCACCAGTA-3' (SEQ ID NO: 2)

Sản phẩm phản ứng PCR nêu trên (1 μ L) được phân tích bằng cách sử dụng Bioanalyzer (Agilent) và hệ thống MultiNA (Shimadzu Corporation, Japan).

Polynucleotit mức “A” trong sợi có sự bỏ qua exon 45 và polynucleotit mức “B” trong sợi không có sự bỏ qua exon 45 được đo. Dựa trên các giá trị đo được “A” và “B” này, hiệu suất bỏ qua được xác định theo phương trình dưới đây:

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

Kết quả thử nghiệm

Các kết quả thu được được thể hiện trên các Fig từ Fig.1 đến Fig.5, Fig.8, Fig.10, Fig.11 và Fig.16 đến Fig.24. Thử nghiệm này chỉ ra rằng oligome theo sáng chế gây ra một cách hữu hiệu sự bỏ qua exon 45.

Ví dụ thử nghiệm 2

Thử nghiệm *in vitro*

Quy trình tương tự như được thể hiện trong ví dụ thử nghiệm 1 được lặp lại để thực hiện thử nghiệm này, ngoại trừ việc $3,5 \times 10^5$ tế bào RD (dòng tế bào sacom cơ vân của người) được chuyển nhiễm với oligome theo sáng chế một mình (PMO số 11 hoặc PMO số 9) hoặc với hai oligome đơn vị cấu thành oligome theo sáng chế hoặc với hỗn hợp của chúng ở nồng độ 3 μ M thông qua Nucleofector II (Lonza) sử dụng kit Amaxa Cell Line Nucleofector L. Chương trình được sử dụng là T-030. Các kết hợp của các trình tự được chuyển nhiễm là như được thể hiện dưới đây.

Bảng 7

Các kết hợp của các trình tự được chuyển nhiễm

Kết hợp trình tự	Nồng độ chuyển nhiễm (μM)
PMO số 11 (PMO số 27 và PMO số 28 được kết nối với nhau)	3 μM
PMO số 27	3 μM
PMO số 28	3 μM
Mỗi PMO số 27 và PMO số 28	3 μM mỗi loại
PMO số 9 (PMO số 25 và PMO số 26 được kết nối với nhau)	3 μM
PMO số 25	3 μM
PMO số 26	3 μM
PMO số 25 và PMO số 26	3 μM mỗi loại
PMO số 72 (PMO số 82 và PMO số 83 được kết nối với nhau)	3 μM
PMO số 82	3 μM
PMO số 83	3 μM
PMO số 82 và PMO số 83	3 μM mỗi loại

Kết quả thử nghiệm

Các kết quả thu được được thể hiện trên Fig.6 và Fig.25. Thử nghiệm này chỉ ra rằng oligome theo sáng chế, tức là, PMO số 11 (SEQ ID NO: 10), PMO số 9 (SEQ ID NO: 8) hoặc PMO số 72 (SEQ ID NO: 79), mỗi loại gồm hai oligome đối nghĩa được kết nối với nhau hướng đích các vị trí khác nhau trong exon 45, tạo ra sự bỏ qua exon 45 với hiệu suất cao hơn khi so sánh với từng oligome đối nghĩa tương ứng cấu thành mỗi oligome (tức là, PMO số 27 (SEQ ID NO: 36), PMO số 28 (SEQ ID NO: 37), PMO số 25 (SEQ ID NO: 34), PMO số 26 (SEQ ID NO: 35), PMO số 82 (SEQ ID NO: 144) hoặc PMO số 83 (SEQ ID NO: 145)) hoặc hỗn hợp của chúng (tức là, PMO số 27 và

PMO số 28, PMO số 25 và PMO số 26, hoặc PMO số 82 và PMO số 83).

Ví dụ thử nghiệm 3

Thử nghiệm *in vitro*

Thử nghiệm này được thực hiện bằng cách sử dụng các oligome đối nghĩa dưới dạng 2'-O-metoxi-phosphorothioat (2'-OMe-S-RNA) được thể hiện trên các trình tự SEQ ID NO: 89 đến 141, 11 và 12. Các oligome đối nghĩa khác nhau này được mua từ Japan Bio Services Co., Ltd. để sử dụng cho thử nghiệm. Các trình tự của các oligome đối nghĩa khác nhau này được thể hiện như dưới đây.

Bảng 8-1

Tên trình tự	Trình tự nucleotit	SEQ ID NO:
H45_1-15_48-62	UCCCCAGUUGCAUUCGCCAUCCUG GAGUUC	89
H45_1-15_56-70	UUAUUUCUUCCCCAGGCCAUCCUG GAGUUC	90
H45_1-15_131-145	CCUCCUGCCACCGCAGCCAUCCUG GAGUUC	91
H45_-2-13_131-145	CCUCCUGCCACCGCACAUCCUGGA GUUCCU	92
H45_-2-13_135-149	CAGACCUCCUGCCACCAUCCUGGA GUUCCU	93
H45_-2-13_48-62	UCCCCAGUUGCAUUCCAUCCUGGA GUUCCU	94
H45_-2-13_52-66	UUCUUCCCCAGUUGCCAUCCUGGA GUUCCU	95
H45_-2-13_56-70	UUAUUUCUUCCCCAGCAUCCUGGA GUUCCU	96

H45_-2-13_18-32	GUUUGCCGCUGCCCACAUCCUGGA GUUCCU	97
H45_-2-13_139-153	UUUGCAGACCUCUGCAUCCUGGA GUUCCU	98
H45_1-17_135-147	GACCUCUGCCACAUGCCAUCCUG GAGUUC	99
H45_1-17_52-64	CUUCCCCAGUUGCAUGCCAUCCUG GAGUUC	100
H45_1-15_139-153	UUUGCAGACCUCUGGCCAUCCUG GAGUUC	101
H45_-2-13_99-113	UUUUCCUGUAGAAUACAUCCUGGA GUUCCU	102
H45_53-67_132-146	ACCUCUGGCCACCGCUUUCUUCCC CAGUUG	103
H45_16-30_99-113	UUUUCCUGUAGAAUAUUGCCGCUG CCCAAU	104
H45_1-15_153-167	CUGUCUGACAGCUGUGCCAUCCUG GAGUUC	105
H45_1-15_67-81	GGAUUGCUGAAUUAUGCCAUCCUG GAGUUC	106
H45_1-15_99-113	UUUUCCUGUAGAAUAGCCAUCCUG GAGUUC	107
H45_1-13_46-58	CAGUUGCAUUCAACAUCCUGGAGU UC	108
H45_1-13_54-66	UUCUUCCCCAGUUCAUCCUGGAGU UC	109
H45_1-13_62-74	UGAAUUAUUUCUUCAUCCUGGAGU UC	110
H45_6-18_46-58	CAGUUGCAUUCAAAUGCCAUCCU GG	111
H45_6-18_54-66	UUCUUCCCCAGUUAUUGCCAUCCU	112

	GG	
H45_6-18_62-74	UGAAUUAUUUCUAAUGCCAUCCU GG	113
H45_1-13_121-133	GCAGAUUCAGGCUCAUCCUGGAGU UC	114
H45_1-13_129-141	CUGCCACCGCAGACAUCCUGGAGU UC	115
H45_1-13_137-149	CAGACCUCCUGCCCAUCCUGGAGU UC	116
H45_6-18_121-133	GCAGAUUCAGGCUAAUGCCAUCCU GG	117
H45_6-18_129-141	CUGCCACCGCAGAAAUGCCAUCCU GG	118
H45_6-18_137-149	CAGACCUCCUGCCAAUGCCAUCCU GG	142
H45_16-28_116-128	UUCAGGCUUCCCAGCCGCUGCCCA AU	119
H45_16-28_124-136	ACCGCAGAUUCAGGCCGCUGCCCA AU	120

Bảng 8-2

H45_16-28_132-144	CUCCUGCCACCGCGCCGCUGCCCA AU	121
H45_26-38_116-128	UUCAGGCUUCCCAACAACAGUUUG CC	122
H45_26-38_124-136	ACCGCAGAUUCAGACAACAGUUUG CC	123
H45_26-38_132-	CUCCUGCCACCGCACAACAGUUUG	124

144	CC	
H45_51-63_110-122	CUUCCCAAUUUUUUUCCCCAGUUG CA	125
H45_51-63_117-129	AUUCAGGCUUCCCUUCCCCAGUUG CA	126
H45_51-63_124-136	ACCGCAGAUUCAGUUCCCCAGUUG CA	127
H45_60-72_110-122	CUUCCCAAUUUUUAAUUAUUUCUU CC	128
H45_60-72_117-129	AUUCAGGCUUCCCAAUUAUUUCUU CC	129
H45_60-72_124-136	ACCGCAGAUUCAGAAUUAUUUCUU CC	130
H45_68-80_110-122	CUUCCCAAUUUUUGAUUGCUGAAU UA	131
H45_68-80_117-129	AUUCAGGCUUCCCGAUUGCUGAAU UA	132
H45_68-80_124-136	ACCGCAGAUUCAGGAUUGCUGAAU UA	133
H45_-10-5_52-66	UUCUUCCCCAGUUGCAGUUCCUGU AAGAUA	134
H45_-10-5_135-149	CAGACCUCCUGCCACAGUUCCUGU AAGAUA	135
H45_69-83_95-109	CCUGUAGAAUACUGGGAGGAUUGC UGAAUU	136
H45_16-30_84-98	CUGGCAUCUGUUUUUUUGCCGCUG CCCAAU	137
H45_16-30_53-67	UUUCUUCCCCAGUUGUUGCCGCUG CCCAAU	138
H45_1-15_84-98	CUGGCAUCUGUUUUUGCCAUCCUG GAGUUC	139

H45_84-98_132-146	ACCUCCUGCCACCGCCUGGCAUCU GUUUUU	140
H45_53-67_99-113	UUUUCCUGUAGAAUAUUCUCCCC CAGUUG	141
H45_1-15_52-66	UUCUCCCCAGUUGCGCCAUCCUG GAGUUC	11
H45_1-15_135-149	CAGACCUCCUGCCACGCCAUCCUG GAGUUC	12

Trong các đĩa 24 lỗ, 5×10^4 tế bào RD (dòng tế bào sacom cơ vân của người) được cho vào mỗi lỗ và nuôi cấy qua đêm ở 37°C trong điều kiện 5% CO₂ trong 0,5 mL môi trường thiết yếu tối thiểu Eagle (EMEM) (SIGMA; dưới đây được gọi là môi trường EMEM) chứa 10% huyết thanh thai bò (fetal calf serum - FCS) (Invitrogen). Các oligome đối nghĩa khác nhau nêu trên để bỏ qua exon 45 (Japan Bio Services Co., Ltd., Japan) (1 μ M hoặc 300 nM) được tạo thành các thể liên hợp với Lipofectamine 2000 (Invitrogen), và mỗi thể liên hợp được bổ sung vào các tế bào RD, mà đã được thay thế trong 0,45 mL môi trường mới, với thể tích 50 μ L trên lỗ để thu được nồng độ cuối cùng là 100 nM hoặc 30 nM.

Sau khi bổ sung, các tế bào được nuôi cấy qua đêm. Sau khi các tế bào được rửa một lần bằng PBS (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Japan; dưới đây được gọi là môi trường PBS), 350 μ L dung dịch đệm RLT (QIAGEN) chứa 1% 2-mercaptoetanol (Nacalai Tesque, Inc., Japan) được bổ sung vào các tế bào, và các tế bào này được dung giải bằng cách để yên ở nhiệt độ trong phòng trong vài phút. Dịch dung giải tế bào được thu gom vào thiết bị làm đồng nhất QIAshredder (QIAGEN) và được ly tâm ở tốc độ 15000 vòng/phút trong 2 phút để tạo ra dịch đồng nhất. ARN toàn bộ được chiết ra theo phương thức gắn kèm với kit RNeasy Mini (QIAGEN). Nồng độ của ARN toàn bộ chiết được đo bằng quang phổ kế NanoDrop ND-1000 (LMS Co., Ltd., Japan).

RT-PCR một bước được thực hiện trên 400 ng ARN toàn bộ chiết được sử dụng

kit QIAGEN OneStep RT-PCR (QIAGEN). Dung dịch phản ứng được chuẩn bị theo phương pháp đi kèm với kit. Bộ tuần hoàn nhiệt được sử dụng là PTC-100 (MJ Research) hoặc TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio Inc., Japan). Chương trình RT-PCR được sử dụng là như được thể hiện dưới đây.

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

95°C trong 15 phút: hoạt hóa polymeraza, vô hoạt transcriptaza ngược, biến tính nhiệt cADN

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

72°C trong 10 phút: phản ứng kéo dài cuối cùng

Các trình tự nucleotit của đoạn xuôi và đoạn ngược được sử dụng cho RT-PCR là như được thể hiện dưới đây.

Mũi xuôi: 5'-GCTCAGGTCGGATTGACATT-3' (SEQ ID NO: 1)

Mũi ngược: 5'-GGGCAACTCTTCCACCAGTA-3' (SEQ ID NO: 2)

Sản phẩm phản ứng PCR nêu trên (1 µL) được phân tích bằng cách sử dụng Bioanalyzer (Agilent) và hệ thống MultiNA (Shimadzu Corporation, Japan).

Polynucleotit mức "A" trong sợi có sự bỏ qua exon 45 và polynucleotit mức "B" trong sợi không có sự bỏ qua exon 45 được đo. Dựa trên các giá trị đo được "A" và "B" này, hiệu suất bỏ qua được xác định theo phương trình dưới đây:

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

Kết quả thử nghiệm

Các kết quả thu được được thể hiện trên các Fig.7 và Fig.12 đến Fig.15. Thử nghiệm này chỉ ra rằng oligome đối nghĩa theo sáng chế gây ra một cách hữu hiệu sự bỏ qua exon 45.

Ví dụ thử nghiệm 4

Thử nghiệm *in vitro*

Quy trình tương tự như được thể hiện trong ví dụ thử nghiệm 1 được lặp lại để thực hiện thử nghiệm này, ngoại trừ việc $3,5 \times 10^5$ tế bào RD (dòng tế bào sacom cơ vân của người) được chuyển nhiễm với oligome theo sáng chế một mình (PMO số 2, PMO số 31 hoặc PMO số 32) hoặc với hai oligome đơn vị cấu thành oligome theo sáng chế ở nồng độ 3 μM hoặc 10 μM thông qua Nucleofector II (Lonza) sử dụng kit Amaxa Cell Line Nucleofector L. Chương trình được sử dụng là T-030. Các kết hợp của các trình tự được chuyển nhiễm là như được thể hiện dưới đây.

Bảng 9

Trình tự	Nồng độ chuyển nhiễm
PMO số 2 (PMO số 66 và PMO số 67 được kết nối với nhau)	3 μM hoặc 10 μM
PMO số 66	3 μM hoặc 10 μM
PMO số 67	3 μM hoặc 10 μM
PMO số 31 (PMO số 63 và PMO số 64 được kết nối với nhau)	3 μM hoặc 10 μM
PMO số 63	3 μM hoặc 10 μM
PMO số 64	3 μM hoặc 10 μM
PMO số 32 (PMO số 63 và PMO số 65 được kết nối với nhau)	3 μM hoặc 10 μM
PMO số 65	3 μM hoặc 10 μM

Kết quả thử nghiệm

Kết quả thu được được thể hiện trên Fig.9. Thử nghiệm này chỉ ra rằng oligome theo sáng chế, tức là, PMO số 2 (SEQ ID NO: 7), PMO số 31 (SEQ ID NO: 11) và PMO số 32 (SEQ ID NO: 12), mỗi loại gồm hai axit nucleic đối nghĩa được kết nối với nhau hướng đích các vị trí khác nhau trong exon 45, tạo ra sự bỏ qua exon 45 với hiệu suất cao hơn khi so sánh với từng axit nucleic đối nghĩa tương ứng cấu thành mỗi oligome (tức là, PMO số 66, PMO số 63, PMO số 64 hoặc PMO số 65).

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Như có thể được thấy từ các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong các ví dụ thử nghiệm, oligome theo sáng chế bao gồm các oligome ngắn được kết nối với nhau đã được phát hiện là gây ra sự bỏ qua exon 45 trong các tế bào RD. Do đó, oligome theo sáng chế là rất hữu dụng trong việc điều trị DMD.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Oligome đối nghĩa có độ dài từ 14 đến 32 bazơ gồm hai oligome đơn vị được kết nối với nhau được chọn từ nhóm bao gồm từ oligome (a) đến oligome (e) được thể hiện dưới đây, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó, trong đó hai oligome đơn vị này là không tiếp giáp nhau và không chồng lấn với nhau:

(a) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí -5 đến 15 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người;

(b) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí 48 đến 70 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người;

(c) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí 128 đến 150 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người;

(d) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí 15 đến 40 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người; và

(e) oligome đơn vị gồm trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit gồm 7 đến 16 bazơ tiếp giáp nhau được chọn từ trình tự nucleotit nằm ở các vị trí 110 đến 125 từ đầu tận cùng 5' của exon 45 trong gen dystrophin người.

2. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 1, trong đó một trong số hai oligome đơn vị này là oligome (a).

3. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó oligome này gồm một trình tự nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 7 đến 12, 14 đến 33, 40 đến 52, 57, 64, 65 và 79 đến 86.

4. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó oligome này gồm một trình tự nucleotit bất kỳ được

chọn từ nhóm bao gồm các trình tự SEQ ID NO: 8, 10, 25, 30, 33, 79 và 80.

5. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó oligome này là oligonucleotit.

6. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 5, trong đó ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit được cải biến ở gốc đường và/hoặc ở gốc liên kết phosphat.

7. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 5 hoặc 6, trong đó gốc đường của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit là riboza trong đó nhóm -OH ở vị trí số 2' được thay thế bằng nhóm bất kỳ được chọn từ 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).

8. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 6 hoặc 7, trong đó gốc liên kết phosphat của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit là gốc bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm liên kết phosphorothioat, liên kết phosphorodithioat, liên kết alkylphosphonat, liên kết phosphoroamidat và liên kết boranophosphat.

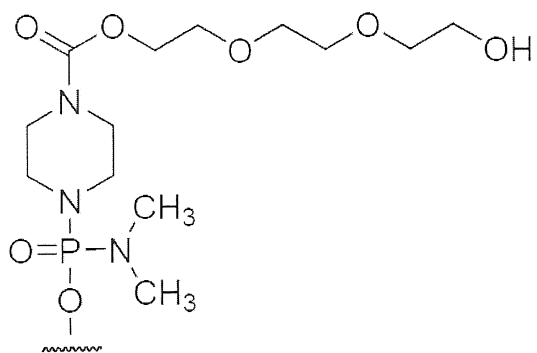
9. Oligome đối nghĩa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó oligome này là morpholino oligome, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

10. Oligome đối nghĩa theo điểm 9, trong đó oligome này là phosphorodiamidat morpholino oligome, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

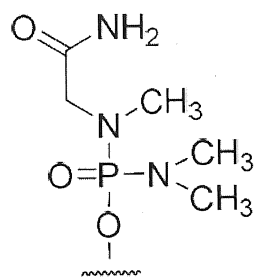
11. Oligome đối nghĩa theo điểm 4, trong đó oligome này là phosphorodiamidat morpholino oligome hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

12. Oligome đối nghĩa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó đầu tận cùng 5' của nó là nhóm bất kỳ trong số các nhóm được biểu thị bằng các công thức hóa học (1) đến (3) được thể hiện dưới đây, hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó

[Công thức 25]



(1)



(2)



(3)

13. Dược phẩm để điều trị bệnh loạn dưỡng cơ, trong đó dược phẩm này chứa oligome đối nghĩa hoặc muối dược dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 12 làm thành phần hoạt tính.

14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó dược phẩm này còn chứa chất mang dược dụng.

Fig. 1

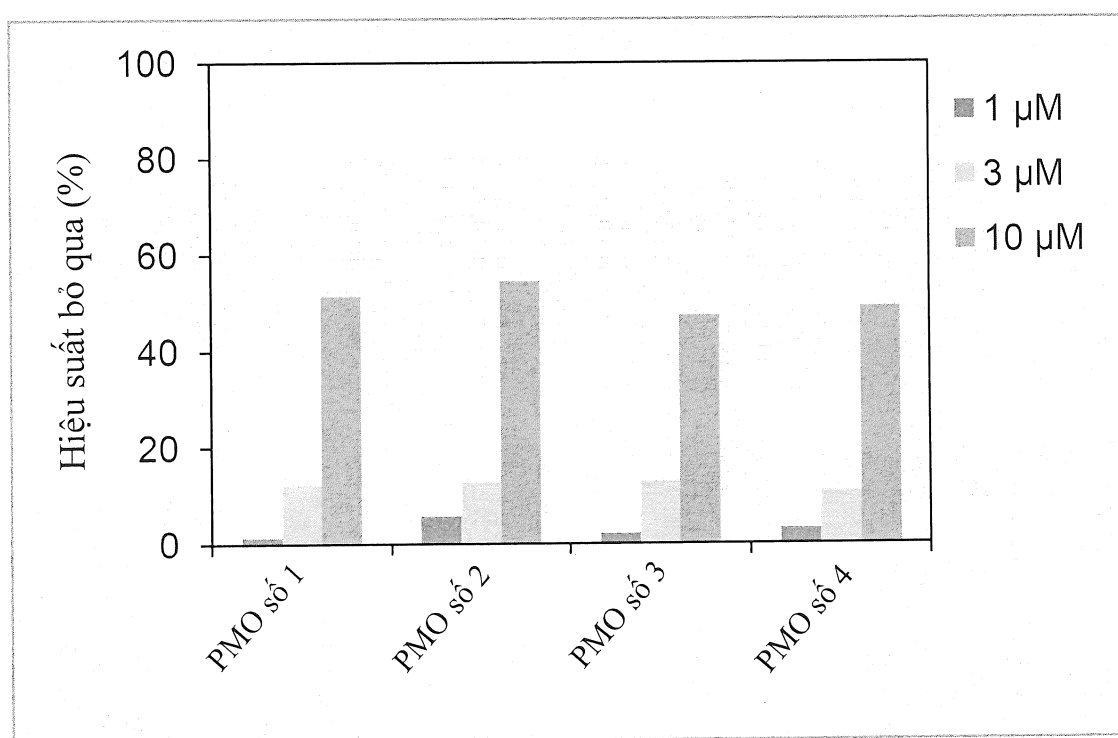


Fig. 2

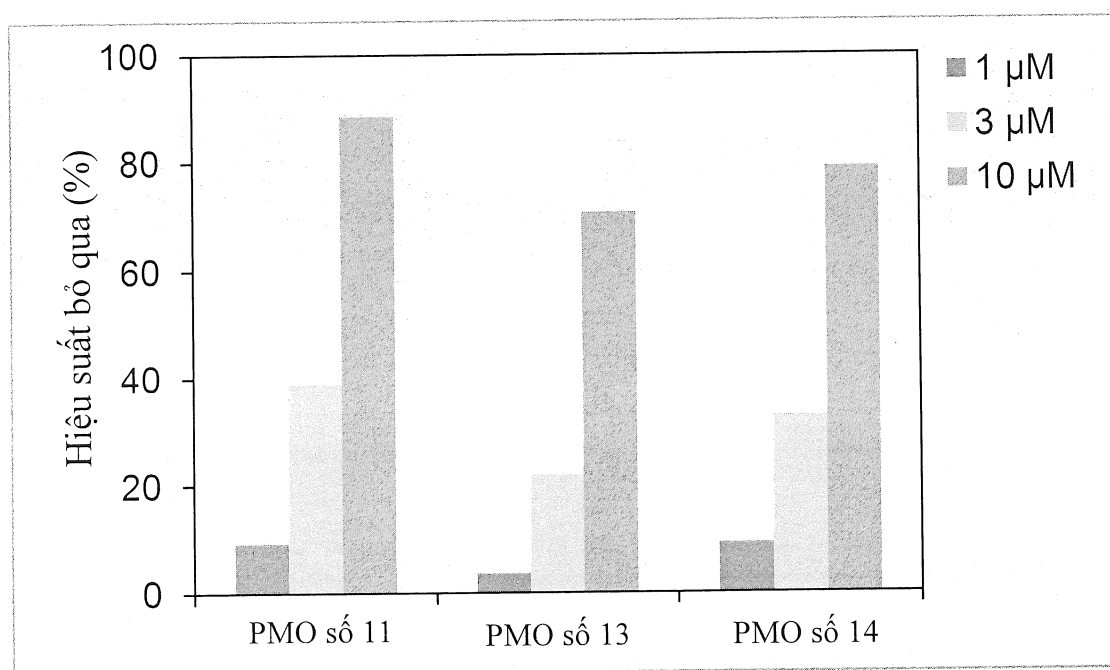


Fig. 3

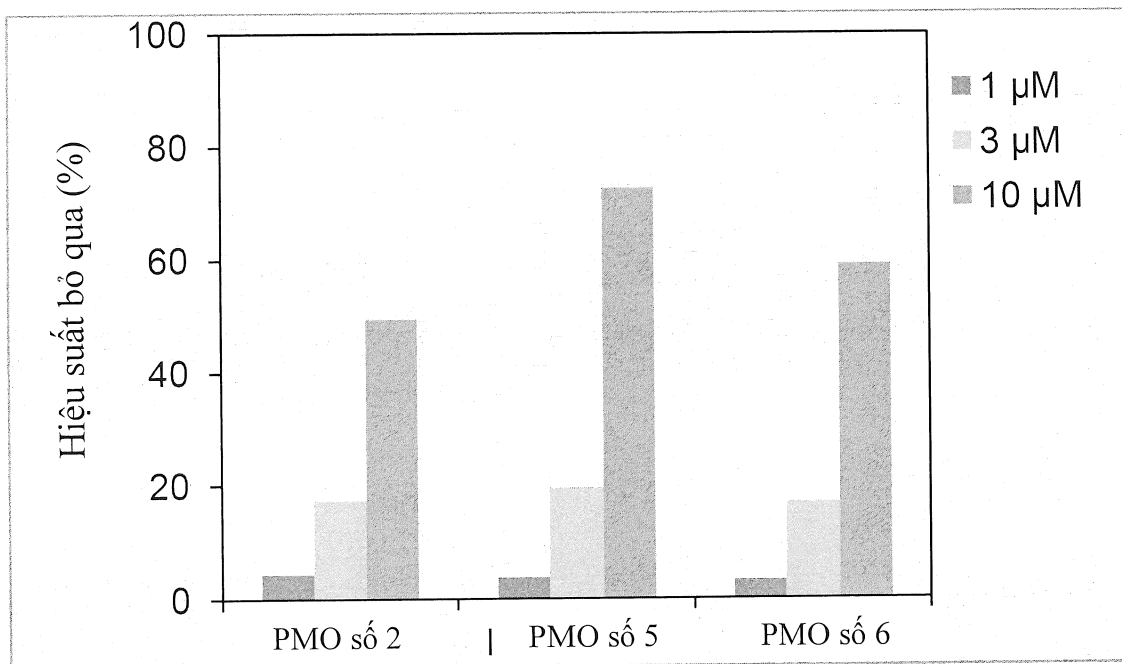


Fig. 4

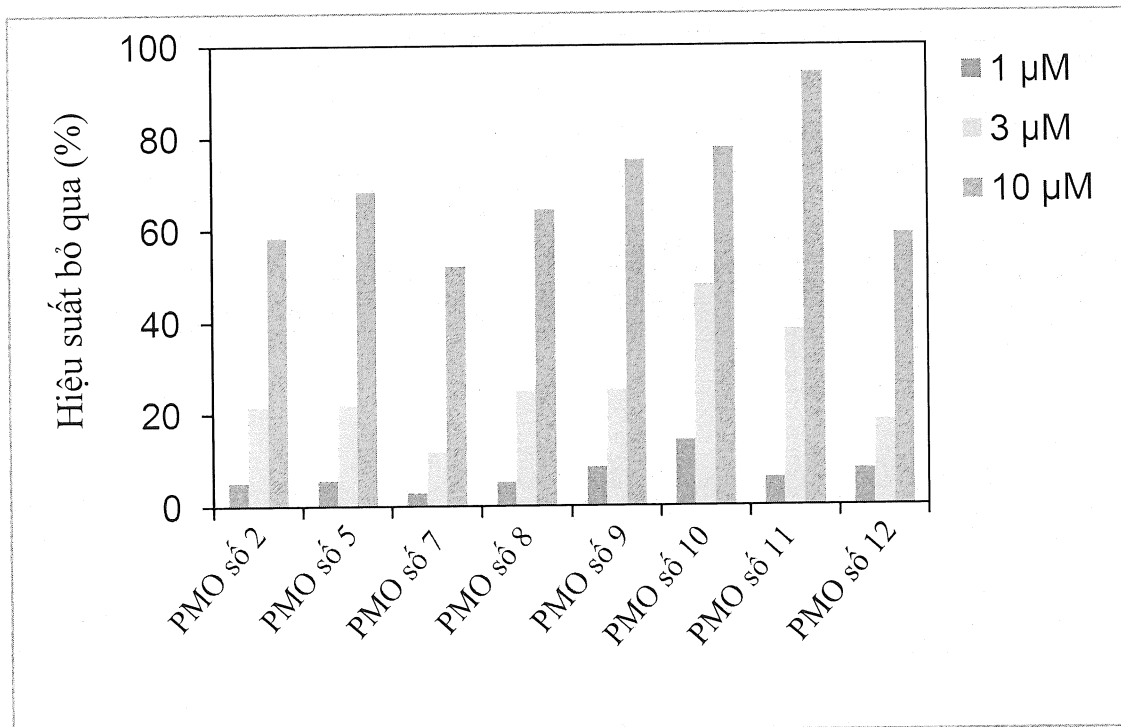


Fig. 5

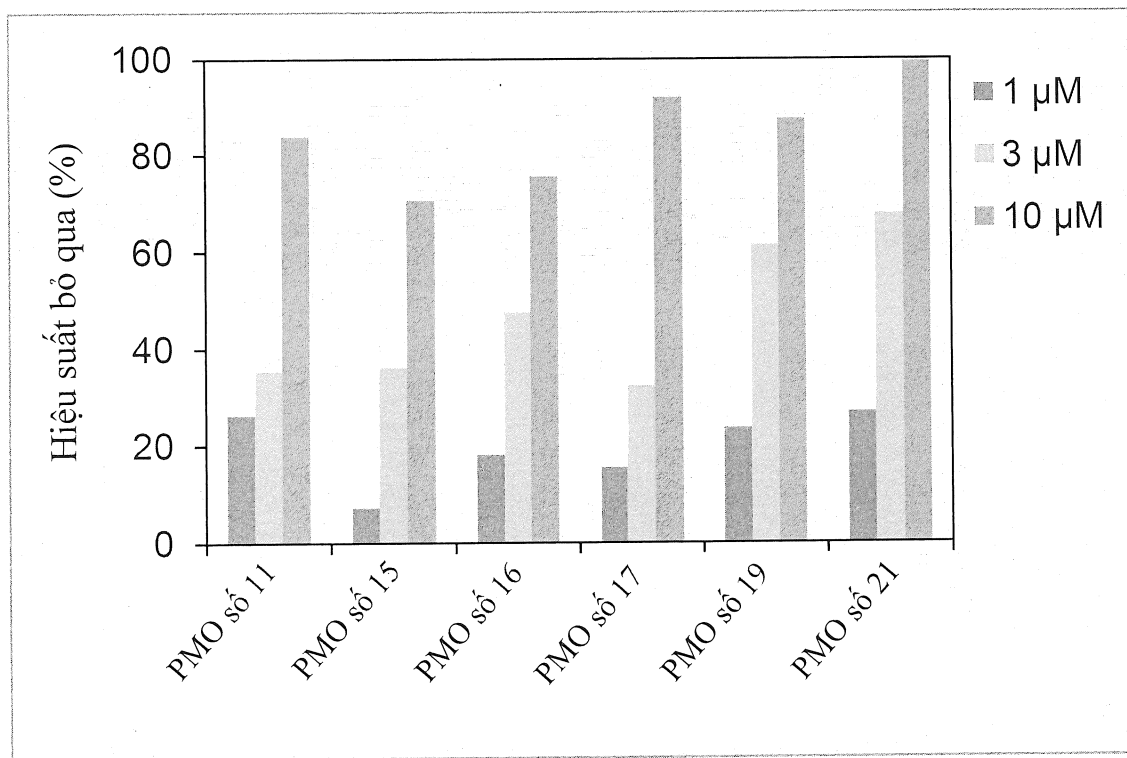


Fig. 6

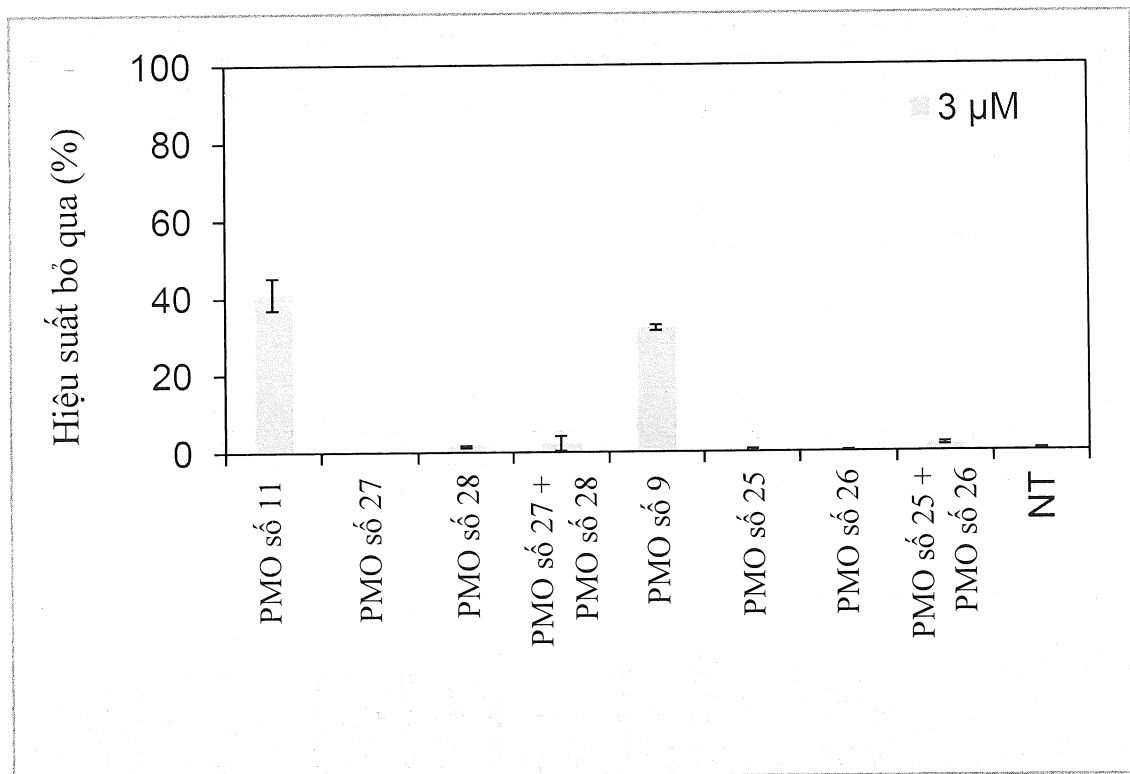


Fig. 7

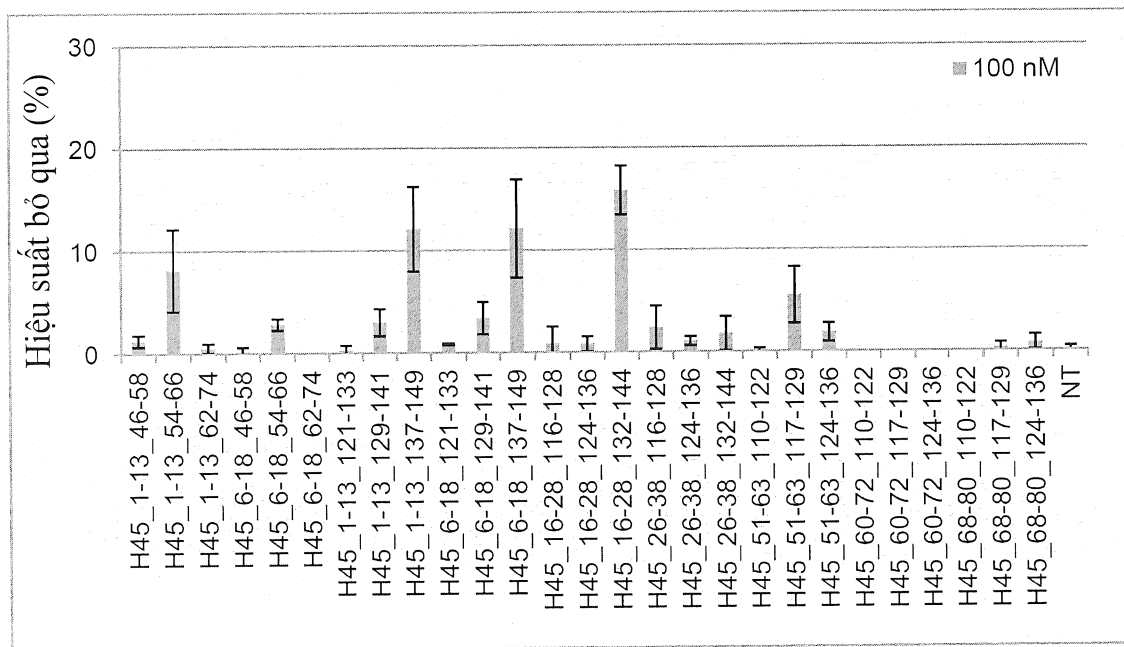


Fig. 8

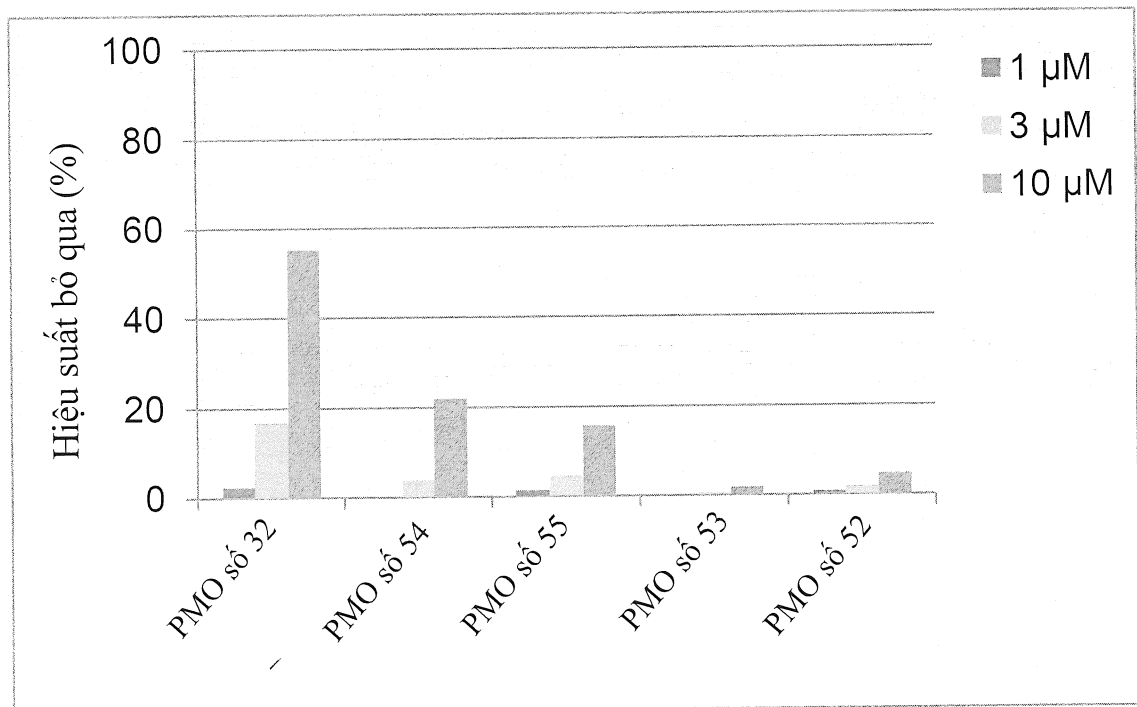


Fig. 9

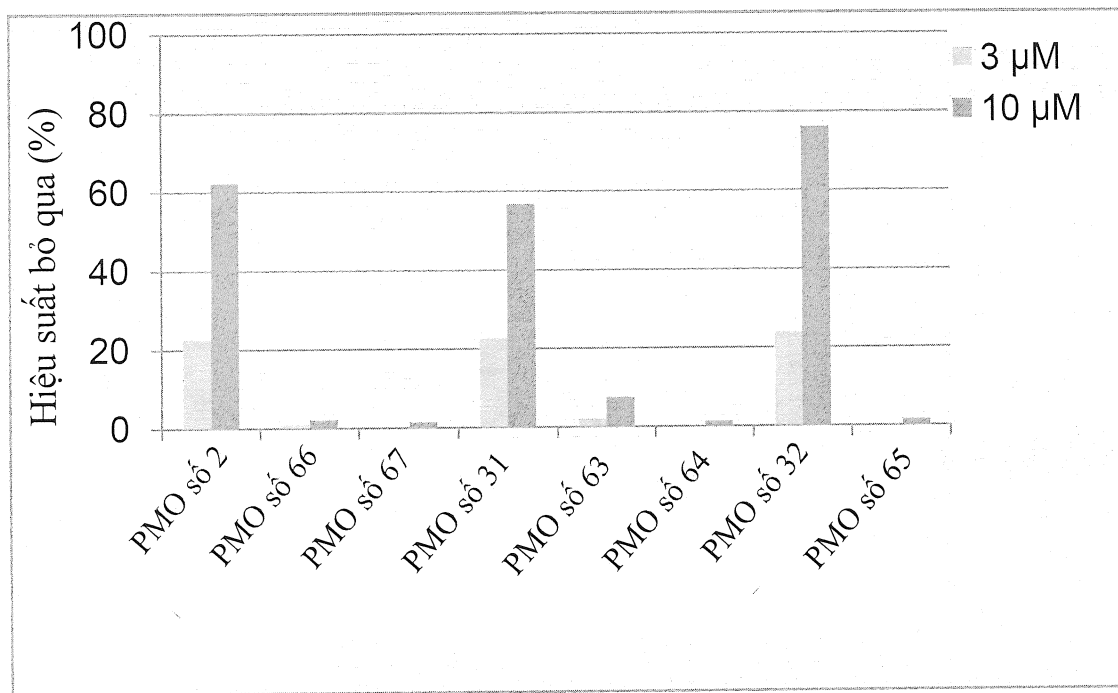


Fig. 10

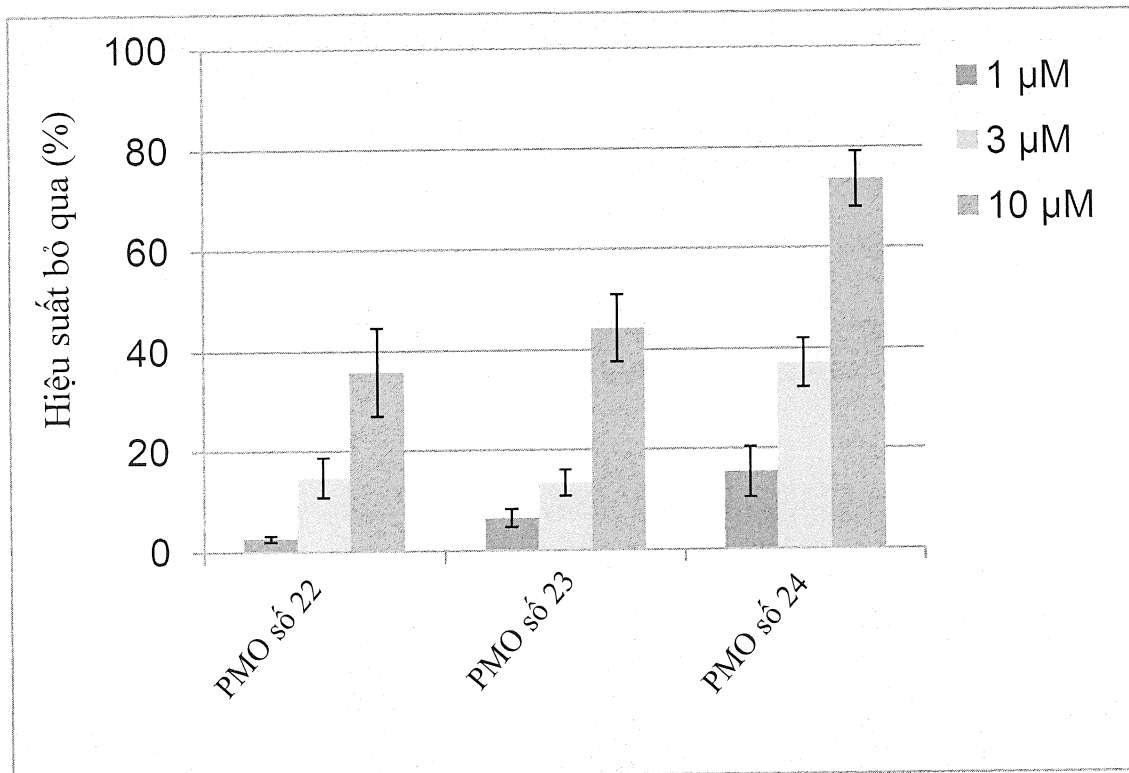


Fig. 11

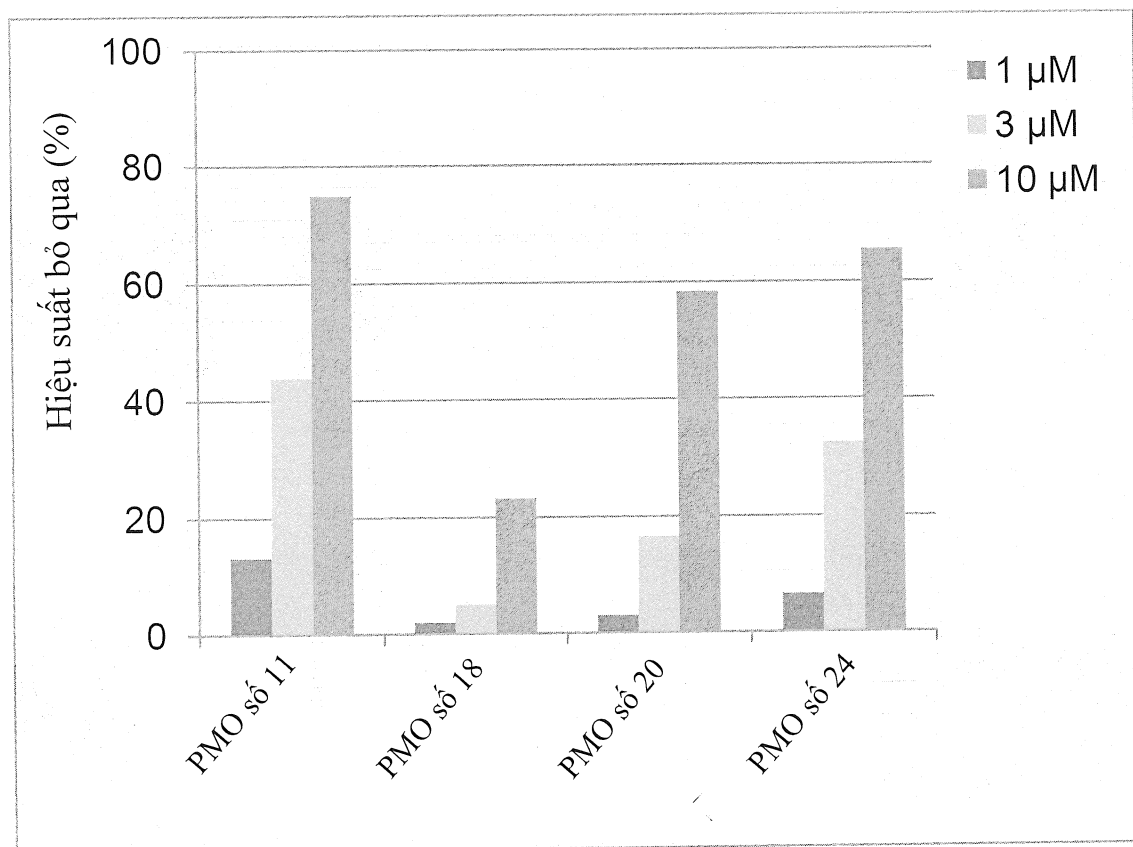


Fig. 12

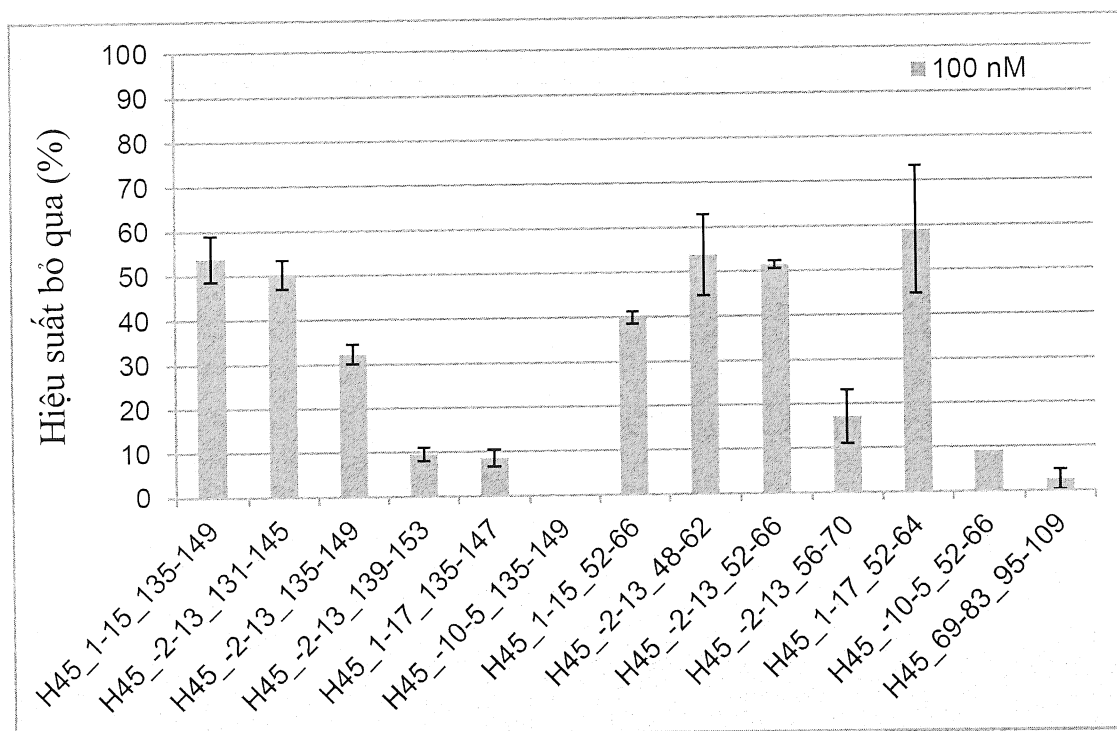


Fig. 13

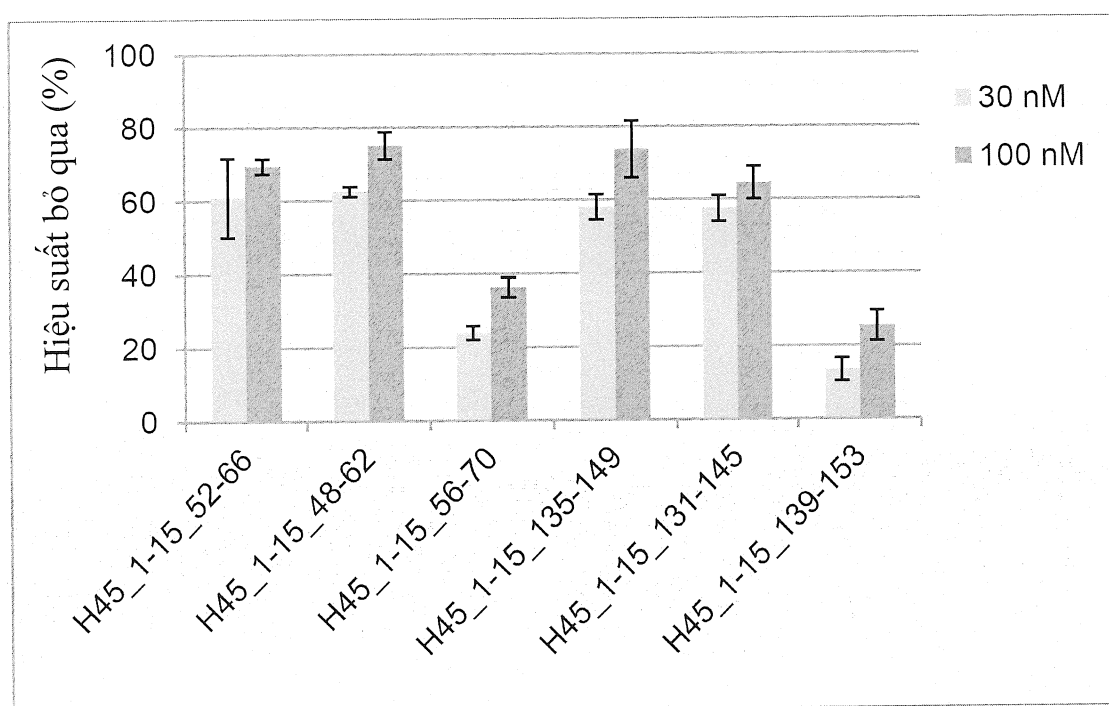


Fig. 14

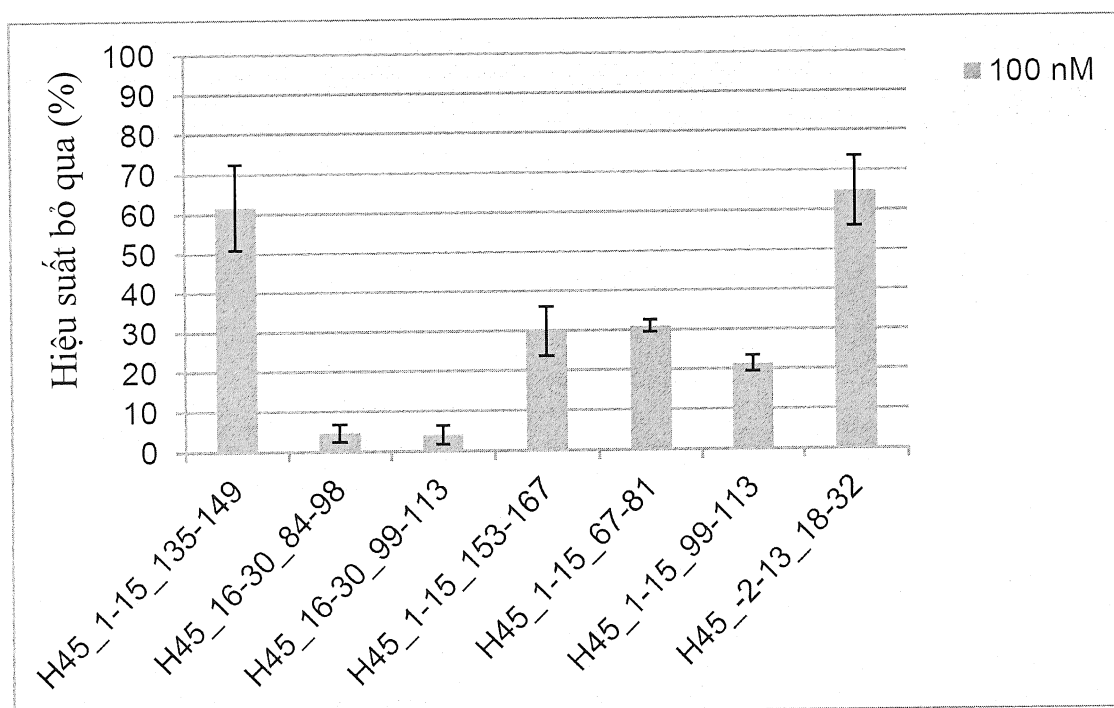


Fig. 15

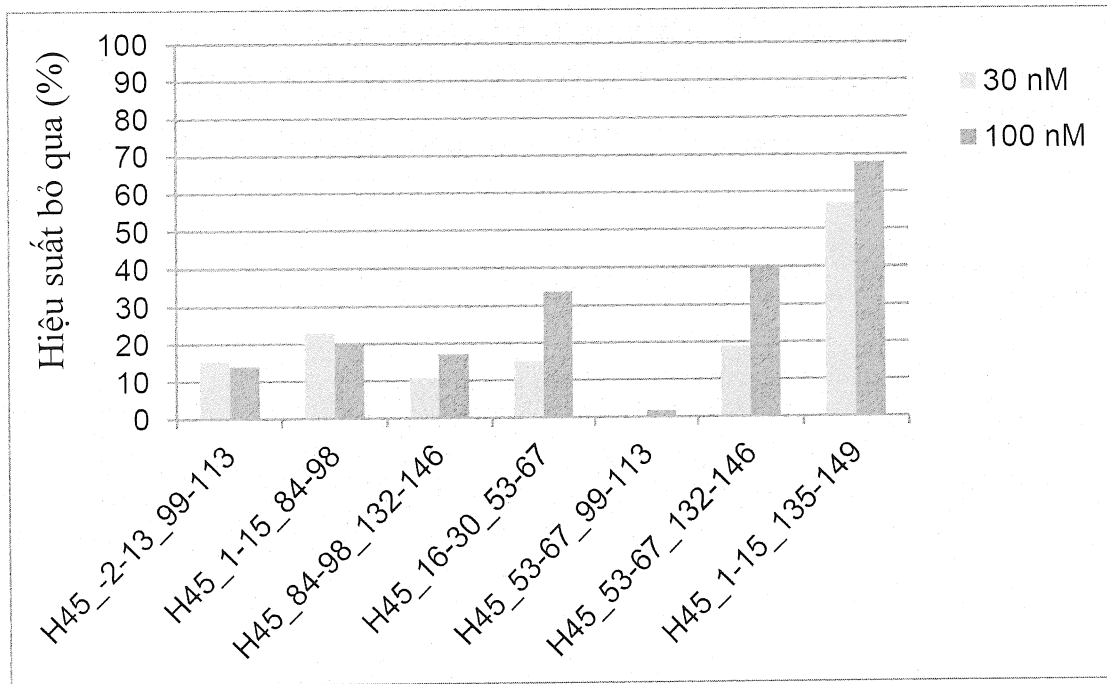


Fig. 16

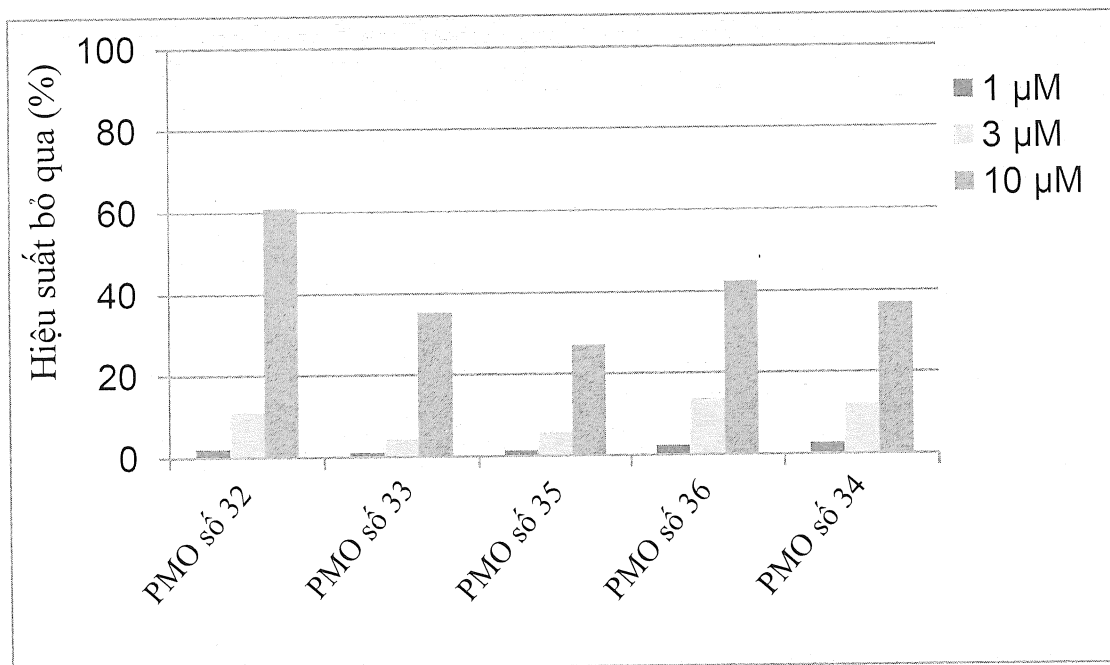


Fig. 17

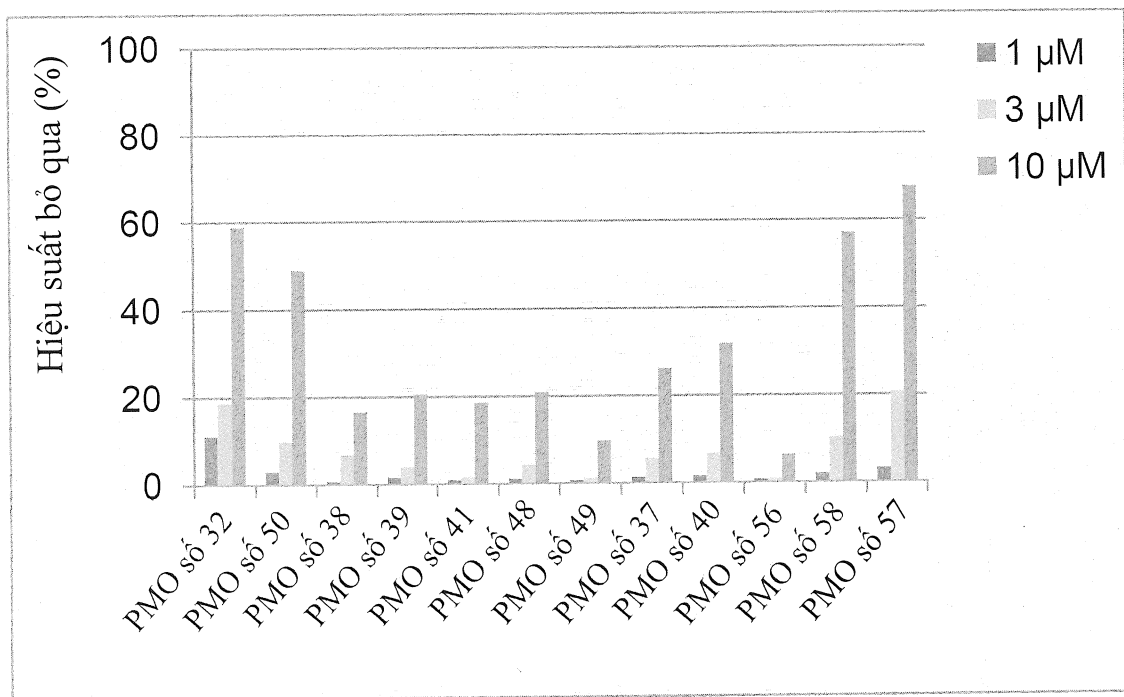


Fig. 18

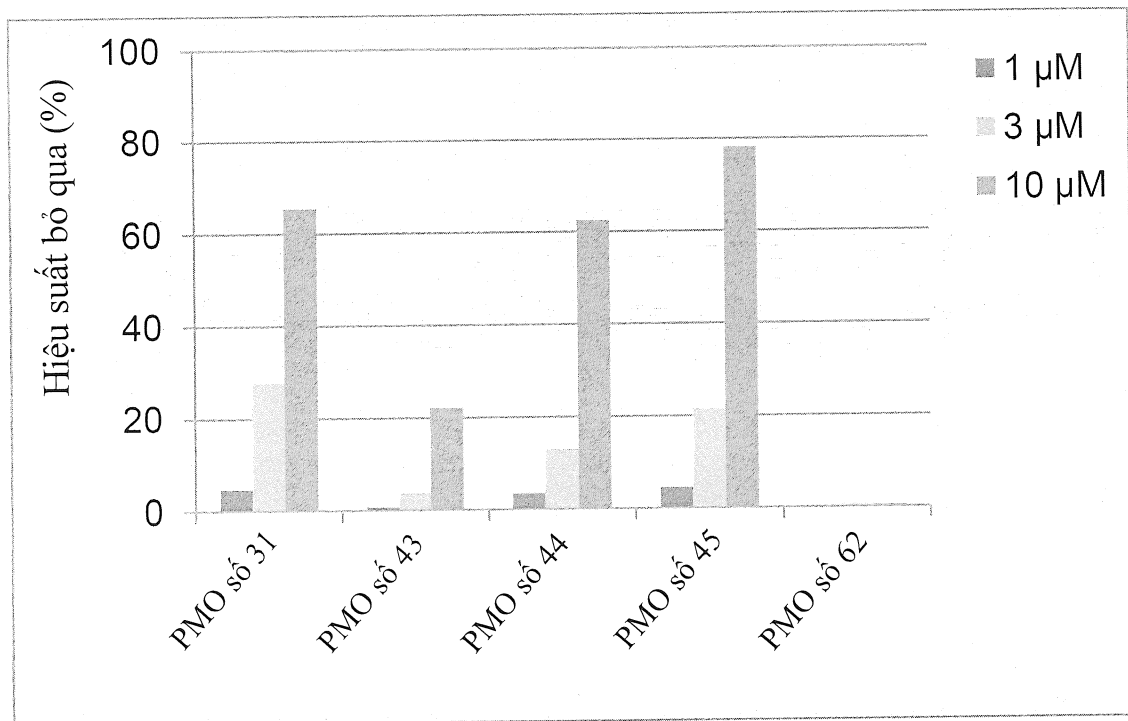


Fig. 19

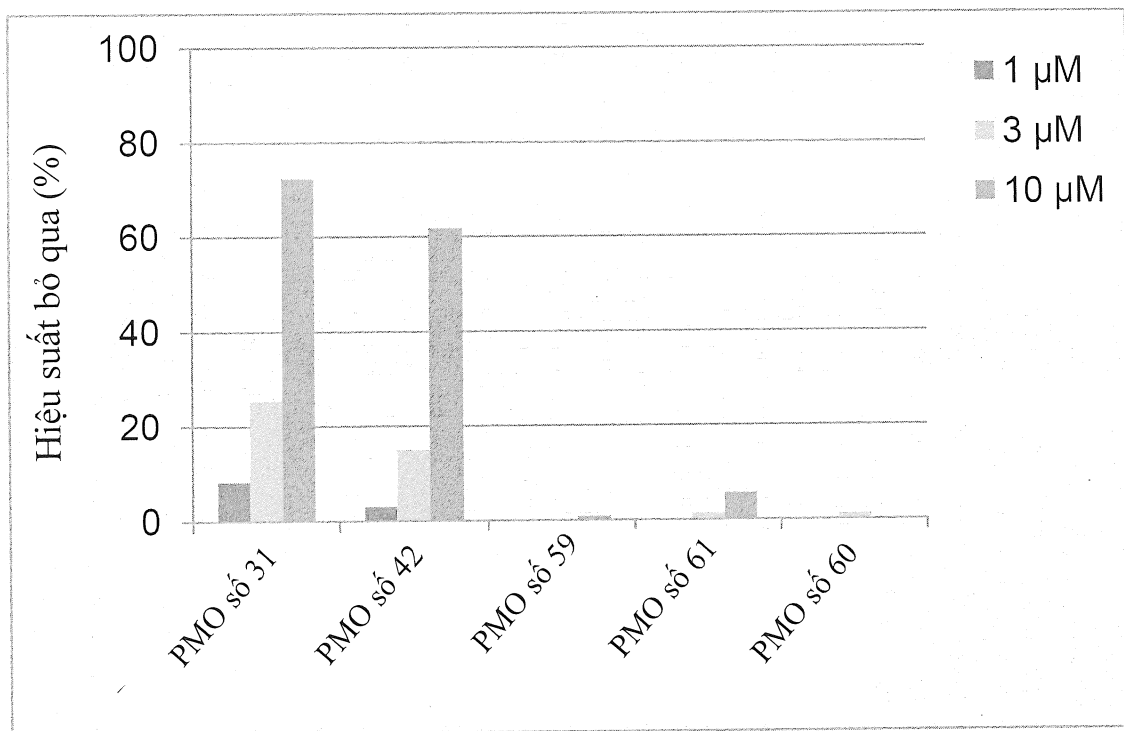


Fig. 20

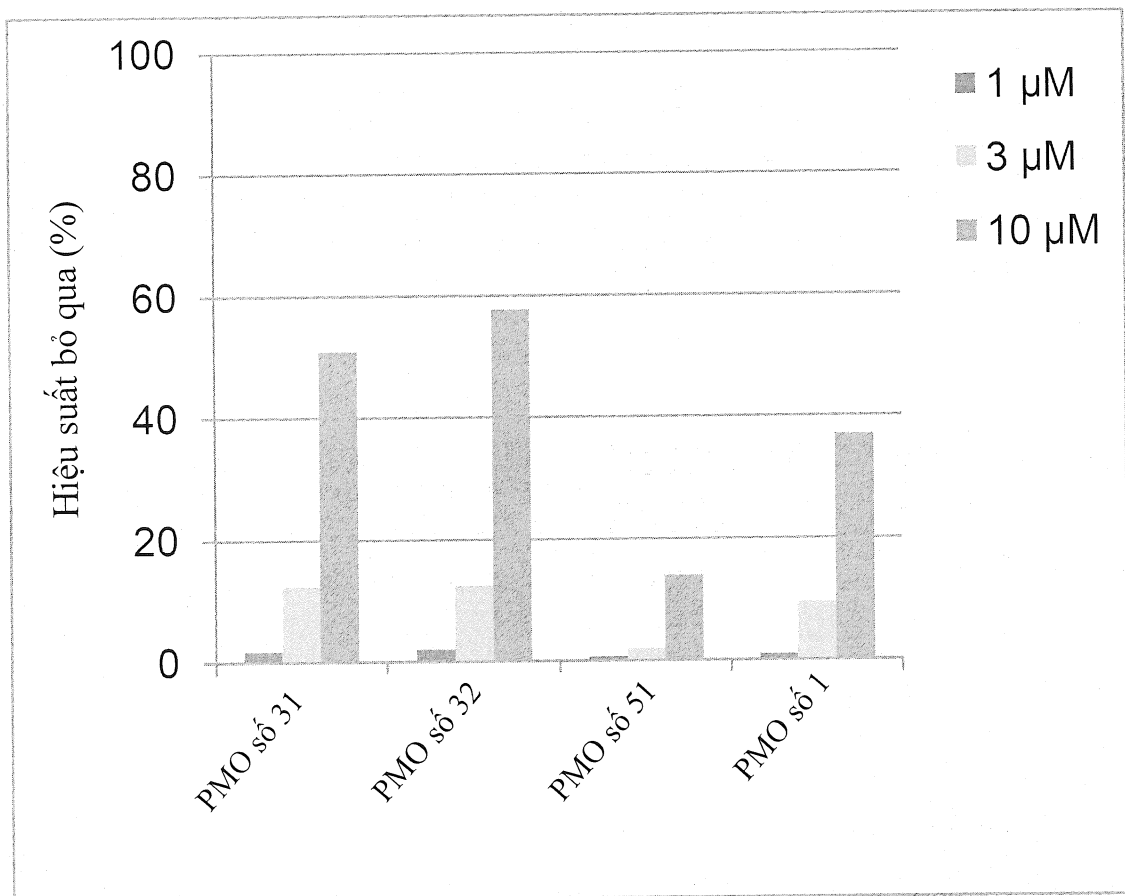


Fig. 21

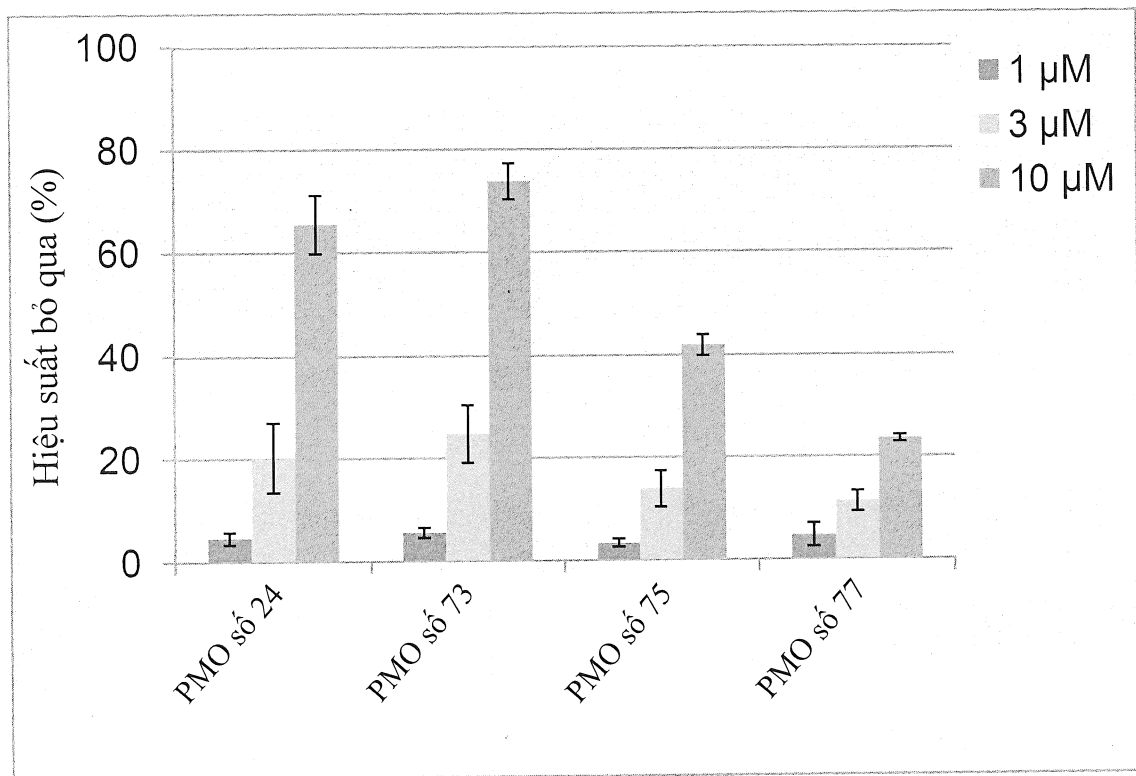


Fig. 22

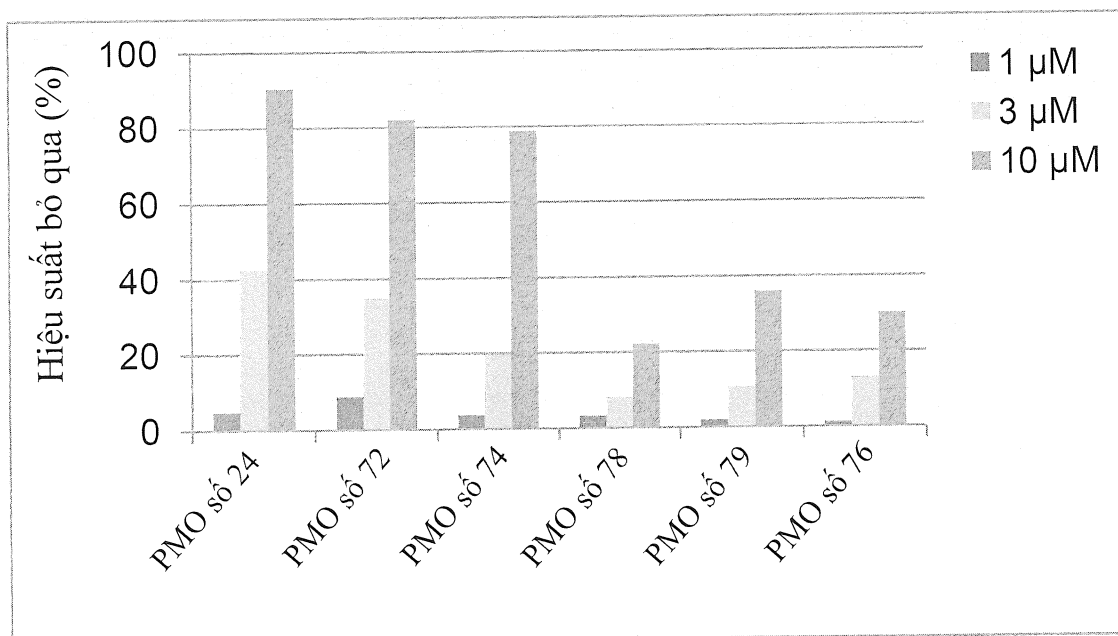


Fig. 23

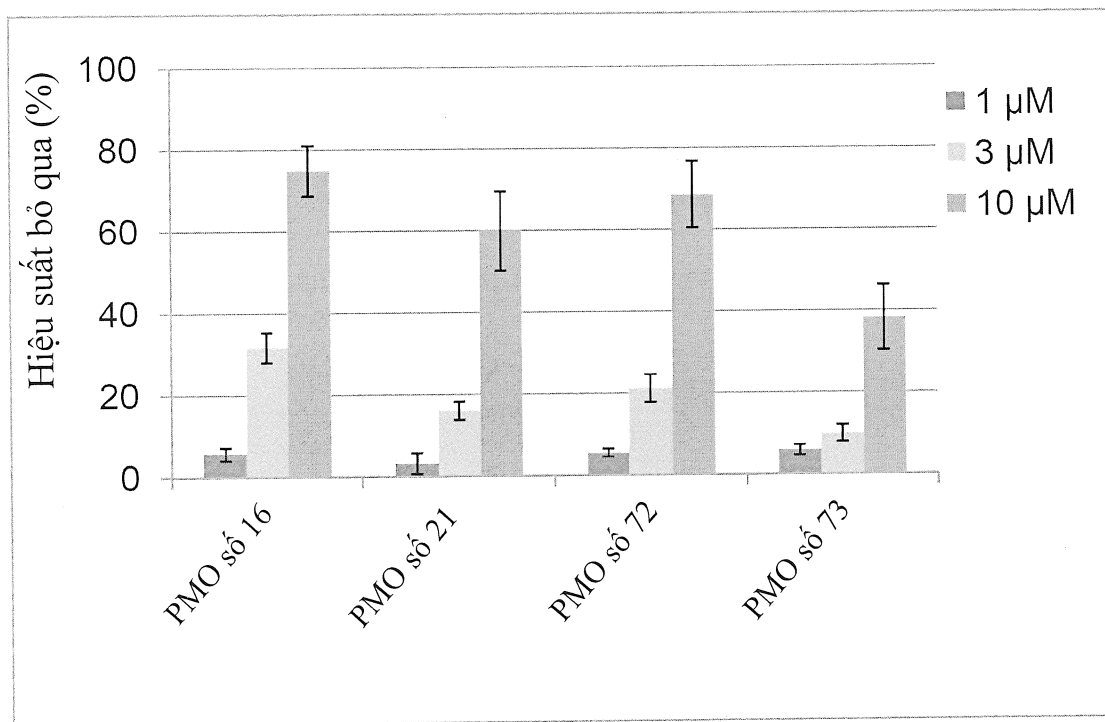


Fig. 24

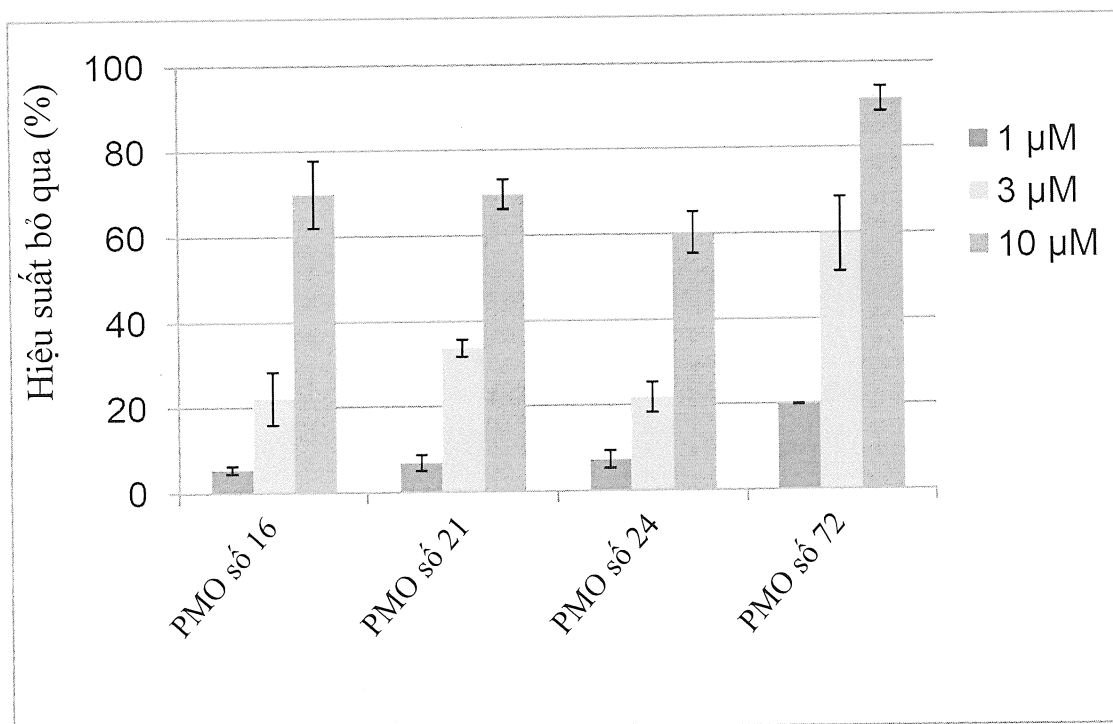
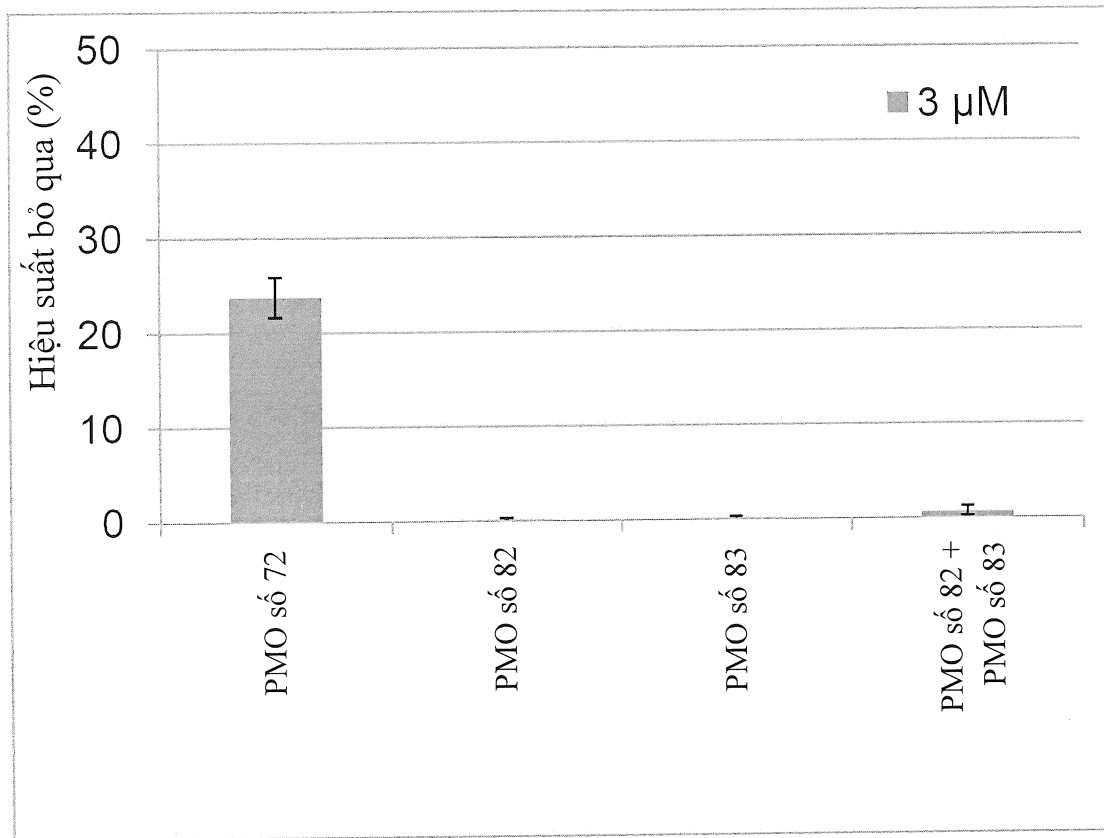


Fig. 25



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> P248158
- <150> JP2015-182145
<151> 2015-09-15
- <160> 146
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo
- <220>
<223> Axit nucleic tổng hợp
- <400> 1
gctcaggtcg gattgacatt 20
- <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo
- <220>
<223> Axit nucleic tổng hợp
- <400> 2
gggcaactct tccaccagta 20
- <210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo
- <220>
<223> Axit nucleic tổng hợp
- <400> 3

tacaggaact ccaggatggc

20

<210> 4

<211> 23

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 4

gaatgcaact gggaagaaa taa

23

<210> 5

<211> 23

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 5

atctgcggtg gcaggaggtc tgc

23

<210> 6

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 6

cattgggcag cggcaaactg ttgtca

26

<210> 7

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 7

gtttgccgct gcctcctgga gttcct

26

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

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 8
 gtttgccgct gccctggagt tcct 24

<210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 9
 cagtttgccg ctgcccatcc tggagttcct 30

<210> 10
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 10
 cagtttgccg ctgccctgga gttcct 26

<210> 11
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 11
 ttcttccca gttgcgcat cctggagttc 30

<210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 12
 cagacctct gccagccat cctggagttc 30

<210> 13
 <211> 176
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<400> 13
 gaactccagg atggcattgg gcagcggcaa actgttgta gaacattgaa tgcaactggg 60
 gaagaaataa ttcagcaatc ctcaaaaaca gatgccagta ttctacagga aaaattggga 120
 agcctgaatc tgcggtggca ggaggtctgc aaacagctgt cagacagaaa aaagag 176

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

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 14
 ttgccgtgc ccacatcctg gagttc 26

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

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 15
 gccgctgccc acatcctgga gttcct 26

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

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 16
 ccgctgccca atgtcctgga gttcct 26

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

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 17
 ttgccgtgc ccatcctgga gttcct 26

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

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 18
 tttgccgtg ccatcctgga gttcct 26

<210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 19
 tttgccgtg cctcctggag ttcc 24

<210> 20
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 20
 tgccgctgcc cgccatcctg gagttc 26

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

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 21
 gtttgccgct gccatcctgg agttc 25

<210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 22
 cagtttgccg ctgctggagt tcct 24

<210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 23
 acagtttgcc gctctggagt tcct 24

<210> 24

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 24
 cagtttgccg ctgccggagt tcct 24

<210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 25
 gtttgccgct gccctggagt tcc 23

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

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 26
 cagtttgccg ctgccggagt tcctg 25

<210> 27
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 27
 ccgctgccca atgtggagtt cctgt 25

<210> 28
 <211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 28

cagtttgccg ctgccctgga gttc 24

<210> 29

<211> 23

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 29

ccgctgccca atctggagtt cct 23

<210> 30

<211> 25

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 30

cagtttgccg ctgccctgga gttcc 25

<210> 31

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 31

ttgccgctgc ccactggagt tcct 24

<210> 32

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 32

ttgccgctgc ccactggagt tcctgt

26

<210> 33

<211> 22

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 33

acagtttgcc gcctggagtt cc

22

<210> 34

<211> 12

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 34

gtttgccgct gc

12

<210> 35

<211> 12

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 35

cctggagttc ct

12

<210> 36

<211> 10

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 36

tggagttcct

10

<210> 37

<211> 16

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 37

cagtttgccg ctgcc

16

<210> 38

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 38

tcttcccag ttgccatcct ggagtt

26

<210> 39

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 39

agacctctg ccaccatcct ggagtt

26

<210> 40

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 40

gacctcctgc caccatcctg gagttc

26

<210> 41

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 41

tccccagttg cgccatcctg gagttc

26

<210> 42

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 42

gacctcctgc cgccatcctg gagttc

26

<210> 43

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 43

cttccccagt tgccatcctg gagttc

26

<210> 44

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 44

ttccccagtt gcacatcctg gagttc

26

<210> 45

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 45

cctcctgcca ccgcatcctg gagttc

26

<210> 46

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 46

acctcctgcc acccatcctg gagttc

26

<210> 47

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 47

tttctcccc agtcacacctg gagttc

26

<210> 48

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 48
gcagacctcc tgccatcctg gagttc 26

<210> 49
<211> 28
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 49
ttcttcccca gttgcatcc tggagttc 28

<210> 50
<211> 23
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 50
ccccagttgc atctggagtt cct 23

<210> 51
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 51
ttcttcccca gttgcctgg agttcc 26

<210> 52
<211> 28
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 52
cttccccagt tgccatcctg gagttcct 28

<210> 53
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 53
cagacctcct gccactcctg gagttc 26

<210> 54
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 54
tgcagacctc ctgcctcctg gagttc 26

<210> 55
<211> 26
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 55
ctgtttgcag acccatcctg gagttc 26

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

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 56

tttgagacc tcctggagtt cctgta

26

<210> 57

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 57

cctgccaccg cagatgccat cctggagttc

30

<210> 58

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 58

acctcctgcc accgcttgcc gctgccaat

30

<210> 59

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 59

tcctgtagaa taccatcctg gagttc

26

<210> 60

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 60

ctcctgccac cgctggcatc tgtttt

26

<210> 61
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 61
 acctcctgcc accgctcttc cccagttgca 30

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

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 62
 tggcatctgt tttcatcctg gagttc 26

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

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 63
 ttatttcttc cccagttcct gtaaga 26

<210> 64
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 64
 gcttccaat gccatcctgg agttcc 26

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

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 65
 ggcttcctca tgccatcctg gagttc 26

<210> 66
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 66
 tttctgtctg acagctcctg ccaccgcaga 30

<210> 67
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 67
 tcctgccacc gcagagagga ttgctgaatt 30

<210> 68
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 68
 tcctgccacc gcagactggc atctgttttt 30

<210> 69
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 69
 tcctgccacc gcagatttc ctgtagaata 30

<210> 70
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 70
 gccatcctgg agttc 15

<210> 71
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 71
 ttcttccca gttgc 15

<210> 72
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 72
 cagacctct gccac 15

<210> 73

<211> 13
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 73
 tcctggagtt cct 13

<210> 74
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 74
 gtttgccgct gcc 13

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

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 75
 ctctgccac cgcgccgtg cccaat 26

<210> 76
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 76
 attcaggctt cccttccca gttgca 26

<210> 77
 <211> 9

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 77

tggagttcc

9

<210> 78

<211> 8

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 78

tggagttc

8

<210> 79

<211> 21

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 79

cagtttgccg cctggagttc c

21

<210> 80

<211> 22

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 80

acagtttgcc gctggagttc ct

22

<210> 81

<211> 22

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 81

gtttgccgct gcctggagtt cc

22

<210> 82

<211> 22

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 82

aacagtttgc ccctggagtt cc

22

<210> 83

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 83

cagtttgccg cctggagttc

20

<210> 84

<211> 22

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 84

cagtttgccg ctctggagt tc

22

<210> 85

<211> 21

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 85

agtttgccgc tcctggagtt c

21

<210> 86

<211> 21

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 86

acagtttgcc gctggagttc c

21

<210> 87

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 87

tgccgctgcc catcctggag ttcc

24

<210> 88

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 88

ctgccaccgc agccgctgcc caatgc

26

<210> 89

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 89

uccccaguug cauucgccau ccuggaguuc

30

<210> 90

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 90

uuauuucuuc cccaggccau ccuggaguuc

30

<210> 91

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 91

ccuccugcca ccgcagccau ccuggaguuc

30

<210> 92

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 92

ccuccugcca ccgcacaucc uggaguuccu

30

<210> 93

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 93

cagaccuccu gccaccaucc uggaguuccu

30

<210> 94

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 94

uccccaguug cauuccaucc uggaguuccu

30

<210> 95

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 95

uucuucccca guugccaucc uggaguuccu

30

<210> 96

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 96

uuauuucuuc ccagcaucc uggaguuccu

30

<210> 97

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 97
 guuugccgcu gcccaucc uggaguuccu 30

<210> 98
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 98
 uuugcagacc uccugcaucc uggaguuccu 30

<210> 99
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 99
 gaccuccugc cacaugccau ccuggaguuc 30

<210> 100
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 100
 cuuccccagu ugcaugccau ccuggaguuc 30

<210> 101
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 101	
uuugcagacc uccuggccau ccuggaguuc	30
<210> 102	
<211> 30	
<212> ADN	
<213> Nhân tạo	
<220>	
<223> Axit nucleic tổng hợp	
<400> 102	
uuuuccgua gaauacauc uggaguuccu	30
<210> 103	
<211> 30	
<212> ADN	
<213> Nhân tạo	
<220>	
<223> Axit nucleic tổng hợp	
<400> 103	
accuccugcc accgcuuuc uccccaguug	30
<210> 104	
<211> 30	
<212> ADN	
<213> Nhân tạo	
<220>	
<223> Axit nucleic tổng hợp	
<400> 104	
uuuuccgua gaauauugcc gcugcccau	30
<210> 105	
<211> 30	
<212> ADN	
<213> Nhân tạo	
<220>	
<223> Axit nucleic tổng hợp	
<400> 105	

cugucugaca gcugugccau ccuggaguuc

30

<210> 106

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 106

ggauugcuga auuaugccau ccuggaguuc

30

<210> 107

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 107

uuuuccugua gaauagccau ccuggaguuc

30

<210> 108

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 108

caguugcauu caacauccug gaguuc

26

<210> 109

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 109

uuuuuccca guucauccug gaguuc

26

<210> 110
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 110
 ugaauuauuu cuucauccug gaguuc 26

<210> 111
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 111
 caguugcauu caaaaugcca uccugg 26

<210> 112
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 112
 uucuucccca guuaaugcca uccugg 26

<210> 113
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 113
 ugaauuauuu cuuaaugcca uccugg 26

<210> 114
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 114
 gcagauucag gcucauccug gaguuc 26

<210> 115
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 115
 cugccaccgc agacauccug gaguuc 26

<210> 116
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 116
 cagaccuccu gcccauccug gaguuc 26

<210> 117
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 117
 gcagauucag gcuaaugcca uccugg 26

<210> 118
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 118
 cugccaccgc agaaaugcca uccugg 26

<210> 119
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 119
 uucaggcuuc ccagccgcug cccaau 26

<210> 120
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 120
 accgcagauu caggccgcug cccaau 26

<210> 121
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 121
 cuccugccac cgcgccgcug cccaau 26

<210> 122

<211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 122
 uucaggcuuc ccaacaacag uuugcc 26

<210> 123
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 123
 accgcagauu cagacaacag uuugcc 26

<210> 124
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 124
 cuccugccac cgacaacag uuugcc 26

<210> 125
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 125
 cuucccaauu uuuuuuccca guugca 26

<210> 126
 <211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 126

auucaggcuu cccuucccca guugca

26

<210> 127

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 127

accgcagauu caguucccca guugca

26

<210> 128

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 128

cuucccaauu uuuaauuauu ucuucc

26

<210> 129

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 129

auucaggcuu cccaauuauu ucuucc

26

<210> 130

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 130

accgcagauu cagaauuuuu ucuucc

26

<210> 131

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 131

cuucccauu uuugauugcu gaauua

26

<210> 132

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 132

auucaggcuu cccgauugcu gaauua

26

<210> 133

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 133

accgcagauu caggauugcu gaauua

26

<210> 134

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 134

uucuucccca guugcaguuc cuguaagaua

30

<210> 135

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 135

cagaccuccu gccacaguuc cuguaagaua

30

<210> 136

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 136

ccuguagaau acugggagga uugcugaauu

30

<210> 137

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 137

cuggcaucug uuuuuuugcc gcugcccaau

30

<210> 138

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 138

uuucuucucc aguguugcc gcugcccaau

30

<210> 139

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 139

cuggcaucug uuuuugccau ccuggaguuc

30

<210> 140

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 140

accuccugcc accgccuggc aucuguuuuu

30

<210> 141

<211> 30

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 141

uuuuccugua gaauuuucu uccccaguug

30

<210> 142

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 142

cagaccuccu gccaaugcca uccugg

26

<210> 143

<211> 16

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 143

aaaaattggg aagcct

16

<210> 144

<211> 11

<212> ADN

<213> Nhân tạo Sequence

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 144

cctggagttc c

11

<210> 145

<211> 10

<212> ADN

<213> Nhân tạo Sequence

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 145

cagtttgccg

10

<210> 146

<211> 11

<212> ADN

<213> Nhân tạo Sequence

<220>

<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 146
acagtttgcc g

11