



(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)



1-0035809

(51)⁷ C12N 15/113; A61K 31/712; A61P 3/06 (13) B

-
- (21) 1-2015-04952 (22) 27/06/2014
(86) PCT/EP2014/063757 27/06/2014 (87) WO 2014/207232 31/12/2014
(30) 13174092.0 27/06/2013 EP; PCT/EP2013/073858 14/11/2013 EP; 13192930.9
14/11/2013 EP; 13192938.2 14/11/2013 EP; 14153253.1 30/01/2014 EP; 14168331.8
14/05/2014 EP
(45) 25/05/2023 422 (43) 25/05/2016 338A
(73) ROCHE INNOVATION CENTER COPENHAGEN A/S (DK)
Fremtidsvej 3, DK-2970 Hørsholm, Denmark
(72) ALBAEK, Nanna (DK); HEDTJAARN, Maj (SE); LINDHOLM, Marie (SE);
NIELSEN, Niels Fisker (DK); PETRI, Andreas (DK); RAVN, Jacob (DK).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

- (54) HỢP CHẤT BAO GỒM OLIGOME ĐỐI NGHĨA, THỂ LIÊN HỢP OLIGONUCLEOTIT ĐỐI NGHĨA, DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY, PHƯƠNG PHÁP IN VITRO LÀM GIẢM MỨC BIỂU HIỆN VÀ/HOẶC HOẠT TÍNH CỦA PROPROTEIN CONVERTAZA SUBTILISIN/KEXIN TYP 9 (PCSK9), VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HỢP CHẤT VÀ THỂ LIÊN HỢP NÀY
- (57) Sáng chế đề cập đến hợp chất bao gồm oligome đối nghĩa, thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa của nó nhắm đích ARN thông tin Proprotein Convertaza Subtilisin/Kexin typ 9 (PCSK9) ở tế bào, làm giảm mức biểu hiện của PCSK9. Sự biểu hiện giảm của PCSK9 là có lợi đối với nhiều rối loạn y học, như chứng tăng cholesterol huyết và các rối loạn liên quan. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất này, phương pháp in vitro làm giảm mức biểu hiện và/hoặc hoạt tính của PCSK9, và phương pháp sản xuất hợp chất và thể liên hợp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất bao gồm oligome đối nghĩa, thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa của nó nhắm đích ARN thông tin Proprotein Convertaza Subtilisin/Kexin typ 9 (PCSK9) ở tế bào, làm giảm mức biểu hiện của PCSK9. Sự biểu hiện giảm của PCSK9 là có lợi đối với nhiều rối loạn y học, như chứng tăng cholesterol huyết và các rối loạn liên quan. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa hợp chất này, phương pháp in vitro làm giảm mức biểu hiện và/hoặc hoạt tính của PCSK9, và phương pháp sản xuất hợp chất và thể liên hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Proprotein Convertaza subtilisin/kexin typ 9 (PCSK9) đã nổi lên như là đích trị liệu để làm giảm lipoprotein cholesterol tỷ trọng thấp (low-density lipoprotein cholesterol - LDL-C). PCSK9 làm tăng sự phân hủy của thụ thể LDL, dẫn đến mức LDL-C cao ở các cá thể có hoạt tính PCSK9 cao.

Lindholm và các đồng tác giả, *Molecular Therapy* (2012); 20 2, 376–381 đã thông báo rằng hai LNA oligonucleotit đối nghĩa nhắm đích PCSK9, làm giảm liên tục mức LDL-C ở động vật linh trưởng không phải người sau liều nạp (20 mg/kg) và bốn liều duy trì hàng tuần (5 mg/kg). Các hợp chất được sử dụng là 14mer SPC5001 (SEQ ID NO 1) và 13mer SPC4061. SPC5001 cũng được bộc lộ trong WO 2011/009697. Hiệu lực của các chất ức chế PCSK9 này được cho là do chúng có chiều dài ngắn (Krieg và các đồng tác giả, *Molecular Therapy Nucleic Acids* (2012) 1, e6).

WO 2007/146511 đã thông báo về (LNA) gapme oligonucleotit đối nghĩa hai vòng mạch ngắn, oligonucleotit này dường như có hoạt lực lớn hơn và ít độc hơn so với hợp chất mạch dài hơn. Các hợp chất được lấy ví dụ dường như có chiều dài 14 nucleotit.

Theo van Poelgeest và các đồng tác giả, (*American Journal of Kidney Disease*, 2013 Oct;62(4):796-800), việc sử dụng LNA oligonucleotit đối nghĩa SPC5001 trong các thử nghiệm lâm sàng trên người có thể gây tổn thương thận cấp.

Theo EP 1 984 381B1, Seth và các đồng tác giả, Nucleic Acids Symposium Series 2008 No. 52 553–554 và Swayze và các đồng tác giả, Nucleic Acid Research 2007, vol 35, pp687 – 700, LNA oligonucleotit gây độc đáng kể cho gan ở động vật. Theo WO 2007/146511, độc tính của LNA oligonucleotit có thể tránh được bằng cách sử dụng LNA gapme ngắn có chiều dài khoảng 12 – 14 nucleotit. EP 1 984 381B1 đề xuất việc sử dụng nucleotit hai vòng được thế ở vị trí 6' để làm giảm khả năng gây độc cho gan của LNA oligonucleotit. Theo Hagedorn và các đồng tác giả, Nucleic Acid Therapeutics 2013, khả năng gây độc cho gan của oligonucleotit đối nghĩa có thể dự đoán được từ trình tự và kiểu cải biến của nó.

Thế liên hợp oligonucleotit đã đánh giá được xem xét kỹ lưỡng để sử dụng trong siARN, trong đó chúng còn được xem là thiết yếu để thu được đủ hoạt lực in vivo. Ví dụ, xem WO 2004/044141 đề cập đến hợp chất oligome được cải biến có tác dụng điều biến mức biểu hiện gen thông qua con đường can thiệp ARN. Hợp chất oligome bao gồm một hoặc nhiều gốc liên hợp có thể cải biến hoặc tăng cường tính chất được động học và được lực học của hợp chất oligome gắn vào.

WO 2012/083046 đã thông báo về gốc nhắm đích chất điều biến được động học nhóm galactosa của siARN.

Trái lại, oligonucleotit đối nghĩa sợi đơn thường được sử dụng để trị liệu mà không được liên hợp hoặc bào chế theo công thức. Mô đích chính của oligonucleotit đối nghĩa là gan và thận, mặc dù nhiều mô khác cũng có thể tiếp cận được theo cách đối nghĩa, kể cả hạch bạch huyết, lá lách, và tủy xương.

WO 2005/086775 đề cập đến việc phân phối theo đích các chất trị liệu đến các cơ quan cụ thể sử dụng gốc hóa học trị liệu, thành phần liên kết phân cắt được và miền gắn nhãn. Thành phần liên kết phân cắt được có thể là, ví dụ, nhóm disulfua, peptit hoặc miền oligonucleotit phân cắt được bằng enzym giới hạn.

WO 2011/126937 đề cập đến việc phân phối oligonucleotit có đích nội bào thông qua việc liên hợp với phối tử phân tử nhỏ.

WO 2009/025669 đề cập đến thành phần liên kết dạng polyme (polyetylen glycol) chứa gốc pyridyl disulfua. Cũng xem tài liệu của Zhao et al., Bioconjugate Chem. 2005 16 758 – 766.

Chaltin và các đồng tác giả, Bioconjugate Chem. 2005 16 827 - 836 đã thông báo về việc mono- di- và tetrame oligonucleotit được cải biến bằng cholesterol được sử dụng

để kết hợp oligonucleotit đối nghĩa vào cation liposom, để tạo ra hệ phân phối tỏa nhánh. Cholesterol được liên hợp với oligonucleotit thông qua thành phần liên kết lysin.

Các thể liên hợp cholesterol không phân cắt đã được sử dụng để làm đích của siARN và antagomir vào gan – xem ví dụ, Soutscheck và các đồng tác giả, Nature 2004 vol. 432 173 – 178 và Krützfeldt và các đồng tác giả, Nature 2005 vol 438, 685 – 689. Đối với siARN và antagomir được phosphothiolat một phần, việc sử dụng cholesterol làm thực thể đích ở gan được thấy là cần thiết để thu được hoạt tính in vivo.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất đối nghĩa nhắm đích PCSK9, có hiệu quả như SPC5001, nhưng có nguy cơ gây độc giảm, cụ thể, độc tính đối với thận giảm. Hợp chất theo sáng chế là chất ức chế PCSK9 hiệu nghiệm và không gây độc, hữu dụng trong điều trị chứng tăng cholesterol huyết và các rối loạn liên quan.

Theo sáng chế, mục đích này đạt được bằng cách xác định trình tự PCSK9 mới ở người, đặc biệt hiệu quả làm đích, khi sử dụng phương pháp đối nghĩa (SEQ ID NO 33 và SEQ ID NO 34), cũng như các biến thể có mạch dài hơn của trình tự SPC5001 mà giữ được hoặc cải thiện hoạt lực rõ rệt của SPC5001 mà không gây độc. Oligonucleotit đối nghĩa theo sáng chế có thể được cải thiện thêm khi sử dụng ở dạng thể liên hợp, mà đã được phát hiện thấy là làm tăng cường đáng kể chỉ số trị liệu của oligonucleotit đối nghĩa LNA.

Để đạt được mục đích trên đây, theo một phương án, sáng chế đề xuất oligome có thể có chiều dài nằm trong khoảng từ 10 đến 22, như từ 12 đến 18 nucleotit, bao gồm a) trình tự liên kề gồm 10 – 16 nucleotit bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 33 hoặc 34 hoặc 45, hoặc b) trình tự liên kề gồm 16 nucleotit bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 31.

Sáng chế cũng đề xuất thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa bao gồm oligome theo sáng chế, và ít nhất một gốc không phải nucleotit hoặc không phải polynucleotit liên kết cộng hóa trị với oligome này.

Sáng chế cũng đề xuất thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa bao gồm oligome (A) theo sáng chế, và ít nhất một gốc không phải nucleotit hoặc không phải polynucleotit được liên kết cộng hóa trị với oligome (C) này, tùy ý thông qua vùng liên kết (B và/hoặc Y) nằm giữa trình tự liên kề của oligome và gốc liên hợp.

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề xuất thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa bao gồm oligome có chiều dài 10 – 22, như 12 - 18 nucleotit, trong đó oligome này bao gồm a) trình tự liên kề gồm 10 – 16 nucleotit bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 33 hoặc 34, hoặc 45 hoặc b) trình tự liên kề gồm 16 nucleotit bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 31.

Sáng chế cũng đề xuất hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, và 24.

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa oligome hoặc thể liên hợp theo sáng chế, và chất pha loãng, chất mang, muối hoặc tá dược được dụng.

Sáng chế đề xuất oligome hoặc thể liên hợp hoặc được phẩm theo sáng chế, để sử dụng làm thuốc, như để điều trị chứng tăng cholesterol huyết hoặc rối loạn liên quan, như rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm chứng vữa xơ động mạch, chứng tăng lipit huyết, chứng tăng cholesterol huyết, chứng tăng cholesterol huyết di truyền, ví dụ, tăng số lượng đột biến chức năng trong PCSK9, mất cân bằng cholesterol HDL/LDL, chứng loạn lipit huyết, ví dụ, chứng tăng lipit huyết di truyền (FCHL) hoặc chứng tăng cholesterol huyết di truyền (FHC), chứng tăng lipit huyết mắc phải, chứng tăng cholesterol huyết kháng statin, bệnh động mạch vành (CAD), và bệnh tim mạch vành (CHD).

Sáng chế đề xuất việc sử dụng oligome hoặc thể liên hợp hoặc được phẩm theo sáng chế, để sản xuất thuốc để điều trị chứng tăng cholesterol huyết hoặc rối loạn liên quan, như rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm chứng vữa xơ động mạch, chứng tăng lipit huyết, chứng tăng cholesterol huyết, chứng tăng cholesterol huyết di truyền, ví dụ, tăng số lượng đột biến chức năng trong PCSK9, mất cân bằng cholesterol HDL/LDL, chứng loạn lipit huyết, ví dụ, chứng tăng lipit huyết di truyền (FCHL) hoặc chứng tăng cholesterol huyết di truyền (FHC), chứng tăng lipit huyết mắc phải, chứng tăng cholesterol huyết kháng statin, bệnh động mạch vành (CAD), và bệnh tim mạch vành (CHD).

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị chứng tăng cholesterol huyết hoặc rối loạn liên quan, như rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm chứng vữa xơ động mạch, chứng tăng lipit huyết, chứng tăng cholesterol huyết, chứng tăng cholesterol huyết di truyền, ví dụ, tăng số lượng đột biến chức năng trong PCSK9, mất cân bằng cholesterol HDL/LDL, chứng loạn lipit huyết, ví dụ, chứng tăng lipit huyết di truyền (FCHL) hoặc

chứng tăng cholesterol huyết di truyền (FHC), chứng tăng lipid huyết mắc phải, chứng tăng cholesterol huyết kháng statin, bệnh động mạch vành (CAD), và bệnh tim mạch vành (CHD), phương pháp này bao gồm cho bệnh nhân mắc, hoặc có khả năng mắc chứng tăng cholesterol huyết hoặc rối loạn liên quan dùng lượng hữu hiệu của oligome hoặc thể liên hợp hoặc được phẩm theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất phương pháp in vivo hoặc in vitro để ức chế PCSK9 ở tế bào biểu hiện PCSK9, phương pháp này bao gồm bước cho tế bào sử dụng oligome hoặc thể liên hợp hoặc được phẩm theo sáng chế để ức chế PCSK9 ở tế bào này.

Sáng chế cũng đề xuất oligome theo sáng chế, như LNA oligome, bao gồm vùng liền kề gồm 10 – 22, như 12 – 18, như 13, 14, 15, 16 hoặc 17 nucleosit liên kết qua phosphothioat, (tức là vùng A, vùng này thường bổ trợ với vùng tương ứng của trình tự đích, như SEQ ID NO 46) và còn bao gồm từ 1 đến 6 ADN nucleosit liền kề với LNA oligome, trong đó liên kết giữa các nucleosit giữa ADN, và/hoặc liền kề với (các) ADN nucleosit, không bền về mặt sinh lý, như liên kết phosphodiester. LNA oligome như vậy có thể ở dạng thể liên hợp, như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc có thể, ví dụ là sản phẩm trung gian được sử dụng trong bước liên hợp tiếp theo. Khi được liên hợp, thể liên hợp này có thể, ví dụ là hoặc bao gồm sterol, như cholesterol hoặc tocopherol, hoặc có thể là hoặc bao gồm cacbon hydrat (không phải nucleotit), như thể liên hợp GalNAc, hoặc thể liên hợp khác như được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề xuất gapme oligome bao gồm ít nhất một cET, như (S)-cET nucleotit, có chiều dài khoảng 10 – 22, như 12 – 18, như 13, 14, 15, 16 hoặc 17 nucleotit, có đích là (tức là, có trình tự bổ trợ với phần tương ứng) của PCSK9 ở người.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1. Các ví dụ về thể liên hợp tri-GalNAc có thể được sử dụng. Thể liên hợp 1 – 4 minh họa 4 gốc liên hợp GalNAc thích hợp, và thể liên hợp 1a – 4a chỉ các thể liên hợp giống nhau có gốc liên kết bổ sung (Y) được sử dụng để liên kết thể liên hợp với oligome (vùng A hoặc với thành phần liên kết phân cắt được bằng con đường sinh học, như vùng B). Đường lượn sóng thể hiện liên kết cộng hóa trị với oligome.

Fig. 2. Ví dụ về gốc liên hợp cholesterol và tocopherol. Thể liên hợp 5a và 6a chỉ các thể liên hợp giống nhau có gốc liên kết bổ sung (Y) được sử dụng để liên kết thể liên

hợp với oligome (vùng A hoặc với thành phần liên kết phân cắt được bằng con đường sinh học, như vùng B). Đường lượn sóng thể hiện liên kết cộng hóa trị với oligome.

Fig. 3. Hợp chất LNA đặc trưng. Beta-D-oxy LNA được xác định bằng chỉ số trên ^L sau chữ cái, chỉ số dưới _s thể hiện liên kết phosphothioat, chỉ số trên ^{Me} đứng trước chữ C hoa thể hiện 5-metyl xytosin LNA, nucleotit không phải LNA là ADN nucleotit (không có chỉ số trên L).

Fig. 4. Ví dụ về thể liên hợp với cholesterol của hợp chất LNA. Beta-D-oxy LNA được xác định bằng chỉ số trên ^L sau chữ cái, chỉ số dưới _s thể hiện liên kết phosphothioat, chỉ số dưới _o thể hiện liên kết phosphodiester, chỉ số trên ^{Me} đứng trước C hoa thể hiện 5-metyl xytosin LNA, nucleotit không phải LNA là ADN nucleotit (không có chỉ số trên L).

Fig. 5. Ví dụ về thể liên hợp với GalNAc của hợp chất LNA. Thể liên hợp này gần như tương ứng với Conj2a trên Hình vẽ trong đó đường lượn sóng được thay thế bằng LNA oligome. Beta-D-oxy LNA được xác định bởi chỉ số trên ^L sau chữ cái, chỉ số dưới _s thể hiện liên kết phosphothioat, chỉ số trên ^{Me} đứng trước C hoa thể hiện 5-metyl xytosin LNA, nucleotit không phải LNA là ADN nucleotit (không có chỉ số trên L).

Fig. 5A. Cấu trúc chi tiết của SEQ ID NO 18.

Fig. 5B. Cấu trúc chi tiết của SEQ ID NO 19.

Fig. 6. Ví dụ về nhóm liên hợp FAM.

Fig. 7. Thể liên hợp LNA-FAM có và không có liên kết phosphodiester phân cắt được. Beta-D-oxy LNA được xác định bởi chỉ số trên ^L sau chữ cái, chỉ số dưới _s thể hiện liên kết phosphothioat, chỉ số dưới _o thể hiện liên kết phosphodiester, chỉ số trên ^{Me} đứng trước C hoa thể hiện 5-metyl xytosin LNA, nucleotit không phải LNA là ADN nucleotit (không có chỉ số trên L).

Fig. 8. Gapme kháng PCSK9 được xếp hạng theo hoạt lực in vitro.

Fig. 9. Gapme kháng PCSK9 được chọn được xếp hạng theo hoạt lực in vitro.

Fig. 10. Hoạt lực in vitro của hợp chất kháng PCSK9 được chọn và kết quả tính toán IC50.

Fig. 11. Số liệu ALT in vivo của các thể liên hợp kháng PCSK9 được chọn.

Fig. 12. Minh họa không giới hạn hợp chất theo sáng chế. Liên kết L giữa các nucleosit có thể là, ví dụ phosphodiester, phosphothioat, phosphodithioat, boranophosphat hoặc methylphosphonat, như phosphodiester. PO là liên kết phosphodiester. Hợp chất a) có vùng

B với ADN (hoặc ARN) đơn, liên kết giữa vùng thứ nhất và vùng thứ hai là PO. Hợp chất b) có hai ADN/ARN (như ADN) nucleosit liên kết bởi liên kết phosphodiester. Hợp chất c) có ba ADN/ARN (như ADN) nucleosit được liên kết bởi liên kết phosphodiester. Theo một số phương án, Vùng B có thể được mở rộng thêm bởi ADN/ARN khác (như ADN nucleosit) liên kết qua phosphodiester. Nhóm liên hợp (được đánh dấu là X, hoặc vùng C trong bản mô tả này) được minh họa trên phía bên trái của mỗi hợp chất (ví dụ, Cholesterol, GalNAc, Conj1 – 4, 1a – 4a, và 5 hoặc 6), và có thể, tùy ý liên kết cộng hóa trị với nucleosit ở đầu tận cùng thuộc vùng B thông qua nhóm liên kết phospho nucleosit, như phosphodiester, phosphothioat, phosphodithioat, boranophosphat hoặc methylphosphonat, hoặc có thể được liên kết thông qua liên kết khác, ví dụ, liên kết triazol (xem L trong các hợp chất d), e), và f)).

Fig. 13. Minh họa không giới hạn về hợp chất theo sáng chế, trong đó hợp chất này bao gồm thành phần liên kết tùy ý (Y) giữa vùng (liên hợp) thứ ba (X) và vùng thứ hai (vùng B). Cách đặt tên giống như trên Fig. 12. Thành phần liên kết thích hợp được bộc lộ ở đây, và bao gồm, ví dụ thành phần liên kết alkyl, ví dụ thành phần liên kết C6. Trong các hợp chất a), b) và c), thành phần liên kết giữa X và vùng B được gắn vào vùng B thông qua nhóm liên kết phospho nucleosit, như phosphodiester, phosphothioat, phosphodithioat, boranophosphat hoặc methylphosphonat, hoặc có thể được liên kết thông qua liên kết khác, ví dụ, liên kết triazol (Li). Trong các hợp chất này, Li thể hiện liên kết giữa các nucleosit thuộc vùng thứ nhất (A) và vùng thứ hai (B). Hợp chất d), e), & f) còn bao gồm thành phần liên kết (Y) giữa vùng B và nhóm liên hợp, và vùng Y có thể liên kết với vùng B thông qua, ví dụ, nhóm liên kết phospho nucleosit, như phosphodiester, phosphothioat, phosphodithioat, boranophosphat hoặc methylphosphonat, hoặc theo một số phương án liên kết triazol. Ngoài ra, hoặc theo cách khác X có thể là nhóm hoạt hóa hoặc nhóm dễ phản ứng. X có thể được liên kết cộng hóa trị với vùng B thông qua nhóm liên kết phospho nucleosit, như phosphodiester, phosphothioat, phosphodithioat, boranophosphat hoặc methylphosphonat, hoặc có thể liên kết thông qua liên kết khác, ví dụ, liên kết triazol.

Fig. 14. Bất hoạt ARN thông tin PCSK9 bằng thể liên hợp cholesterol in vivo. Các con chuột được tiêm liều đơn 10 mg/kg LNA oligonucleotit đối nghĩa chưa được liên hợp (#40) hoặc lượng mol tương đương của LNA oligonucleotit đối nghĩa được liên hợp với Cholesterol nhờ các thành phần liên kết khác nhau và bị giết vào ngày 1, 3, 7 và 10 sau

khi dùng. ARN được phân lập từ gan và thận và được cho qua RT-qPCR A đặc hiệu PCSK9. Việc định lượng ARN thông tin PCSK9 từ các mẫu gan được chuẩn hóa về BACT và được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm của giá trị trung bình của các đối chứng nước muối tương đương B. Việc định lượng ARN thông tin PCSK9 từ các mẫu thận được chuẩn hóa so với BACT và được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm của giá trị trung bình của các đối chứng nước muối tương đương.

Fig. 15. Mức biểu hiện của Kim-1 trong nghiên cứu độ an toàn ở chuột rattus (xem Ví dụ 5).

Fig. 16. PCSK9 và LDL cholesterol trong huyết thanh trong các mẫu từ khi đầu chó được tiêm SEQ ID 2 và 18 bốn lần ở liều 0,5 hoặc 1,5 mg/kg/tuần (một tuần/lần).

Fig. 17. PCSK9 và LDL cholesterol trong huyết thanh trong các mẫu từ khi đầu chó được tiêm SEQ ID 3 và 19 bốn lần ở liều 0,5 hoặc 1,5 mg/kg/tuần (một tuần/lần).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong phần sau đây, các yếu tố khác nhau của sáng chế được mô tả trong các phần có đề mục riêng biệt. Cần phải hiểu rằng có thể kết hợp phương án của một yếu tố với các phương án của các yếu tố khác để thu được hợp chất theo sáng chế (ví dụ, như được minh họa trên Fig. 12 và 13).

Oligome (vùng A)

Thuật ngữ “oligome” hoặc “oligonucleotit” trong ngữ cảnh của sáng chế, chỉ phân tử được tạo thành bằng liên kết cộng hóa trị của hai hoặc nhiều nucleotit (tức là oligonucleotit). Trong bản mô tả này, (đơn vị) nucleotit mạch đơn cũng có thể được gọi là monome hoặc đơn vị. Theo một số phương án, các thuật ngữ “nucleosit”, “nucleotit”, “đơn vị” và “monome” được sử dụng thay thế lẫn nhau. Cần hiểu rằng khi đề cập đến trình tự của nucleotit hoặc monome, tức là đề cập đến trình tự của các bazơ, như A, T, G, C hoặc U.

Oligome theo sáng chế có thể có chiều dài khoảng 10 – 22, như 12 - 22 nucleotit, như 12 - 18 nucleotit. Oligome bao gồm a) trình tự liên kế gồm 10 – 16 nucleotit bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 33 hoặc 34 hoặc 45, hoặc b) trình tự liên kế gồm 16 nucleotit bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 31.

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế bao gồm trình tự liên kế được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO 26, 27, 28, 29 và 44.

Hợp chất (ví dụ, oligome hoặc thể liên hợp) theo sáng chế nhắm đích PCSK9, và như vậy, nó có khả năng điều hòa giảm mức biểu hiện của PCSK9 hoặc ức chế PCSK9, như PCSK9 ở người hoặc ở tế bào biểu hiện PCSK9.

Theo một số phương án, liên kết giữa các nucleosit của trình tự liên kề gồm 10 – 16 nucleotit bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 33 hoặc 34 hoặc 45 có thể là liên kết phosphothioat.

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế bao gồm hoặc gồm trình tự liên kề được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 và 40. Theo một phương án, oligome bao gồm hoặc gồm trình tự được chọn từ a) SEQ ID NO 2 hoặc 3, hoặc b) SEQ ID NO 4, 5 hoặc 6, hoặc c) SEQ ID NO 7 hoặc 8, hoặc d) SEQ ID NO 40.

Theo một số phương án, oligome bao gồm 10 – 16 nucleosit liên kết qua phosphothiolat.

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế bao gồm trình tự liên kề bao gồm ít nhất 10 – 16 nucleotit bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 33 hoặc 34 hoặc 45 hoặc trình tự liên kề của 16 nucleotit bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 31, trong đó trình tự liên kề bao gồm thể tương đồng nucleotit. Tốt hơn là, thể tương đồng nucleotit là thể tương đồng nucleotit có ái lực tăng.

Theo một số phương án, thể tương đồng nucleotit là nucleotit được cải biến bởi đường, như nucleotit được cải biến ở gốc đường độc lập hoặc không độc lập được chọn từ nhóm bao gồm: đơn vị Axit Nucleic bị khóa (LNA); đơn vị 2'-O-alkyl-ARN, đơn vị 2'-OMe-ARN, đơn vị 2'-amino-ADN, và đơn vị 2'-flo-ADN.

Theo một số phương án, thể tương đồng nucleotit bao gồm hoặc là đơn vị Axit Nucleic bị khóa (LNA).

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế bao gồm hoặc là gapme, như LNA gapme oligonucleotit.

Theo một số phương án, Gapme này bao gồm cánh trên mỗi phía (5' và 3') của 2 đến 4 thể tương đồng nucleotit, tốt hơn là thể tương đồng LNA.

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế bao gồm trình tự liên kề gồm 13, 14, 15 hoặc 16 nucleotit bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 33 hoặc 34 hoặc 45 hoặc trình tự liên kề gồm 16 nucleotit bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 31, và có thể tùy ý bao gồm 1 – 6 nucleotit nữa, mà có thể tạo thành hoặc bao gồm vùng nucleotit phân cắt được bằng con đường sinh học, như

thành phần liên kết phosphat nucleotit. Thích hợp nếu vùng nucleotit phân cắt được bằng con đường sinh học được tạo thành từ đoạn kéo giãn ngắn (ví dụ 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6) nucleotit không bền về mặt sinh lý. Điều này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng liên kết phosphodiester với ADN/ARN nucleosit, hoặc nếu có thể duy trì được độ bền sinh lý, nucleosit khác có thể được sử dụng. Độ bền sinh lý có thể được xác định bằng cách sử dụng chất chiết gan, như được minh họa trong ví dụ 6.

Do đó, oligome theo sáng chế có thể bao gồm trình tự nucleotit liên kế có chiều dài 10 – 16 nucleotit bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 33 hoặc 34 hoặc 45 hoặc trình tự liên kế có chiều dài 16 nucleotit bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 31 (A vùng thứ nhất, hoặc vùng A). Oligome theo sáng chế có thể bao gồm vùng nucleotit khác. Theo một số phương án, vùng nucleotit khác này bao gồm vùng nucleotit phân cắt được bằng con đường sinh học, như trình tự phosphat nucleotit (vùng thứ hai, vùng B), có thể liên kết cộng hóa trị vùng A với gốc không phải nucleotit, như nhóm liên hợp, (vùng thứ ba, hoặc vùng C). Theo một số phương án, trình tự nucleotit liên kế của oligome theo sáng chế (vùng A) liên kết cộng hóa trị trực tiếp với vùng C. Theo một số phương án, vùng C là phân cắt được bằng con đường sinh học.

Oligome gồm hoặc bao gồm trình tự nucleotit liên kế có chiều dài từ 12 – 22, như 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 nucleotit, như có chiều dài 14 – 16 nucleotit, như có chiều dài 15 hoặc 16 nucleotit. Do đó, oligome có thể chỉ chiều dài kết hợp của vùng A và vùng B, ví dụ, (Vùng A 10 – 16 nucleotit) và vùng B (1 – 6 nucleotit).

Theo các phương án khác nhau, hợp chất theo sáng chế không bao gồm (đơn vị) ARN. Theo một số phương án, hợp chất theo sáng chế, bao gồm vùng thứ nhất, hoặc vùng thứ nhất và vùng thứ hai (ví dụ, dưới dạng trình tự liên kế mạch đơn), là phân tử mạch thẳng hoặc được tổng hợp dưới dạng phân tử mạch thẳng. Do đó, oligome có thể là phân tử mạch đơn. Theo một số phương án, oligome không bao gồm vùng ngắn, ví dụ, ít nhất 3, 4 hoặc 5 nucleotit liên kế, bổ trợ với vùng tương đương trong cùng oligome (tức là chuỗi kép). Oligome, theo một số phương án, có thể (về bản chất) không ở dạng sợi đôi. Theo một số phương án, oligome về bản chất không ở dạng sợi đôi, như không phải là siARN.

Các trình tự oligome

Bảng sau đưa ra các oligome và thể liên hợp oligome theo sáng chế và trình tự đích PCSK9 theo sáng chế

Bảng 1

SEQ ID	Trình tự	PO	Chol-C6	GalNAc	Vị trí trên gen PCSK9 SEQ ID NO 44
1	TGctacaaaacCCA				3643-3656
2	AATgctacaaaaCCCA				3643-3658
3	AATgctacaaaacCCA				3643-3658
4	GCtgtgtgagcttGG				3251-3265
5	TGctgtgtgagctTGG				3251-3266
6	TGCTgtgtgagctTGG				3251-3266
7	TCCtggtctgtgtTCC				3373-3388
8	TCCtggtctgtgttCC				3373-3388
9	TGctacaaaacCCA	có	có		3643-3656
10	AATgctacaaaaCCCA	có	có		3643-3658
11	AATgctacaaaacCCA	có	có		3643-3658
12	GCtgtgtgagcttGG	có	có		3251-3265
13	TGctgtgtgagctTGG	có	có		3251-3266
14	TGCTgtgtgagctTGG	có	có		3251-3266
15	TCCtggtctgtgtTCC	có	có		3373-3388
16	TCCtggtctgtgttCC	có	có		3373-3388
17	TGctacaaaacCCA			có	3643-3656
18	AATgctacaaaaCCCA			có	3643-3658
19	AATgctacaaaacCCA			có	3643-3658
20	GCtgtgtgagcttGG			có	3251-3265
21	TGctgtgtgagctTGG			có	3251-3266
22	TGCTgtgtgagctTGG			có	3251-3266
23	TCCtggtctgtgtTCC			có	3373-3388
24	TCCtggtctgtgttCC			có	3373-3388
40	GTctgtggaaGCG				1005-1017
41	GTctgtggaaGCG		có		1005-1017
42	GTctgtggaaGCG	có	có		1005-1017
43	GTctgtggaaGCG	có	có		1005-1017
25	tgctacaaaaccca				3643-3656
26	aatgctacaaaaccca				3643-3658
27	gctgtgtgagcttgg				3251-3265
28	tgctgtgtgagcttgg				3251-3266
29	tcctggtctgtgttcc				3373-3388
44	gtctgtggaagcg				1005-1017
30	UGGGUUUUGUAGCA				3643-3656
31	UGGGUUUUGUAGCAUU				3643-3658
32	CCAAGCUCACACAGC				3251-3265
33	CCAAGCUCACACAGCA				3251-3266
34	GGAACACAGACCAGGA				3373-3388

SEQ ID	Trình tự	PO	Chol-C6	GalNAc	Vị trí trên gen PCSK9 SEQ ID NO 44
45	CGCUUCCACAGAC				1005-1017

SEQ ID NO 25 – 29 và 44 là môtip trình tự nucleobazơ.

SEQ ID NO 30 – 34 và 45 là trình tự đích ARN có mặt trong ARN thông tin PCSK9 ở người.

SEQ ID NO 1 là SPC5001.

SEQ ID NO 1 – 24 và 40 đến 43 là oligome bao gồm thể tương đồng nucleotit như LNA gapme oligome, trong đó các chữ thường là đơn vị ADN (nucleosit/nucleotit) trong khi chữ hoa là đơn vị LNA.

Theo một số phương án, tất cả các LNA C đều là 5-metyl xytosin. Theo một số phương án, tất cả các đơn vị LNA đều là beta-D-oxy LNA. Theo một số phương án, tất cả các liên kết giữa nucleosit giữa các nucleosit của SEQ ID NO 1 – 24 và 40 đến 43 đều là liên kết phosphothioat.

SEQ ID NO 9 – 16 và 41 đến 43 bao gồm oligome (như được thể hiện bởi SEQ ID) cũng như thể liên hợp cholesterol có thể liên kết cộng hóa trị với đầu 5' hoặc 3' của oligome này, tùy ý thông qua thành phần liên kết phân cắt được bằng con đường sinh học, như thành phần liên kết phosphat nucleosit. Theo một số phương án, thể liên hợp cholesterol được liên kết ở đầu 5' của oligome.

SEQ ID NO 17 – 24 bao gồm oligome (như được thể hiện bởi SEQ ID) cũng như thể liên hợp GalNAc có thể liên kết cộng hóa trị với đầu 5' hoặc 3' của oligome này, tùy ý thông qua thành phần liên kết phân cắt được bằng con đường sinh học, như thành phần liên kết phosphat nucleosit hoặc thành phần liên kết peptit phân cắt được. Theo một số phương án, thể liên hợp GalNAc được liên kết ở đầu 5' của oligome.

Các oligome và thể liên hợp cụ thể sử dụng trong bản mô tả này được minh họa trên Fig. 3 (oligome), Fig. 4 (thể liên hợp cholesterol), Fig. 5 (thể liên hợp GalNAc). Các ví dụ khác về thể liên hợp có thể được sử dụng với oligome theo sáng chế được minh họa trên Fig. 1 và 2 và được mô tả trong phần Gốc liên hợp GalNAc.

Bảng 2 đưa ra các tổ hợp cụ thể của oligome và thể liên hợp.

Bảng 2: Tổ hợp oligome/thể liên hợp.

SEQ ID	Số thẻ liên hợp (Xem Fig. 1)							
	Conj1	Conj2	Conj3	Conj4	Conj1a	Conj2a	Conj3a	Conj4a
2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
3	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18
4	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19
5	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37
6	C40	C41	C42	C43	C44	C45	C46	C47
7	C50	C51	C52	C53	C54	C55	C56	C57
8	C60	C61	C62	C63	C64	C65	C66	C67

SEQ ID	Số thẻ liên hợp (Xem Fig. 2)			
	Conj5	Conj6	Conj5a	Conj6a
2	C9	C10	C70	C71
3	C19	C20	C72	C73
4	C20	C21	C74	C75
5	C38	C39	C76	C77
6	C48	C49	C78	C79
7	C58	C59	C80	C81
8	C68	C69	C82	C83

Tất cả các tổ hợp này có thể quan sát được bằng cách thay thế đường lượn sóng trên Fig. 1 hoặc 2 bằng trình tự của oligome. Fig. 5 thể hiện tổ hợp của Conj2a với các SEQ ID NO đã nêu trên. Fig. 5A và 5B là hai ví dụ cụ thể về hợp chất trên Fig. 5. Lưu ý rằng thành phần liên kết phân cắt được bằng con đường sinh học (B) có thể có mặt hoặc không có mặt giữa gốc liên hợp(C) và oligome(A). Đối với Conj1 – 4 và 1a – 4a thẻ liên hợp GalNAc tự phân cắt được bằng con đường sinh học, sử dụng thành phần liên kết peptit trong nhóm GalNAc, và như vậy, thành phần liên kết phân cắt được bằng con đường sinh học (B) khác có thể có hoặc có thể không được sử dụng. Tuy nhiên, số liệu sơ bộ cho thấy có mặt thành phần liên kết phân cắt được bằng con đường sinh học (B), như thành phần liên kết phosphat nucleotit được bộc lộ trong bản mô tả này có thể

tăng cường hoạt tính của thể liên hợp oligome nhóm GalNAc này. Fig. 4 thể hiện tổ hợp của Conj5a với các SEQ ID NO đã được thể hiện ở trên với thành phần liên kết phân cắt được bằng con đường sinh học (B) bao gồm hai ADN monome C và A được liên kết bằng liên kết phosphodiester. Để sử dụng cùng với Conj 5 và Conj 6, nên sử dụng thành phần liên kết phân cắt được bằng con đường sinh học có tác dụng tăng cường việc kết hợp hoạt tính thành phần liên kết phân cắt được bằng con đường sinh học (B) vào hợp chất, như thành phần liên kết phosphat nucleotit được bộc lộ trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "tương ứng với" ở dạng động từ và danh từ chỉ sự so sánh giữa trình tự nucleotit của oligome (tức là, trình tự nucleobazơ hoặc bazơ) hoặc trình tự nucleotit liên kết (vùng thứ nhất/vùng A) với trình tự bổ trợ ngược của axit nucleic đích, hoặc tiểu vùng của nó (ví dụ, SEQ ID NO 31, 32, 33, 34 hoặc 45). Thể tương đồng nucleotit được so sánh trực tiếp với nucleotit tương ứng hoặc tương đương của nó. Theo một phương án được ưu tiên, oligome (hoặc vùng thứ nhất của nó) bổ trợ với vùng đích hoặc tiểu vùng của nó (ví dụ, SEQ ID NO 31, 32, 33, 34 hoặc 45), như trình tự bổ sung đầy đủ.

Các thuật ngữ "trình tự bổ trợ ngược", "bổ trợ ngược" và "tính bổ trợ ngược" như được sử dụng trong bản mô tả là có thể được dùng thay thế các thuật ngữ "trình tự bổ trợ", "bổ trợ" và "tính bổ trợ".

Thuật ngữ, "bổ trợ" nghĩa là hai trình tự là bổ trợ khi trình tự này có thể liên kết với trình tự còn lại theo chiều đối song song, trong đó khi đầu 3' của một trình tự liên kết với đầu 5' của trình tự còn lại thì mỗi A, T(U), G, và C của trình tự đó thẳng hàng với T(U), A, C, và G, một cách tương ứng, của trình tự còn lại. Thông thường, trình tự bổ trợ của oligonucleotit có mức bổ trợ ít nhất 90%, tốt hơn là 95%, tốt nhất là 100%, với trình tự đã được xác định.

Các thuật ngữ "thể tương đồng nucleotit tương ứng" và "nucleotit tương ứng" được dự định biểu thị rằng nucleotit trong thể tương đồng nucleotit và giống với nucleotit có trong tự nhiên. Ví dụ, khi đơn vị 2-deoxyriboza của nucleotit liên kết với adenin, thì "thể tương đồng nucleotit tương ứng" chứa đơn vị pentoza (khác với 2-deoxyriboza) liên kết với adenin.

Thuật ngữ "nucleobazơ" chỉ gốc bazơ của nucleotit và bao hàm cả biến thể có trong tự nhiên cũng như biến thể không có trong tự nhiên. Do đó, "nucleobazơ" không chỉ bao gồm các dị vòng purin và pyrimidin đã biết mà còn cả thể tương đồng dị vòng

và tautome của chúng. Cần hiểu rằng ADN hoặc ARN nucleosit của vùng B có thể có (các) nucleobazơ có trong tự nhiên và/hoặc không có trong tự nhiên.

Ví dụ về nucleobazơ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, adenin, guanin, xytosin, thymidin, uraxil, xanthin, hypoxanthin, 5-metylxytosin, isoxytosin, pseudoisoxytosin, 5-bromouraxil, 5-propynyluraxil, 6-aminopurin, 2-aminopurin, inosin, diaminopurin, và 2-clo-6-aminopurin. Theo một số phương án, nucleobazơ có thể độc lập được chọn từ nhóm bao gồm adenin, guanin, xytosin, thymidin, uraxil, 5-metylxytosin. Theo một số phương án, nucleobazơ có thể độc lập được chọn từ nhóm bao gồm adenin, guanin, xytosin, thymidin, và 5-metylxytosin.

Theo một số phương án, ít nhất một trong số các nucleobazơ có mặt trong oligome là nucleobazơ được cải biến được chọn từ nhóm bao gồm 5-metylxytosin, isoxytosin, pseudoisoxytosin, 5-bromouraxil, 5-propynyluraxil, 6-aminopurin, 2-aminopurin, inosin, diaminopurin, và 2-clo-6-aminopurin.

Đích

Oligome thích hợp theo sáng chế có khả năng điều biến sự biểu hiện của gen PCSK9. Tốt hơn nếu oligome có khả năng điều hòa giảm mức biểu hiện của gen PCSK9. Về mặt này, oligome theo sáng chế có thể tác động đến sự biểu hiện của PCSK9, cụ thể là ở động vật có vú như tế bào của người, như tế bào gan. Theo một số phương án, các oligome theo sáng chế liên kết với axit nucleic đích và tác động đến sự biểu hiện bằng cách làm giảm ít nhất 10% hoặc 20% so với mức độ biểu hiện bình thường (ví dụ, mức độ biểu hiện của tế bào, động vật hoặc người được điều trị bằng nước muối), tốt hơn là ức chế ít nhất 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 95% so với mức độ biểu hiện bình thường. Theo một số phương án, việc điều biến như vậy được thấy khi sử dụng hợp chất theo sáng chế với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,04 đến 25nM, như khoảng từ 0,8 đến 20nM. Theo một số phương án, việc điều biến như vậy được thấy khi sử dụng hợp chất theo sáng chế với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 15 mg/kg, như khoảng từ 0,05 đến 10 mg/kg, như khoảng từ 0,1 đến 7,5 mg/kg, như khoảng từ 0,25 đến 5 mg/kg, như khoảng từ 0,5 đến 2,5 mg/kg. Theo cùng phương án hoặc theo phương án khác nhau, tỷ lệ ức chế sự biểu hiện là thấp hơn 100%, như ức chế ít hơn 98%, ức chế ít hơn 95%, ức chế ít hơn 90%, ức chế ít hơn 80%, như ức chế ít hơn 70%. Sự điều biến mức độ biểu hiện có thể được xác định bằng cách đo lượng protein, ví dụ, bằng phương pháp như chênh lệch tiêu chuẩn S-PAGE sau đó bằng thẩm tách western bằng cách sử dụng

dụng kháng thể thích hợp kháng lại protein đích. Theo cách khác, sự điều biến mức độ biểu hiện có thể được xác định bằng cách đo lượng ARN thông tin, ví dụ, bằng cách tách Northern hoặc RT-PCR định lượng. Khi đo thông qua lượng ARN thông tin, mức độ điều hòa giảm khi sử dụng liều lượng thích hợp, như khoảng từ 0,04 đến 25nM, như nồng độ trong khoảng từ 0,8 đến 20nM, là, theo một số phương án, thường ở mức nằm trong khoảng từ 10 đến 20% mức bình thường khi không có mặt hợp chất theo sáng chế.

Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp điều hòa giảm hoặc ức chế sự biểu hiện của protein PCSK9 và/hoặc ARN thông tin trong tế bào biểu hiện protein PCSK9 và/hoặc ARN thông tin, phương pháp này bao gồm bước gắn oligome hoặc thể liên hợp theo sáng chế vào tế bào này để điều hòa giảm hoặc ức chế biểu hiện của protein PCSK9 và/hoặc ARN thông tin trong tế bào này. Tế bào thích hợp là tế bào của động vật có vú như tế bào của người. Theo một số phương án, việc sử dụng này có thể diễn ra in vitro. Theo một số phương án, việc sử dụng này có thể diễn ra in vivo.

Thuật ngữ “axit nucleic đích”, như được sử dụng trong bản mô tả chỉ ADN hoặc ARN mã hóa polypeptit PCSK9 của động vật có vú, như PCSK9 của người, như số nộp lưu NCBI là NM_174936 SEQ ID NO: 46. PCSK9 mã hóa axit nucleic hoặc biến thể có trong tự nhiên của nó, và axit nucleic ARN thu được từ đó, tốt hơn nếu là ARN thông tin, như tiền ARN thông tin, mặc dù tốt hơn nếu là ARN thông tin trưởng thành. Theo một số phương án, ví dụ khi được sử dụng trong nghiên cứu hoặc trong các chẩn đoán, “axit nucleic đích” có thể là ADN bổ trợ hoặc oligonucleotit tổng hợp thu được từ ADN hoặc axit nucleic ARN đích ở trên. Tốt hơn là, oligome theo sáng chế có khả năng lai với axit nucleic đích. SEQ ID NO: 46 sẽ được nhìn nhận là trình tự ADN bổ trợ, và như vậy, tương ứng với trình tự đích ARN thông tin trưởng thành, mặc dù uraxil được thay bằng thymidin trong các trình tự ADN bổ trợ.

Thuật ngữ “biến thể có trong tự nhiên của nó” chỉ các biến thể của polypeptit PCSK9 có trình tự axit nucleic có trong tự nhiên nằm trong nhóm phân loại xác định, như động vật có vú, như chuột, khỉ, và tốt hơn nếu là người. Cụ thể, khi đề cập đến “biến thể có trong tự nhiên” của polynucleotit, thuật ngữ này cũng có thể bao gồm biến thể alen bất kỳ của PCSK9 mã hóa ADN bộ gen được tìm thấy ở nhiễm sắc thể 4, tại 4 C7 bởi sự hoán vị hoặc nhân đôi nhiễm sắc thể, và ARN, như ARN thông tin thu được từ đó. “Biến thể có trong tự nhiên” cũng có thể bao gồm các biến thể thu được từ sự cắt

nổi chọn lọc ARN thông tin PCSK9. Khi liên quan đến trình tự polypeptit đặc hiệu, ví dụ, thuật ngữ còn bao gồm các dạng có trong tự nhiên của protein mà nhờ đó có thể được xử lý, ví dụ, bằng các cải biến đồng thời với quá trình dịch mã hoặc sau quá trình dịch mã, như phân cắt peptit tín hiệu, phân cắt nhờ phân giải protein, glycosyl hóa, v.v.

Theo một số phương án, oligome (hoặc phần nucleotit liền kề của nó) được chọn từ, hoặc bao gồm, một trong số các trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 28 hoặc 29 hoặc 44, hoặc trình tự con của ít nhất 10 nucleotit liền kề của nó, trong đó oligome này (hoặc phần nucleotit liền kề của nó) có thể tùy ý bao gồm một, hai, hoặc ba cặp lện khi so sánh với trình tự này.

Theo một số phương án, trình tự đích được chọn từ, hoặc bao gồm hoặc gồm có, một trong số các trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO 31, 32, 33, 34 hoặc 45, hoặc trình tự con của ít nhất 10 nucleotit liền kề có SEQ ID NO: 33, 34 hoặc 45.

Theo một số phương án, trình tự con có thể bao gồm 11, 12, 13, 14, 15 hoặc 16 nucleotit liền kề, như khoảng từ 12 đến 16 nucleotit. Theo một số phương án, thích hợp là trình tự con có cùng chiều dài với trình tự nucleotit liền kề của oligome theo sáng chế (tùy ý loại trừ vùng B khi vùng B không bổ sung cho đích).

Tuy nhiên, theo một số phương án, trình tự nucleotit của oligome được thấy là có thể bao gồm nucleotit 5' hoặc 3' bổ sung, như, độc lập, 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 nucleotit 5' và/hoặc 3' bổ sung, không bổ trợ với trình tự đích – oligonucleotit không bổ sung này có thể tạo thành vùng B. Về mặt này, theo một số phương án, oligome theo sáng chế có thể bao gồm trình tự nucleotit liền kề được kẹp sườn 5' và hoặc 3' bằng nucleotit bổ sung. Theo một số phương án, nucleotit 5' hoặc 3' bổ sung là nucleotit có trong tự nhiên, như ADN hoặc ARN. Theo một số phương án, nucleotit 5' hoặc 3' bổ sung có thể là vùng D như được nói đến trong các oligome gapme trong bản mô tả.

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit theo SEQ ID NO: 27, hoặc trình tự con có ít nhất 10 hoặc 12 nucleobazơ của nó.

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit theo SEQ ID NO: 28, hoặc trình tự con có ít nhất 10 hoặc 12 nucleobazơ của nó. Theo một phương án được ưu tiên, oligome theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit theo SEQ ID NO: 5 hoặc 6. Theo một phương án được ưu tiên khác,

thể liên hợp oligome theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit theo SEQ ID NO: 13 hoặc 14 hoặc 21 hoặc 22.

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit theo SEQ ID NO: 29, hoặc trình tự con có ít nhất 10 hoặc 12 nucleobazơ của nó. Theo một phương án được ưu tiên, oligome theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit theo SEQ ID NO: 7 hoặc 8. Theo một phương án được ưu tiên khác, thể liên hợp oligome theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit theo SEQ ID NO: 15 hoặc 16 hoặc 23 hoặc 24.

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit theo SEQ ID NO: 44, hoặc trình tự con có ít nhất 10 hoặc 12 nucleobazơ của nó. Theo một phương án được ưu tiên, oligome theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit theo SEQ ID NO: 40. Theo một phương án được ưu tiên khác, thể liên hợp oligome theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit theo SEQ ID NO: 41, 42 hoặc 43.

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit theo SEQ ID NO: 26. Theo một phương án được ưu tiên, oligome theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit theo SEQ ID NO: 2 hoặc 3. Theo một phương án được ưu tiên khác, thể liên hợp oligome theo sáng chế bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit theo SEQ ID NO: 10 hoặc 11 hoặc 18 hoặc 19.

Chiều dài

Oligome có thể bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit liên kế có tổng cộng 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, hoặc 22 nucleotit liên kế theo chiều dài. Chiều dài có thể bao gồm, ví dụ vùng A hoặc vùng A và B.

Theo một số phương án, oligome bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit liên kế có tổng khoảng từ 10 đến 22, như 12 đến 18, như 13 đến 17 hoặc 12 đến 16, như 13, 14, 15, 16 nucleotit liên kế theo chiều dài. Tốt hơn nếu oligome của vùng A bao gồm hoặc gồm có trình tự nucleotit liên kế có 14 nucleotit liên kế theo chiều dài, được ưu tiên hơn là 15 nucleotit liên kế theo chiều dài, và ưu tiên nhất là 16 nucleotit liên kế theo chiều dài.

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế có chứa không nhiều hơn 22 nucleotit, như không nhiều hơn 20 nucleotit, như không nhiều hơn 18 nucleotit, như 15,

16 hoặc 17 nucleotit. Theo một số phương án, oligome theo sáng chế chứa ít hơn 20 nucleotit.

Thẻ tương đồng nucleotit

Thuật ngữ “nucleotit” như được sử dụng trong bản mô tả, chỉ glycosit bao gồm gốc đường, gốc bazơ và nhóm liên kết đồng hóa trị, như nhóm liên kết phosphat hoặc phosphothioat giữa các nucleotit, và bao gồm cả hai nucleotit có trong tự nhiên, như ADN hoặc ARN, và các nucleotit không có trong tự nhiên chứa các gốc đường và/hoặc bazơ được cải biến, mà trong bản mô tả còn được gọi là “thẻ tương đồng nucleotit”. Trong bản mô tả, nucleotit đơn (đơn vị) cũng có thể được đề cập đến dưới dạng monome hoặc nhóm axit nucleic.

Trong lĩnh vực hóa sinh, thuật ngữ “nucleosit” thường được dùng để chỉ glycosit bao gồm gốc đường và gốc bazơ. Liên kết cộng hóa trị giữa hai nucleosit có thể được đề cập đến dưới dạng liên kết giữa các nucleosit. Theo cách khác, thuật ngữ liên kết giữa các nucleotit có thể dùng để mô tả liên kết giữa các nucleotit của oligome.

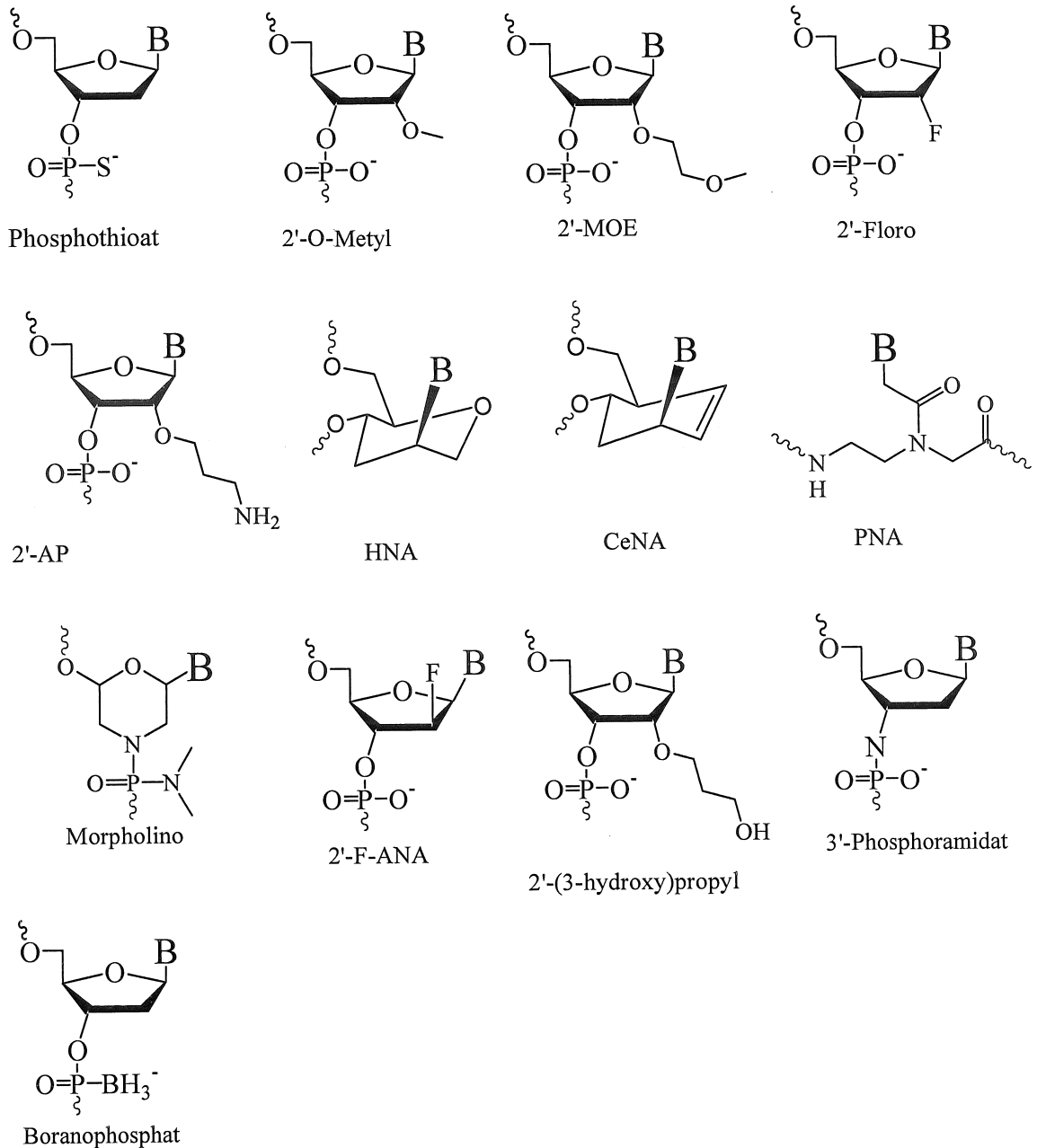
Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra, nucleotit 5' của oligonucleotit không chứa nhóm liên kết giữa các nucleotit 5', mặc dù nó có thể bao gồm hoặc không bao gồm nhóm đầu tận 5', như phosphodiester hoặc phosphothioat thích hợp để liên hợp với thành phần liên kết (B hoặc Y hoặc gốc liên hợp).

Nucleotit không có trong tự nhiên bao gồm các nucleotit có gốc đường được biến đổi, như nucleotit hai vòng hoặc nucleotit được biến đổi ở vị trí 2', như nucleotit được thế ở vị trí 2'.

“Thẻ tương đồng nucleotit” là các biến thể của nucleotit tự nhiên, như nucleotit ADN hoặc ARN, do các biến đổi ở các gốc đường và/hoặc bazơ. Về nguyên tắc, thẻ tương đồng có thể chỉ đơn thuần là “bất hoạt” hoặc “tương đương” so với nucleotit tự nhiên trong trường hợp của các oligonucleotit, tức là không có tác dụng về mặt chức năng đến cách oligonucleotit hoạt động để ức chế sự biểu hiện của gen đích. Tuy nhiên, thẻ tương đồng “tương đương” có thể là hữu ích nếu, ví dụ, chúng dễ dàng sản xuất hơn hoặc sản xuất ít tốn kém hơn, hoặc ổn định hơn trong quá trình bảo quản hoặc trong các điều kiện sản xuất, hoặc chúng là thẻ gắn hoặc nhãn dán. Tuy nhiên, tốt hơn là, thẻ tương đồng sẽ có tác dụng về mặt chức năng đến cách oligome hoạt động ức chế sự biểu hiện; ví dụ bằng cách tạo ra ái lực liên kết tăng (tăng cường ái lực) với đích và/hoặc tính kháng nucleaza nội bào tăng và/hoặc sự dễ dàng trong việc vận chuyển vào tế bào tăng. Các ví

dụ cụ thể về thể tương đồng nucleosit được mô tả bởi ví dụ, Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 và Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213, và trong Sơ đồ 1:

Sơ đồ 1



Do đó, oligome có thể bao gồm hoặc gồm có trình tự đơn giản của nucleotit có trong tự nhiên – tốt hơn nếu là 2'-deoxynucleotit (được gọi chung là “ADN”), nhưng cũng có thể là ribonucleotit (được gọi chung là “ARN”), hoặc kết hợp của các nucleotit có trong tự nhiên này và một hoặc nhiều nucleotit không có trong tự nhiên, tức là thể tương đồng nucleotit. Thể tương đồng nucleotit này có thể làm tăng một cách thích hợp ái lực của oligome với trình tự đích. Các ví dụ về thể tương đồng nucleotit thích hợp và được ưu tiên được đưa ra trong WO 2007/031091 hoặc được tham khảo trong đó.

Sự kết hợp của các thể tương đồng nucleotit tăng cường ái lực trong oligome, như LNA hoặc đường được thể ở vị trí 2', có thể cho phép giảm kích cỡ của oligome liên kết đặc hiệu, và cũng có thể giảm giới hạn trên đến kích cỡ của oligome trước khi xảy ra liên kết không đặc hiệu hoặc liên kết bất thường.

Theo một số phương án, oligome chứa ít nhất 2 thể tương đồng nucleotit. Theo một số phương án, oligome chứa khoảng từ 3 đến 8 thể tương đồng nucleotit, ví dụ, 6 hoặc 7 thể tương đồng nucleotit.

Các ví dụ về thể tương đồng nucleotit bao gồm sự biến đổi gốc đường để tạo ra nhóm thể ở vị trí 2' hoặc để tạo ra cấu trúc hai vòng làm tăng ái lực liên kết và cũng có thể tạo ra tính kháng nucleaza tăng.

Theo một số phương án, thể tương đồng nucleotit có mặt trong oligome đối nghĩa theo sáng chế (như trong các vùng X' và Y' được nêu trong phần "Thiết kế Gapme") độc lập được chọn từ, ví dụ: nhóm 2'-O-alkyl-ARN, nhóm 2'-OMe-ARN, 2'-O-alkyl-ADN, nhóm 2'-amino-ADN, nhóm 2'-floro-ADN, nhóm LNA, nhóm axit arabino nucleic (ANA), nhóm 2'-floro-ANA, nhóm HNA, nhóm INA (axit nucleic xen kẽ - Christensen, 2002. Nucl. Acids. Res. 2002 30: 4918-4925, được kết hợp bằng cách tham khảo) và nhóm 2'MOE.

Theo một số phương án, thể tương đồng nucleotit là 2'-O-metoxyletyl-ARN (2'MOE), monome 2'-floro-ADN hoặc thể tương đồng nucleotit LNA, và oligonucleotit đối nghĩa như vậy theo sáng chế có thể bao gồm thể tương đồng nucleotit được chọn độc lập từ ba loại thể tương đồng này, hoặc có thể bao gồm chỉ một loại thể tương đồng được chọn từ ba loại này. Theo một số phương án, ít nhất một thể tương đồng nucleotit này là 2'-MOE-ARN, như 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 nhóm nucleotit 2'-MOE-ARN. Theo một số phương án, ít nhất một trong số các thể tương đồng nucleotit là 2'-floro ADN, như 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 nhóm nucleotit 2'-floro-ADN.

Thể tương đồng nucleotit được ưu tiên là LNA, như oxy-LNA (như beta-D-oxy-LNA, và alpha-L-oxy-LNA), và/hoặc amino-LNA (như beta-D-amino-LNA và alpha-L-amino-LNA) và/hoặc thio-LNA (như beta-D-thio-LNA và alpha-L-thio-LNA) và/hoặc ENA (như beta-D-ENA và alpha-L-ENA). Được ưu tiên nhất là beta-D-oxy-LNA.

Theo một số phương án, chỉ có một trong số các loại nêu trên của thể tương đồng nucleotit có mặt trong oligonucleotit đối nghĩa theo sáng chế, hoặc trình tự nucleotit liên kề của nó.

Theo một số phương án, oligonucleotit đối nghĩa theo sáng chế bao gồm ít nhất một nhóm axit nucleic bị khóa (Locked Nucleic Acid - LNA), như 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 nhóm LNA, như từ 3 đến 7 hoặc 4 đến 8 nhóm LNA. Theo phương án được ưu tiên nhất cho đến nay, ít nhất một trong số các thể tương đồng nucleotit này là axit nucleic bị khóa (LNA); ví dụ ít nhất 3 hoặc ít nhất 4, hoặc ít nhất 5, hoặc ít nhất 6, hoặc ít nhất 7, hoặc 8, trong số các thể tương đồng nucleotit có thể là LNA. Theo một số phương án, tất cả các thể tương đồng nucleotit có thể là LNA.

Theo một số phương án, oligonucleotit đối nghĩa theo sáng chế có thể bao gồm cả thể tương đồng nucleotit (tốt hơn nếu là LNA) và nhóm ADN. Tốt hơn nếu toàn bộ thể tương đồng nucleotit (tốt hơn nếu là LNA) kết hợp và nhóm ADN là từ 10 đến 25, như từ 10 đến 24, tốt hơn nếu là từ 10 đến 20, như từ 10 đến 18, thậm chí tốt hơn nữa nếu là từ 12 đến 16. Theo một số phương án, trình tự nucleotit của oligonucleotit đối nghĩa theo sáng chế, như trình tự nucleotit liên kề, gồm ít nhất một thể tương đồng nucleotit (tốt hơn nếu là LNA) và nhóm nucleotit còn lại là nhóm ADN. Theo một số phương án, oligonucleotit đối nghĩa theo sáng chế chỉ bao gồm thể tương đồng nucleotit LNA và các nucleotit có trong tự nhiên (như ARN hoặc ADN, tốt nhất nếu là nucleotit ADN), tùy ý với các liên kết giữa các nucleotit được biến đổi như phosphothioat.

Nhận ra rằng khi đề cập đến môtip trình tự nucleotit hoặc trình tự nucleotit được ưu tiên, mà chỉ gồm có các nucleotit, các oligome theo sáng chế được định nghĩa là trình tự có thể bao gồm thể tương đồng nucleotit tương ứng thay cho một hoặc nhiều nucleotit có mặt trong trình tự này, như nhóm LNA hoặc thể tương đồng nucleotit khác, mà làm tăng tính ổn định kép/ T_m của oligome/hai đích (tức là thể tương đồng nucleotit tăng cường ái lực).

Phân tích T_m : Oligonucleotit: Oligonucleotit và các cặp đích ARN (PO) được pha loãng đến nồng độ 3 mM trong 500 ml nước không chứa RNaza và được trộn với 500 ml 2x T_m -đệm (NaCl 200mM, EDTA 0,2mM, Naphosphat 20mM, pH = 7,0). Dung dịch được gia nhiệt đến 95°C trong 3 phút và sau đó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Nhiệt độ nóng chảy (T_m) kép được đo trên quang phổ kế Lambda 40 UV/VIS được trang bị phần lập trình nhiệt độ Peltier PTP6 sử dụng phần mềm PE Templab (Perkin

Elmer). Nhiệt độ được tăng lên đến khoảng từ 20°C đến 95°C và sau đó giảm xuống 25°C, độ hấp thụ ghi nhận ở 260 nm. Đạo hàm thứ nhất và các giá trị tối đa cục bộ của nhiệt độ nóng chảy và nhiệt độ ủ được sử dụng để đánh giá T_m kép.

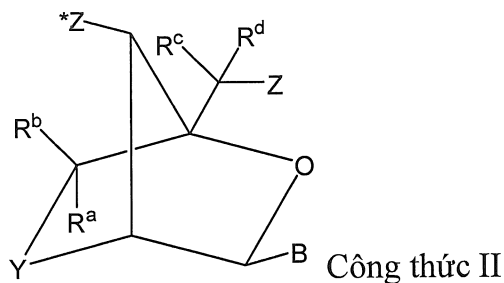
Theo một số phương án, tốt hơn nếu các bất cặp lệch bất kỳ giữa trình tự nucleotit của oligome và trình tự đích được tìm thấy trong các vùng nằm bên ngoài thể tương đồng nucleotit tăng cường ái lực, như vùng Y' như được nêu trong phần "Thiết kế Gapme, và/hoặc ở vị trí không bị biến đổi, như nucleotit ADN, trong oligonucleotit, và/hoặc trong các vùng ở đầu 5' hoặc đầu 3' đối với trình tự nucleotit liền kề.

LNA

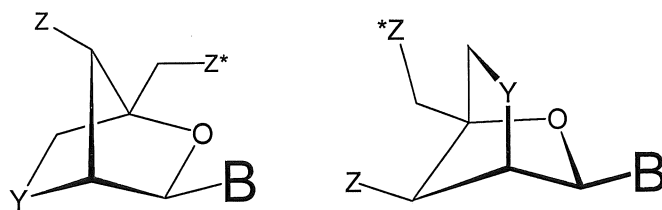
Thuật ngữ "LNA" chỉ thể tương đồng nucleosit hai vòng bao gồm cầu nằm giữa vị trí 2' và 4' trong vòng riboza (thể tương đồng nucleotit hai vòng 2' đến 4'), và được biết là "Axit nucleic bị khóa"). Trong lĩnh vực này, LNA đôi khi chỉ BNA (axit nucleic có cầu hoặc axit nucleic hai vòng) và hai thuật ngữ này có thể được sử dụng hoán đổi cho nhau. Thuật ngữ LNA có thể chỉ monome LNA, hoặc, khi được sử dụng với "oligonucleotit LNA", LNA chỉ oligonucleotit chứa một hoặc nhiều thể tương đồng nucleotit hai vòng như vậy. Theo một vài khía cạnh, thể tương đồng nucleosit hai vòng là nucleotit LNA, và do đó các thuật ngữ này có thể được sử dụng hoán đổi cho nhau, và trong các phương án như vậy, cả hai được đặc trưng bởi sự có mặt của nhóm thành phần liên kết (như cầu) nằm giữa C2' và C4' của vòng đường riboza.

Theo một số phương án, oligonucleotit đối nghĩa theo sáng chế có thể bao gồm cả beta-D-oxy-LNA, và một hoặc nhiều nhóm LNA sau: thio-LNA, amino-LNA, oxy-LNA, 5'-metyl-LNA và/hoặc ENA trong cấu hình beta-D hoặc alpha-L hoặc kết hợp của nó. Theo một số phương án, tất cả các nhóm xytosin LNA là 5'-metyl-xytosin. Theo một số phương án, ít nhất một thể tương đồng nucleosit có mặt trong vùng thứ nhất (X') là thể tương đồng nucleosit hai vòng, như ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 6, ít nhất 7, ít nhất 8, (trừ nucleosit ADN và hoặc ARN của vùng Y') là thể tương đồng nucleosit có gốc đường được biến đổi, như thể tương đồng nucleosit hai vòng, như LNA, ví dụ, beta-D-X-LNA hoặc alpha-L-X-LNA (trong đó X là oxy, amino hoặc thio), hoặc các LNA khác được bộc lộ trong bản mô tả bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (R/S) cET, cMOE hoặc 5'-Me-LNA.

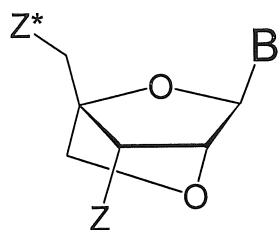
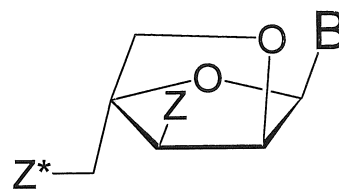
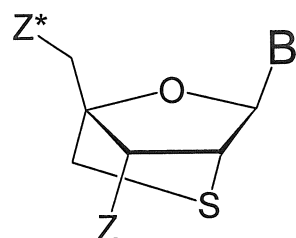
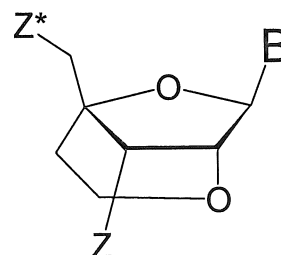
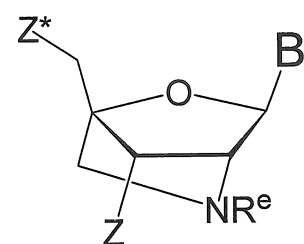
Theo một số phương án, tốt hơn nếu LNA được sử dụng trong các hợp chất oligonucleotit theo sáng chế có công thức cấu tạo chung II:



trong đó Y được chọn từ nhóm bao gồm -O-, -CH₂O-, -S-, -NH-, N(R^e) và/hoặc -CH₂-; Z và Z* độc lập được chọn trong số liên kết giữa các nucleotit, R^H, nhóm đầu tận hoặc nhóm bảo vệ; B cấu thành gốc bazơ nucleotit tự nhiên hoặc không tự nhiên (nucleobazơ), và R^H được chọn từ hydro và C₁₋₄-alkyl; R^a, R^b, R^c, R^d và R^e, độc lập tùy ý, được chọn từ nhóm bao gồm hydro, C₁₋₁₂-alkyl được thế tùy ý, C₂₋₁₂-alkenyl được thế tùy ý, C₂₋₁₂-alkynyl được thế tùy ý, hydroxy, C₁₋₁₂-alkoxy, C₂₋₁₂-alkoxyalkyl, C₂₋₁₂-alkenyloxy, carboxy, C₁₋₁₂-alkoxycarbonyl, C₁₋₁₂-alkylcarbonyl, formyl, aryl, aryloxy-carbonyl, aryloxy, arylcarbonyl, heteroaryl, heteroaryloxy-carbonyl, heteroaryloxy, heteroarylcarbonyl, amino, mono- và di(C₁₋₆-alkyl)amino, carbamoyl, mono- và di(C₁₋₆-alkyl)-amino-carbonyl, amino-C₁₋₆-alkyl-aminocarbonyl, mono- và di(C₁₋₆-alkyl)amino-C₁₋₆-alkyl-aminocarbonyl, C₁₋₆-alkyl-carbonylamino, carbamido, C₁₋₆-alkanoyloxy, sulphonyl, C₁₋₆-alkylsulphonyloxy, nitro, azido, sulphonyl, C₁₋₆-alkylthio, halogen, đoạn xen kẽ ADN, nhóm có hoạt tính quang hóa, nhóm có hoạt tính nhiệt hóa, nhóm chelat hóa, nhóm chỉ thị, và phối tử, trong đó aryl và heteroaryl có thể được thế tùy ý và trong đó hai phần tử thế sinh đôi R^a và R^b cùng nhau có thể chỉ metylen (=CH₂) được thế tùy ý; và R^H được chọn từ hydro và C₁₋₄-alkyl. Theo một số phương án R^a, R^b, R^c, R^d và R^e, tùy ý độc lập, được chọn từ nhóm bao gồm hydro và C₁₋₆ alkyl, như metyl. Với tất cả các tâm không đối xứng, các nhóm không đối xứng có thể được tìm thấy theo hướng R hoặc S, ví dụ, hai chất đồng phân hóa lập thể được lấy ví dụ bao gồm dạng đồng phân beta-D và alpha-L, có thể được minh họa như sau:



Các nhóm LNA được đưa ví dụ cụ thể được thể hiện dưới đây:

 β -D-oxy-LNA α -L-Oxy-LNA β -D-thio-LNA β -D-ENA β -D-amino-LNA

Thuật ngữ "thio-LNA" bao gồm nucleotit bị khóa, trong đó Y trong công thức chung ở trên được chọn từ S hoặc $-\text{CH}_2\text{-S}-$. Thio-LNA có thể ở cả hai cấu hình beta-D và alpha-L-.

Thuật ngữ "amino-LNA" bao gồm nucleotit bị khóa, trong đó Y trong công thức chung ở trên được chọn từ $-\text{N}(\text{H})-$, $\text{N}(\text{R})-$, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{H})-$, và $-\text{CH}_2\text{-N}(\text{R})-$ trong đó R được chọn từ hydro và $\text{C}_{1-4}\text{-alkyl}$. Amino-LNA có thể ở cả hai cấu hình beta-D và alpha-L-.

Thuật ngữ "oxy-LNA" bao gồm nucleotit bị khóa, trong đó Y trong công thức chung ở trên là $-\text{O}-$. Oxy-LNA có thể ở cả hai cấu hình beta-D và alpha-L-.

Thuật ngữ "ENA" bao gồm nucleotit bị khóa, trong đó Y trong công thức chung nêu trên là $-\text{CH}_2\text{-O}-$ (trong đó nguyên tử oxy của $-\text{CH}_2\text{-O}-$ được gắn vào vị trí 2' so với bazơ B). R^e là hydro hoặc metyl.

Theo một số phương án ví dụ, LNA được chọn từ beta-D-oxy-LNA, alpha-L-oxy-LNA, beta-D-amino-LNA và beta-D-thio-LNA, cụ thể là beta-D-oxy-LNA.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "nucleosit hai vòng" chỉ nucleosit biến đổi gồm gốc đường hai vòng. Các ví dụ về nucleosit hai vòng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nucleosit gồm có cầu giữa nguyên tử vòng 4' và 2' ribosyl. Theo một số phương

án, hợp chất được đề xuất trong bản mô tả bao gồm một hoặc nhiều nucleosit hai vòng, trong đó cầu nối bao gồm 4' đến 2' nucleosit hai vòng. Các ví dụ về 4' đến 2' nucleosit hai vòng, gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một trong các công thức: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' và 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2*, và chất tương tự của chúng (xem, Patent Mỹ 7,399,845, cấp ngày 15/7/2008); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2', và chất tương tự của chúng (xem, WO 2009/006478, công bố ngày 8/1/2009); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2', và chất tương tự của chúng (xem, WO 2008/150729, công bố ngày 11/12/2008); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (xem, đơn sáng chế Mỹ được công bố số US2004/0171570, công bố ngày 2/9/2004); 4'-CH₂-N(R)-O-2', trong đó R là H, C₁-C₁₀ alkyl, hoặc nhóm bảo vệ (xem, Patent Mỹ 7,427,672, cấp ngày 23/9/2008); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (xem, Chattopadhyaya, et al, J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); và 4'-CH₂-C(=CH₂)-2', và chất tương tự của chúng (xem, WO 2008/154401, công bố ngày 8/12/2008). Xem thêm, ví dụ: Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 129(26) 8362-8379 (Jul. 4, 2007); Elayadi et al., Curr. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol, 2001, 8, 1-7; Oram et al, Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; Patent Mỹ số U.S. 6,670,461, 7,053,207, 6,268,490, 6,770,748, 6,794,499, 7,034,133, 6,525,191, 7,399,845; WO 2004/106356, WO 94/14226, WO 2005/021570, và WO 2007/134181; Công bố U.S. số US2004/0171570, US2007/0287831, và US2008/0039618; và loạt Patent Mỹ số 12/129,154, 60/989,574, 61/026,995, 61/026,998, 61/056,564, 61/086,231, 61/097,787, và 61/099,844; và PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154, và PCT/US2008/068922. Mỗi trong các nucleosit hai vòng nói trên có thể được điều chế có một hoặc nhiều cấu trúc đường hóa học lập thể bao gồm ví dụ α-L-ribofuranosa và β-D-ribofuranosa (xem DK98/00393, công bố ngày 25/3/1999 là WO 99/14226).

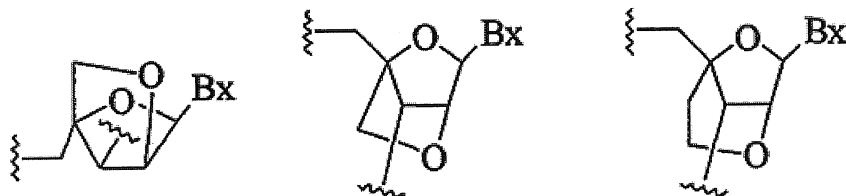
Theo một số phương án, gốc đường hai vòng của các nucleosit LNA gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hợp chất có ít nhất một cầu nối giữa vị trí 4' và 2' của gốc đường pentofuranosyl, trong đó cầu nối này độc lập gồm 1 hoặc từ 2 đến 4 nhóm được liên kết được chọn độc lập từ - [C(R_a)X(R_b)], -, -C(R_a)=C(R_b)-, -C(R_a)=N-, -C(=N(R_a))-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)₂-, -S(=O)_x-, và -N(R_a)-; trong đó: x là 0, 1, hoặc 2; n là 1, 2, 3,

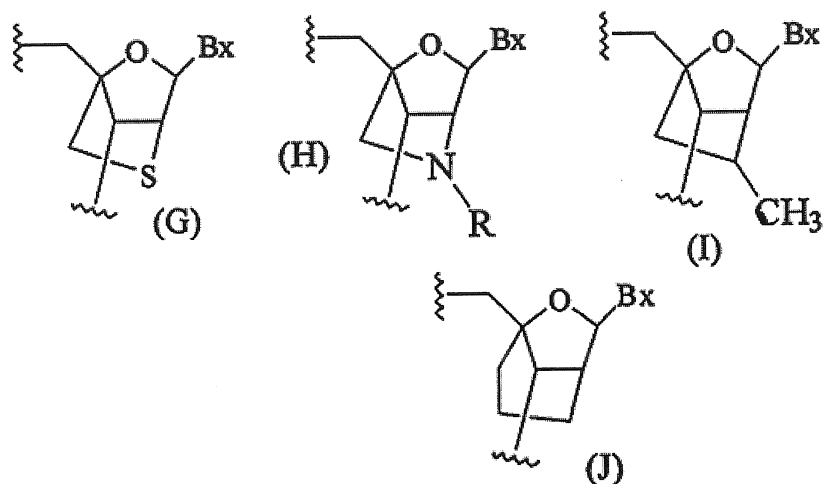
hoặc 4; mỗi R_a và R_b độc lập là H, nhóm bảo vệ, hydroxyl, C_1 - C_{12} alkyl, C_1 - C_{12} alkyl được thế, C_2 - C_{12} alkenyl, C_2 - C_{12} alkenyl được thế, C_2 - C_{12} alkynyl, C_2 - C_{12} alkynyl được thế, C_5 - C_{20} aryl, C_5 - C_{20} aryl được thế, gốc dị vòng, gốc dị vòng được thế, heteroaryl, heteroaryl được thế, gốc C_5 - C_7 alixyclic, gốc C_5 - C_7 alixyclic được thế, halogen, OJ_1 , NJ_1J_2 , SJ_1 , N_3 , $COOJ_1$, axyl ($C(=O)$ -H), axyl được thế, CN, sulfonyl ($S(=O)_2$ - J_1), hoặc sulfoxyl ($S(=O)$ - J_1); và mỗi J_1 và J_2 độc lập là H, C_1 - C_6 alkyl, C_1 - C_{12} alkyl được thế, C_2 - C_{12} alkenyl, C_2 - C_{12} alkenyl được thế, C_2 - C_{12} alkynyl, C_2 - C_{12} alkynyl được thế, C_5 - C_{20} aryl, C_5 - C_{20} aryl được thế, axyl ($C(=O)$ -H), axyl được thế, gốc dị vòng, gốc dị vòng được thế, C_1 - C_{12} aminoalkyl, C_1 - C_{12} aminoalkyl được thế, hoặc nhóm bảo vệ.

Theo một số phương án, cầu nối của gốc đường hai vòng là $-[C(R_a)(R_b)]_n-$, $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$, $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ hoặc $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$. Theo một số phương án, cầu nối là $4'-CH_2-2'$, $4'-(CH_2)_2-2'$, $4'-(CH_2)_3-2'$, $4'-CH_2-O-2'$, $4'-(CH_2)_2-O-2'$, $4'-CH_2-O-N(R)-2'$, và $4'-CH_2-N(R)-O-2'$, trong đó mỗi R độc lập là H, nhóm bảo vệ, hoặc C_1 - C_{12} alkyl.

Theo một số phương án, nucleosit hai vòng được xác định thêm bằng cấu hình đồng phân. Ví dụ, nucleosit gồm cầu $4'-2'$ metylen-oxy, có thể ở cấu hình L hoặc ở cấu hình beta - D. Trước đây, a-L-metylenoxy ($4'-CH_2-O-2'$) BNA đã được kết hợp vào oligonucleotit đối nghĩa thể hiện hoạt tính đối nghĩa (Frieden et al, Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365- 6372).

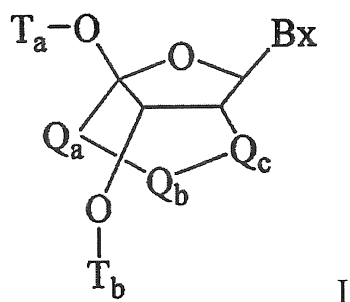
Theo một số phương án, nucleosit hai vòng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (A) a-L-Metylenoxy ($4'-CH_2-O-2'$) BNA, (B) beta -D-Metylenoxy ($4'-CH_2-O-2'$) BNA, (C) Etyleneoxy ($4'-(CH_2)_2-O-2'$) BNA, (D) Aminooxy ($4'-CH_2-O-N(R)-2'$) BNA, (E) Oxyamino ($4'-CH_2-N(R)-O-2'$) BNA, (F), Metyl(metylenoxy) ($4'-CH(CH_3)-O-2'$) BNA, (G) metylen-thio ($4'-CH_2-S-2'$) BNA, (H) metylen-amino ($4'-CH_2-N(R)-2'$) BNA, (I) metyl carboxylic ($4'-CH_2-CH(CH_3)-2'$) BNA, và (J) propylen carboxylic ($4'-(CH_2)_3-2'$) BNA như được nêu ở dưới đây.





trong đó Bx là gốc bazơ và R độc lập là H, nhóm bảo vệ hoặc C₁-C₂ alkyl.

Theo một số phương án, nucleosit hai vòng được xác định bằng công thức I:



trong đó:

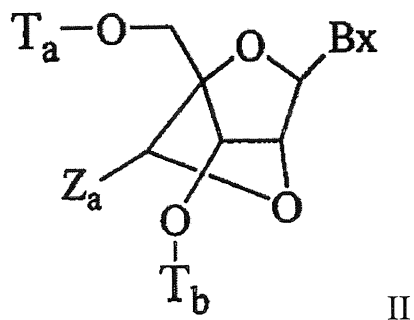
Bx là gốc bazơ dị vòng;

-Q_a-Q_b-Q_c- là -CH₂-N(R_c)-CH₂-, -C(=O)-N(R_c)-CH₂-, -CH₂-O-N(R_c)-, -CH₂-N(R_c)-O-, hoặc -N(R_c)-O-CH₂;

R_c là C₁-C₁₂ alkyl hoặc nhóm bảo vệ amin; và

Mỗi T_a và T_b độc lập là H, nhóm bảo vệ hydroxyl, nhóm liên hợp, nhóm phospho phản ứng, gốc phospho, hoặc liên kết cộng hóa trị với môi trường hỗ trợ.

Theo một số phương án, nucleosit hai vòng được xác định bằng công thức II:



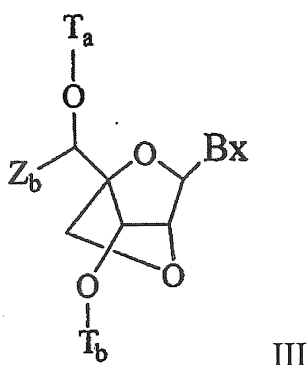
trong đó:

Bx là gốc bazơ dị vòng;

mỗi T_a và T_b độc lập là H, nhóm bảo vệ hydroxyl, nhóm liên hợp, nhóm phospho phản ứng, gốc phospho, hoặc liên kết cộng hóa trị với môi trường hỗ trợ; Z_a là C_1 - C_6 alkyl, C_2 - C_6 alkenyl, C_2 - C_6 alkynyl, C_1 - C_6 alkyl được thế, C_2 - C_6 alkenyl được thế, C_2 - C_6 alkynyl được thế, axyl, axyl được thế, amit được thế, thiol, hoặc thio được thế.

Theo một số phương án, mỗi trong số các nhóm được thế độc lập được thế một lần hoặc nhiều lần bằng các nhóm thế được chọn độc lập từ halogen, oxo, hydroxyl, OJ_c , NJ_d , SJ_c , N_3 , $OC(=X)J_c$, và $NJ_eC(=X)NJ_cJ_d$, trong đó mỗi J_c , J_d , và J_e độc lập là H, C_1 - C_6 alkyl, hoặc C_1 - C_6 alkyl được thế và X là O hoặc NJ_c .

Theo một số phương án, nucleosit hai vòng được xác định bằng công thức III:



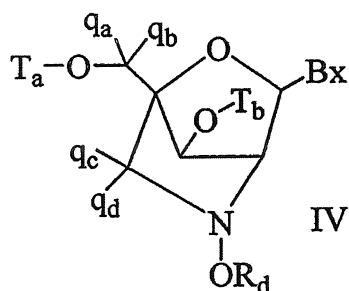
trong đó:

Bx là gốc bazơ dị vòng;

mỗi T_a và T_b độc lập là H, nhóm bảo vệ hydroxyl, nhóm liên hợp, nhóm phospho phản ứng, gốc phospho, hoặc liên kết cộng hóa trị với môi trường hỗ trợ;

R_d là C_1 - C_6 alkyl, C_2 - C_6 alkenyl, C_2 - C_6 alkynyl, C_1 - C_6 alkyl được thế, C_2 - C_6 alkenyl được thế, C_2 - C_6 alkynyl được thế, hoặc axyl ($C(=O)-$) được thế.

Theo một số phương án, nucleosit hai vòng được xác định bằng công thức IV:



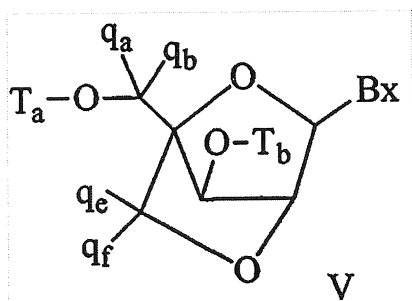
trong đó:

Bx là gốc bazơ dị vòng;

mỗi T_a và T_b độc lập là H, nhóm bảo vệ hydroxyl, nhóm liên hợp, nhóm phospho phản ứng, gốc phospho, hoặc liên kết cộng hóa trị với môi trường hỗ trợ;

R_d là C_1 - C_6 alkyl, C_1 - C_6 alkyl được thế, C_2 - C_6 alkenyl, C_2 - C_6 alkenyl được thế, C_2 - C_6 alkynyl, C_2 - C_6 alkynyl được thế; mỗi q_b , q_c và q_d độc lập là H, halogen, C_1 - C_6 alkyl, C_1 - C_6 alkyl được thế, C_2 - C_6 alkenyl, C_2 - C_6 alkenyl được thế, C_2 - C_6 alkynyl, hoặc C_2 - C_6 alkynyl được thế, C_1 - C_6 alkoxy, Q - C_6 alkoxy được thế, axyl, axyl được thế, C_1 - C_6 aminoalkyl, hoặc C_1 - C_6 aminoalkyl được thế;

Theo một số phương án, nucleosit hai vòng được xác định bằng công thức V:



trong đó:

Bx là gốc bazơ dị vòng;

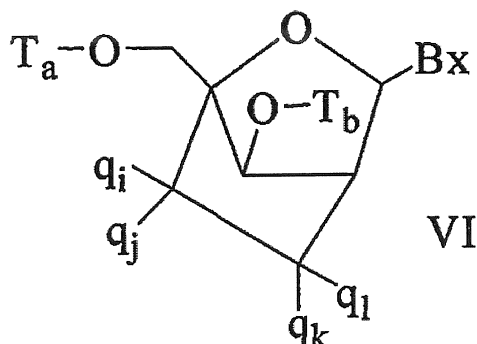
mỗi T_a và T_b độc lập là H, nhóm bảo vệ hydroxyl, nhóm liên hợp, nhóm phospho phản ứng, gốc phospho, hoặc liên kết cộng hóa trị với môi trường hỗ trợ; mỗi q_a , q_b , q_c và q_d độc lập là hydro, halogen, C_1 - C_{12} alkyl, C_1 - C_{12} alkyl được thế, C_2 - C_{12} alkenyl, C_2 - C_{12} alkenyl được thế, C_2 - C_{12} alkynyl, C_2 - C_{12} alkynyl được thế, C_1 - C_{12} alkoxy, C_1 - C_{12} alkoxy được thế, OJ_j , SJ_j , SOJ_j , SO_2J_j , NJ_jJ_k , N_3 , CN , $C(=O)OJ_j$, $C(=O)NJ_jJ_k$, $C(=O)J_j$, $O-C(=O)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$, $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ hoặc $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$; hoặc q_e và q_f cùng là $=C(q_g)(q_h)$; mỗi q_g và q_h độc lập là H, halogen, C_1 - C_{12} alkyl, hoặc C_1 - C_{12} alkyl được thế.

Việc tổng hợp và điều chế các metylenoxy (4'- CH_2 -O-2') BNA monome adenin, xytosin, guanin, 5-metyl-xytosin, thymin, và uraxil, cùng với việc oligome hóa chúng, và các đặc điểm nhận biết axit nucleic đã được mô tả (xem, ví dụ, Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). Các BNA và quy trình điều chế chúng cũng được mô tả trong WO 98/39352 và WO 99/14226.

Chất tương tự của metylenoxy (4'- CH_2 -O-2') BNA, metylenoxy (4'- CH_2 -O-2') BNA, và 2'-thio- BNA, cũng đã được điều chế {xem, ví dụ, Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222}. Quy trình điều chế thể tương đồng nucleosit bị khóa bao gồm các cặp đôi oligodeoxyribonucleotit làm cơ chất cho các polymeraza axit nucleic cũng đã được mô tả (xem, ví dụ, Wengel et al., WO 99/14226). Hơn nữa, việc tổng hợp 2'-amino-BNA, chất tương tự oligonucleotit ái lực cao bị giới hạn ở hình dạng,

đã được mô tả trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Ngoài ra, 2'- amino- và 2'-metylamino-BNA đã được điều chế và tính ổn định nhiệt của các cặp đôi này với chuỗi ARN và ADN bổ trợ đã được báo cáo trước đó.

Theo một số phương án, nucleosit hai vòng được xác định bằng công thức VI:



trong đó:

Bx là gốc bazơ dị vòng;

mỗi Ta và Tb độc lập là H, nhóm bảo vệ hydroxyl, nhóm liên hợp, nhóm phospho phản ứng, gốc phospho, hoặc liên kết cộng hóa trị với môi trường hỗ trợ; mỗi qj, qj, qk và ql độc lập là H, halogen, C₁-C₁₂ alkyl, C₁-C₁₂ alkyl được thế, C₂-C₁₂ alkenyl, C₂-C₁₂ alkenyl được thế, C₂-C₁₂ alkynyl, C₂-C₁₂ alkynyl được thế, C₁-C₁₂ alkoxy, C₂-C₁₂ alkoxy được thế, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, O-C(=O)NJ_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)NJ_jJ_k, hoặc (H)C(=S)NJ_jJ_k; và qi và qj hoặc qi và qk cùng là =C(q_g)(q_h), trong đó mỗi q_g và q_h độc lập là H, halogen, C₁-C₁₂ alkyl, hoặc C₁-C₆ alkyl được thế.

Một nucleosit hai vòng vòng cacbon có cầu 4'-(CH₂)₃-2' và chất tương tự alkenyl, cầu 4'-CH=CH-CH₂-2', đã được mô tả (xem, ví dụ, Freier et al, Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429- 4443 và Alback et al, J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-77 '40). Việc tổng hợp và điều chế nucleosit hai vòng vòng cacbon cùng với việc oligome hóa và các nghiên cứu hóa sinh của chúng cũng đã được mô tả (xem, ví dụ, Srivastava et al, J. Am. Chem. Soc. 2007, 129(26), 8362-8379).

Như được sử dụng trong bản mô tả, "4'-2' nucleosit hai vòng" hoặc "4' đến 2' nucleosit hai vòng" chỉ nucleosit hai vòng gồm vòng furanoza chứa cầu nối nguyên tử cacbon 2' với nguyên tử cacbon 4'.

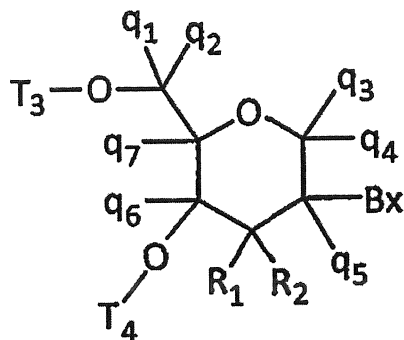
Như được sử dụng trong bản mô tả, "nucleosit dạng vòng đơn" chỉ nucleosit bao gồm gốc đường đã biến đổi không phải là gốc đường hai vòng. Theo một số phương án,

gốc đường, hoặc chất tương tự gốc đường, của nucleosit có thể được biến đổi hoặc được thế ở vị trí bất kỳ.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "đường được biến đổi 2'" nghĩa là đường furanosyl được biến đổi ở vị trí 2'. Theo một số phương án, các biến đổi này bao gồm phần tử thế được chọn từ: halogenua, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alkoxy được thế và không được thế, thioalkyl được thế và không được thế, amino alkyl được thế và không được thế, alkyl được thế và không được thế, alyl được thế và không được thế, và alkynyl được thế và không được thế. Theo một số phương án, biến đổi 2' được chọn từ các nhóm thế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$, và $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, trong đó n và m là từ 1 đến khoảng 10. Nhóm thế 2' khác cũng có thể được chọn từ: C_1 - C_{12} alkyl; alkyl được thế; alkenyl; alkynyl; alkaryl; aralkyl; O-alkaryl hoặc O-aralkyl; SH; SCH₃; OCN; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heteroxycloalkyl; heteroxycloalkaryl; aminoalkylamino; polyalkylamino; silyl được thế; R; nhóm rời chuyển; nhóm chỉ thị; nhóm xen vào; nhóm để cải thiện các tính chất dược động học; và nhóm để cải thiện các tính chất dược động học của các hợp chất đối nghĩa, và các phần tử thế khác có các tính chất tương tự. Theo một số phương án, nucleosit biến đổi bao gồm mạch bên 2'-MOE {xem, ví dụ, Baker et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 1 1944-12000}. Việc thế 2'-MOE đã được mô tả là có ái lực liên kết được cải thiện so với nucleosit không biến đổi và so với các nucleosit biến đổi khác, như 2'- O- metyl, O-propyl, và O-aminopropyl. Oligonucleotit có phần tử thế 2'-MOE cũng đã được chỉ ra là chất ức chế đối nghĩa sự biểu hiện gen với các đặc tính triển vọng để sử dụng in vivo {xem, ví dụ, Martin, P., He/v. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann et al., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; và Altmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926}.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "tetrahydropyran nucleosit được biến đổi" hoặc "THP nucleosit được biến đổi" nghĩa là nucleosit có "đường" tetrahydropyran sáu cạnh được thế cho gốc pentofuranosyl ở các nucleosit thông thường (đường thay thế). THP nucleosit được biến đổi bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, những loại được nêu trong lĩnh vực này là hexitol axit nucleic (HNA), anitol axit nucleic (ANA), manitol axit nucleic (MNA) {xem Leumann, CJ. Bioorg. và Med. Chem. (2002) 10:841-854}, flo HNA (F-HNA), hoặc hợp chất này được xác định bằng công thức X:

Công thức



X trong đó độc lập với mỗi trong chúng ít nhất một thể tương đồng tetrahydropyran nucleosit có công thức X:

Bx là gốc bazơ dị vòng;

mỗi T₃ và T₄ độc lập là nhóm liên kết giữa nucleosit liên kết thể tương đồng tương tự tetrahydropyran nucleosit với hợp chất đối nghĩa hoặc một trong số T₃ và T₄ là nhóm liên kết giữa các nucleosit liên kết thể tương đồng tetrahydropyran nucleosit với hợp chất đối nghĩa và T₃ và T₄ khác là H, nhóm bảo vệ hydroxyl, nhóm liên hợp được liên kết, hoặc nhóm đầu tận 5' hoặc 3'; mỗi q₁ q₂ q₃ q₄ q₅, q₆ và q₇ độc lập là H, C₁-C₆ alkyl, C₁-C₆ alkyl được thế, C₂-C₆ alkenyl, C₂-C₆ alkenyl được thế, C₂-C₆ alkynyl, hoặc C₂-C₆ alkynyl được thế; và một trong số R₁ và R₂ là hydro và nhóm còn lại được chọn từ halogen, alkoxy được thế hoặc không được thế, NJ, J₂, SJ, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X) NJ₁J₂, và CN, trong đó X là O, S, hoặc NJ₁ và mỗi J₁, J₂, và J₃ độc lập là H hoặc C₁-C₆ alkyl.

Theo một số phương án, THP nucleosit được biến đổi có công thức X được đề xuất trong đó mỗi q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t, và q_u là H. Theo một số phương án, ít nhất một trong số q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t và q_u không phải là H. Theo một số phương án, ít nhất một trong số q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t và q_u là metyl. Theo một số phương án, THP nucleosit có công thức X được đề xuất trong đó một trong số R₁ và R₂ là F. Theo một số phương án, R₁ là flo và R₂ là H, R₁ là metoxy và R₂ là H, và R₁ là metoxyetoxy và R₂ là H.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "được biến đổi ở vị trí 2'" hoặc "được thế ở vị trí 2'" chỉ nucleosit chứa đường gồm phần tử thế ở vị trí 2' khác ngoài H hoặc OH. 2'-nucleosit biến đổi, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nucleosit có phần tử thế ở vị trí 2' không bắt cầu, như alyl, amino, azido, thio, O-allyl, O-C₁-C₁₀ alkyl, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O- N(R_m)(R_n), hoặc O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), trong đó mỗi R_m và R_n độc lập là H hoặc C₁-C₁₀ alkyl được thế hoặc không

được thế. Nucleosit được biến đổi ở vị trí 2' còn có thể chứa các biến đổi khác, ví dụ, ở vị trí khác của đường và/hoặc ở nucleobaza.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "2'-F" chỉ đường chứa nhóm flo ở vị trí 2'.

Như được sử dụng trong bản mô tả, mỗi "2'-OMe" hoặc "2'-OCH₃" hoặc "2'-O-methyl" chỉ nucleosit chứa đường gồm nhóm -OCH₃ ở vị trí 2' của vòng đường.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "oligonucleotit" chỉ hợp chất chứa nhiều nucleosit được liên kết.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều nucleosit được biến đổi. Theo một số phương án, oligonucleotit bao gồm một hoặc nhiều ribonucleosit (RNA) và/hoặc deoxyribonucleosit (ADN).

Nhiều vòng thay thế đường hai vòng và ba vòng khác được biết là trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để biến đổi nucleosit để kết hợp vào hợp chất đối nghĩa {xem, ví dụ, xem bài báo: Leumann, J. C, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854}. Hệ vòng này có thể trải qua một số lần thế bổ sung để tăng cường hoạt tính. Phương pháp điều chế đường biến đổi đã được biết rõ bởi các chuyên gia trong lĩnh vực này. Trong nucleotit có gốc đường đã biến đổi, phần nucleobazơ (tự nhiên, biến đổi hoặc kết hợp của chúng) được duy trì để lại với đích axit nucleic thích hợp.

Theo một số phương án, hợp chất đối nghĩa chứa một hoặc nhiều nucleotit có gốc đường đã biến đổi. Theo một số phương án, gốc đường biến đổi là 2'-MOE. Theo một số phương án, nucleotit biến đổi 2'-MOE được sắp xếp môtip Gapme. Theo một số phương án, gốc đường biến đổi là cEt. Theo một số phương án, nucleotit được biến đổi cEt được sắp xếp thông qua các cánh của môtip Gapme.

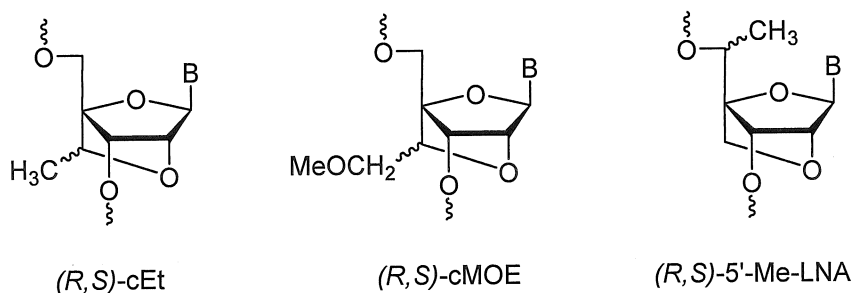
Theo một số phương án, trong LNA, R^{4*} và R^{2*} cùng chỉ lưỡng gốc -O-CH(CH₂OCH₃)- (2'-O-metoxylet axit nucleic hai vòng - Seth at al., 2010, J. Org. Chem) - ở cấu hình R- hoặc S-.

Theo một số phương án, trong LNA, R^{4*} và R^{2*} cùng chỉ lưỡng gốc -O-CH(CH₂CH₃)- (2'-O-etyl axit nucleic hai vòng - Seth at al., 2010, J. Org. Chem). - ở cấu hình R- hoặc S-.

Theo một số phương án, trong LNA, R^{4*} và R^{2*} cùng chỉ lưỡng gốc -O-CH(CH₃)-. - ở cấu hình R- hoặc S-. Theo một số phương án, R^{4*} và R^{2*} cùng chỉ lưỡng gốc -O-CH₂-O-CH₂- - (Seth at al., 2010, J. Org. Chem).

Theo một số phương án, trong LNA, R^{4*} và R^{2*} cùng chỉ lưỡng gốc $-O-NR-CH_3-$ - (Seth et al., 2010, J. Org. Chem).

Theo một số phương án, đơn vị LNA có cấu trúc được chọn từ các nhóm sau:



Việc kết hợp thể tương đồng nucleotit tăng cường ái lực trong oligome, như LNA hoặc đường được thể ở vị trí 2', có thể cho phép giảm kích thước của oligome liên kết đặc hiệu, và cũng có thể giảm giới hạn trên xuống kích thước của oligome trước khi xảy ra liên kết không đặc hiệu hoặc liên kết bất thường.

Các tác giả đã đánh giá tính gây độc thận của hợp chất cET (sử dụng (S)-cET, với trình tự (Hợp chất ID 6/411847 của WO 2009/12495 và hợp chất beta-D-oxy LNA so sánh (6/392063 của WO 2009/12495) và phát hiện ra rằng hợp chất cET gợi ra tính gây độc thận cao một cách ngạc nhiên so với đối chứng beta-D-oxy LNA. Nghiên cứu là nghiên cứu liều đơn, giết chết sau 3 ngày (xem EP1984381 ví dụ 41 về phương pháp, mặc dù các tác giả sáng chế sử dụng chuột NMRI). Tính gây độc thận được xác nhận bằng phân tích mô học. Dấu hiệu đáng chú ý của tính gây độc thận mà các tác giả sáng chế đã thấy ở liều của hợp chất cET thấp hơn liều của ALT huyết thanh được lưu ý, chỉ ra rằng hợp chất cET, tính gây độc thận có thể là vấn đề cụ thể. Việc sử dụng thể liên hợp theo sáng chế, như thể liên hợp GalNAc ba hóa trị do đó là hữu dụng cao trong việc làm giảm tính gây độc thận của hợp chất LNA, như hợp chất cET.

Theo một số phương án, oligome bao gồm ít nhất 1 thể tương đồng nucleosit. Theo một số phương án, oligome bao gồm ít nhất 2 thể tương đồng nucleotit. Theo một số phương án, oligome bao gồm từ 3-8 thể tương đồng nucleotit, ví dụ, 6 hoặc 7 thể tương đồng nucleotit. Theo phương án được ưu tiên nhất, ít nhất một trong các thể tương đồng nucleotit này là axit nucleic bị khóa (locked nucleic acid, LNA); ví dụ ít nhất 3 hoặc ít nhất 4, hoặc ít nhất 5, hoặc ít nhất 6, hoặc ít nhất 7, hoặc ít nhất 8 thể tương đồng nucleotit có thể là LNA. Theo một số phương án, tất cả các thể tương đồng nucleotit có thể là LNA.

Được công nhận rằng khi nói môtip trình tự nucleotit được ưu tiên hoặc trình tự nucleotit, chứa chỉ nucleotit, oligome theo sáng chế được xác định bằng trình tự có thể

chứa thể tương đồng nucleotit tương ứng thay cho một hoặc nhiều nucleotit có trong trình tự này, như đơn vị LNA hoặc thể tương đồng nucleotit khác, làm tăng tính ổn định kép/ T_m của cặp oligome/đích (tức là thể tương đồng nucleotit tăng cường ái lực).

Thể tương đồng nucleotit được ưu tiên là LNA, như oxy-LNA (như beta-D-oxy-LNA, và alpha-L-oxy-LNA), và/hoặc amino-LNA (như beta-D-amino-LNA và alpha-L-amino-LNA) và/hoặc thio-LNA (như beta-D-thio-LNA và alpha-L-thio-LNA) và/hoặc ENA (như beta-D-ENA và alpha-L-ENA).

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế, như vùng A, có thể chứa đơn vị LNA và thể tương đồng nucleotit khác. Thể tương đồng nucleotit khác có trong oligome theo sáng chế được chọn độc lập từ, ví dụ: đơn vị 2'-O-alkyl-ARN, đơn vị 2'-amino-ADN, 2'-flo-ADN, đơn vị LNA, đơn vị axit arabino nucleic (ANA), đơn vị 2'-flo-ANA, đơn vị HNA, đơn vị INA (axit nucleic xen vào -Christensen, 2002. Nucl. Acids. Res. 2002 30: 4918-4925, được kết hợp ở đây để tham khảo) và đơn vị 2'MOE. Theo một số phương án, chỉ một trong các loại nêu trên của thể tương đồng nucleotit có trong oligome theo sáng chế, như vùng thứ nhất, hoặc trình tự nucleotit liền kề của nó.

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế (vùng A) do đó có thể bao gồm ít nhất một đơn vị axit nucleic bị khóa (LNA), như 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 đơn vị LNA, như từ 3 – 7 hoặc 4 đến 8 đơn vị LNA, hoặc 3, 4, 5, 6 hoặc 7 đơn vị LNA. Theo một số phương án, tất cả các thể tương đồng nucleotit là LNA. Theo một số phương án, oligome có thể bao gồm cả beta-D-oxy-LNA, và một hoặc nhiều đơn vị LNA sau: thio-LNA, amino-LNA, oxy-LNA, và/hoặc ENA ở cả cấu trúc beta-D hoặc alpha-L hoặc các kết hợp của chúng. Theo một số phương án tất cả LNA, các đơn vị xytosin là 5'methyl-xytosin. Theo một số phương án của sáng chế, oligome (như vùng thứ nhất và vùng thứ hai tùy ý) có thể chứa cả đơn vị LNA và ADN. Theo một số phương án, tổng các kết hợp của các đơn vị LNA và ADN là 10-25, như 10 – 24, tốt hơn nếu là 10-20, như 10 – 18, như 12-16. Theo một số phương án của sáng chế, trình tự nucleotit của oligome, của vùng thứ nhất của chúng, như trình tự nucleotit liền kề chứa ít nhất một LNA và đơn vị nucleotit còn lại là đơn vị ADN. Theo một số phương án oligome, hoặc vùng thứ nhất của chúng, bao gồm chỉ LNA, thể tương đồng nucleotit và nucleotit có trong tự nhiên (như ARN hoặc ADN, tốt nhất là ADN nucleotit), tùy ý với liên kết giữa các nucleotit được biến đổi như phosphothioat.

Bổ sung thêm RNaza

Được thấy rằng hợp chất oligome có thể có chức năng thông qua sự phân rã ARN thông tin đích được điều biến bởi thành phần không phải RNaza, chẳng hạn như trở ngại về không gian của việc dịch mã, hoặc các phương pháp khác. Theo một số phương án, oligome theo sáng chế có khả năng bổ sung thêm endoribonucleaza (RNaza), như RNaza H.

Ưu tiên là oligome này, như vùng A, hoặc trình tự nucleotit liên kề, bao gồm vùng gồm ít nhất 4, như ít nhất 5, như ít nhất 6, như ít nhất 7 đơn vị nucleotit liên tiếp, như ít nhất 8 hoặc ít nhất 9 đơn vị nucleotit liên tiếp (gốc), bao gồm 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 hoặc 16 nucleotit liên tiếp, chúng, khi được tạo thành trong một phức kếp với ARN đích hỗ trợ có khả năng bổ sung thêm RNaza (như đơn vị ADN). Trình tự liên kề có khả năng bổ sung thêm RNAza có thể là vùng Y' như được chỉ ra ở trong trường hợp của Gapme được mô tả ở đây. Theo một số phương án, kích thước của trình tự liên kề có khả năng bổ sung thêm RNAza, như vùng Y', có thể là lớn hơn, như 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 đơn vị nucleotit.

EP 1 222 309 đề xuất phương pháp in vitro để xác định hoạt tính RNazaH, có thể được sử dụng để xác định khả năng bổ sung thêm RNazaH. Oligome được cho là có khả năng bổ sung thêm RNAza H nếu, khi được cung cấp đích ARN hỗ trợ, nó có tỷ lệ bắt đầu, khi được đo ở pmol/l/phút, ít nhất 1%, như ít nhất 5%, như ít nhất 10% hoặc, nhiều hơn 20% tỷ lệ ban đầu được xác định bằng cách sử dụng ADN chỉ oligonucleotit, có cùng trình tự bazơ nhưng chỉ chứa ADN monome, không thể ở vị trí 2', có nhóm liên kết phosphothioat giữa tất cả các monome trong oligonucleotit, sử dụng phương pháp được nêu trong ví dụ 91 - 95 của EP 1 222 309.

Theo một số phương án, oligome dường như được coi là cơ bản không có khả năng bổ sung thêm RNAzaH nếu, khi được cung cấp đích ARN hỗ trợ, và RNazaH, tỷ lệ ban đầu của RNazaH, được đo ở pmol/l/phút, nhỏ hơn 1%, như nhỏ hơn 5%, như nhỏ hơn 10% hoặc nhỏ hơn 20% tỷ lệ ban đầu được xác định bằng cách sử dụng ADN tương đương chỉ oligonucleotit, không được thể ở vị trí 2', có nhóm liên kết phosphothioat giữa tất cả các nucleotit trong oligonucleotit, sử dụng phương pháp được nêu trong ví dụ 91 - 95 của EP 1 222 309.

Theo các phương án khác, oligome được coi là có khả năng bổ sung thêm RNAzaH nếu, khi được cung cấp đích ARN hỗ trợ, và RNazaH, tỷ lệ ban đầu RNazaH, khi được

đo ở pmol/l/phút, là ít nhất 20%, như ít nhất 40%, như ít nhất 60%, như ít nhất 80% tỷ lệ ban đầu được xác định bằng cách sử dụng ADN tương đương chỉ oligonucleotit, không được thể ở vị trí 2', có nhóm liên kết phosphothioat giữa tất cả các nucleotit trong oligonucleotit, sử dụng phương pháp được nêu trong ví dụ 91 - 95 của EP 1 222 309.

Thông thường vùng của oligome tạo thành đơn vị nucleotit liên tiếp, khi tạo thành trong cặp đôi với ARN đích bổ sung là có khả năng bổ sung thêm RNAza chứa đơn vị nucleotit tạo thành ADN/ARN giống cặp đôi với đích ARN. Oligome theo sáng chế, như vùng thứ nhất, có thể chứa trình tự nucleotit bao gồm cả hai nucleotit và thể tương đồng nucleotit, và có thể là ví dụ, ở dạng Gapme.

Thiết kế Gapme

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế, như vùng thứ nhất, bao gồm hoặc là Gapme. Gapme oligome là oligome chứa đoạn kéo dài liên tiếp của các nucleotit có khả năng bổ sung thêm RNAza, như RNazaH, như vùng có ít nhất 6 hoặc 7 ADN nucleotit, ở đây được gọi là vùng Y' (Y'), trong đó vùng Y' đi vòng qua sườn cả hai đầu 5' và 3' bởi vùng của thể tương đồng nucleotit tăng cường ái lực, như từ 1 – 6 thể tương đồng nucleotit đầu 5' và 3' đến nucleotit kéo dài liên tiếp có khả năng bổ sung thêm RNAza – các vùng này được gọi là lần lượt là vùng X' (X') và Z' (Z'). Vùng X' và Z' cũng có thể được gọi là cánh của Gapme. Các ví dụ về Gapme được bộc lộ trong WO 2004/046160, WO 2008/113832, và WO 2007/146511.

Theo một số phương án, monome có khả năng bổ sung thêm RNAza được chọn từ nhóm bao gồm monome ADN, monome alpha-L-LNA, monome ADN được alkyl hóa ở đầu C4' (xem PCT/EP2009/050349 và Vester et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 2296 – 2300, được kết hợp ở đây để tham khảo) và UNA (axit nucleic không liên kết) nucleotit (xem Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039). UNA là axit nucleic không bị khóa, điển hình trong đó liên kết C2 – C3 C-C của riboza đã được loại bỏ, tạo thành gốc “đường” không bị khóa. Tốt hơn nếu Gapme bao gồm trình tự (poly)nucleotit có công thức (5' đến 3'), X'-Y'-Z', trong đó; vùng X' (X') (vùng 5') gồm hoặc bao gồm ít nhất một thể tương đồng nucleotit, như ít nhất một đơn vị LNA, như từ 1-6 thể tương đồng nucleotit, như đơn vị LNA, và; vùng Y' (Y') gồm hoặc bao gồm ít nhất bốn hoặc ít nhất năm nucleotit liên tiếp có khả năng bổ sung thêm RNAza (khi tạo thành phức hai với phân tử ARN bổ trợ, như ARN thông tin đích), như ADN nucleotit, và; vùng Z' (Z')

(vùng 3') gồm hoặc bao gồm ít nhất một thể tương đồng nucleotit, như ít nhất một đơn vị LNA, như từ 1-6 thể tương đồng nucleotit, như đơn vị LNA.

Theo một số phương án, vùng X' bao gồm 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 thể tương đồng nucleotit, như đơn vị LNA, như từ 2-5 thể tương đồng nucleotit, như 2-5 đơn vị LNA, như 3 hoặc 4 thể tương đồng nucleotit, như 3 hoặc 4 đơn vị LNA; và/hoặc như vùng Z bao gồm 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 thể tương đồng nucleotit. Đơn vị LNA, như từ 2-5 thể tương đồng nucleotit, như 2-5 đơn vị LNA, như 3 hoặc 4 thể tương đồng nucleotit, như 3 hoặc 4 đơn vị LNA.

Theo một số phương án, Y' gồm hoặc bao gồm 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 hoặc 12 nucleotit liên tiếp có khả năng bổ sung thêm RNAza, hoặc từ 4-12 hoặc từ 6-10, hoặc từ 7-9, như 8 nucleotit liên tiếp có khả năng bổ sung thêm RNAza. Theo một số phương án vùng Y' gồm hoặc bao gồm ít nhất một đơn vị ADN nucleotit, như 1-12 đơn vị ADN, tốt hơn là từ 4-12 ADN đơn vị, tốt hơn nữa là từ 6-10 đơn vị ADN, như từ 7-10 đơn vị ADN, tốt nhất là 8, 9 hoặc 10 đơn vị ADN.

Theo một số phương án vùng X' bao gồm 3 hoặc 4 thể tương đồng nucleotit, như LNA, vùng X' gồm có 7, 8, 9 hoặc 10 đơn vị ADN, và vùng Z' gồm có 3 hoặc 4 thể tương đồng nucleotit, như LNA. Thiết kế này gồm (X'-Y'-Z') 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 3-7-3, 3-7-4, 4-7-3. Theo một phương án được ưu tiên, Gapme là 3-9-4 Gapme, thậm chí ưu tiên hơn là 3-10-3 Gapme.

Thiết kế Gapme khác được bộc lộ trong WO 2004/046160. WO 2008/113832, đơn này xin hưởng quyền ưu tiên từ đơn patent Mỹ số 60/977,409, gọi là oligome gapme đoạn ngắn (shortme). Theo một số phương án, oligome có mặt ở đây có thể là Gapme đoạn ngắn này.

Theo một số phương án, oligome, ví dụ, vùng X', gồm có trình tự nucleotit liên kế có 10, 11, 12, 13 hoặc 14 đơn vị nucleotit, trong đó trình tự nucleotit liên kế bao gồm hoặc có công thức (5' - 3'), X'-Y'-Z' trong đó; X' gồm có 1, 2 hoặc 3 đơn vị thể tương đồng nucleotit, như đơn vị LNA; Y' gồm có 7, 8 hoặc 9 đơn vị nucleotit liên kế có khả năng bổ sung thêm RNAza khi tạo thành ở dạng phức đôi với phân tử ARN bổ trợ (như đích ARN thông tin); và Z' gồm có 1, 2 hoặc 3 đơn vị thể tương đồng nucleotit, như đơn vị LNA.

Theo một số phương án, X' gồm có 1 đơn vị LNA. Theo một số phương án, X' gồm có 2 đơn vị LNA. Theo một số phương án, X' gồm có 3 đơn vị LNA. Theo một số

phương án, Z' gồm có 1 đơn vị LNA. Theo một số phương án, Z' gồm có 2 đơn vị LNA. Theo một số phương án, Z' gồm có 3 đơn vị LNA. Theo một số phương án, Y' gồm có 7 đơn vị nucleotit. Theo một số phương án, Y' gồm có 8 đơn vị nucleotit. Theo một số phương án, Y' gồm có 9 đơn vị nucleotit. Theo một số phương án nhất định, vùng Y' gồm có 10 monome nucleosit. Theo một số phương án nhất định, vùng Y' chứa hoặc bao gồm 1 – 10 monome ADN. Theo một số phương án, Y' bao gồm từ 1 – 9 đơn vị ADN, như 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 hoặc 9 đơn vị ADN. Theo một số phương án, Y' gồm có đơn vị ADN. Theo một số phương án, Y' bao gồm ít nhất một đơn vị LNA ở cấu trúc alpha-L, như 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 hoặc 9 đơn vị LNA ở cấu trúc alpha-L. Theo một số phương án, Y' bao gồm ít nhất một đơn vị alpha-L-oxy LNA hoặc trong đó tất cả các đơn vị LNA trong cấu trúc alpha-L- là đơn vị alpha-L-oxy LNA. Theo một số phương án số nucleotit có trong X'-Y'-Z' được chọn từ nhóm bao gồm (đơn vị chất tương tự nucleotit – vùng Y' – đơn vị chất tương tự nucleotit): 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4, hoặc; 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 1-9-3, 3-9-1, 4-9-1, 1-9-4, hoặc; 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3, 3-10-1, 2-10-3, 3-10-2. Theo một số phương án, số đơn vị nucleotit trong X'-Y'-Z' được chọn từ nhóm bao gồm: 2-7-1, 1-7-2, 2-7-2, 3-7-3, 2-7-3, 3-7-2, 3-7-4, và 4-7-3. Theo một số phương án nhất định, mỗi vùng X' và Y' gồm có ba monome LNA, và vùng Y' gồm có 8 hoặc 9 hoặc 10 monome nucleosit, tốt hơn nếu là monome ADN. Theo một số phương án, cả X' và Z' gồm có hai đơn vị LNA mỗi, và Y' gồm có 8 hoặc 9 đơn vị nucleotit, tốt hơn nếu là đơn vị ADN. Theo các phương án khác nhau, thiết kế Gapme khác bao gồm các gapme trong đó vùng X' và/hoặc Z' gồm có 3, 4, 5 hoặc 6 thể tương đồng nucleosit, như monome chứa đường 2'-O-metoxymethyl-riboza (2'-MOE) hoặc monome chứa đường 2'-fluoro-deoxyriboza, và vùng Y' gồm có 8, 9, 10, 11 hoặc 12 nucleosit, như monome ADN, trong đó vùng X'-Y'-Z' có 3-9-3, 3-10-3, 5-10-5 hoặc 4-12-4 monome. Các thiết kế Gapme khác được bộc lộ trong WO 2007/146511A2.

LNA gapme: LNA gapme là oligome gapme (vùng A) bao gồm ít nhất một LNA nucleotit. SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 và 40 là LNA oligome gapme. Oligome với trình tự liền kề gồm 10 – 16 nucleotit bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 33 hoặc 34 hoặc 45 có thể là oligome gapme như LNA gapme.

Liên kết giữa các nucleotit

Monome nucleosit của oligome (ví dụ, vùng thứ nhất và vùng thứ hai) được mô tả ở đây được kết đôi với nhau thông qua nhóm liên kết giữa các nucleosit. Một cách phù hợp, mỗi monome được liên kết với monome liền kề đầu 3' qua nhóm liên kết.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng, trong ngữ cảnh của sáng chế, monome đầu 5' ở đầu của oligome không chứa nhóm liên kết đầu 5', mặc dù có thể chứa hoặc có thể không chứa nhóm đầu tận đầu 5', hoặc nhóm liên kết để liên hợp.

Các thuật ngữ "nhóm liên kết" hoặc "liên kết giữa các nucleotit" đều có nghĩa là nhóm có khả năng ghép cặp cộng hóa trị hai nucleotit. Ví dụ cụ thể và được ưu tiên gồm nhóm phosphat và nhóm phosphothioat. Liên kết giữa các nucleosit có thể được sử dụng thay đổi lẫn nhau với liên kết giữa các nucleotit.

Nucleotit của oligome theo sáng chế hoặc trình tự nucleotit liền kề của chúng được ghép cặp cùng nhau qua nhóm liên kết. Mỗi nucleotit được liên kết với nucleotit liền kề đầu 3' qua nhóm liên kết.

Liên kết giữa các nucleotit thích hợp gồm các liên kết được liệt kê trong WO 2007/031091, ví dụ liên kết giữa các nucleotit được liệt kê trong đoạn đầu tiên của trang 34 WO 2007/031091. Theo một số phương án, đó là, liên kết khác ngoài phosphodiester của vùng B (khi nó xuất hiện), tốt hơn nếu biến đổi liên kết giữa các nucleotit từ phosphodiester bình thường trở nên kháng tốt hơn khi bị tấn công bởi nucleaza, như phosphothioat hoặc boranophosphat – hai chất này, có thể bị phân cắt bởi RNase H, cũng cho phép con đường ức chế đối nghĩa trong việc làm giảm biểu hiện của gen đích.

Theo một số phương án oligome theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều liên kết nucleosit được chọn từ nhóm bao gồm phosphothioat, phosphodithioat và boranophosphat.

Lưu huỳnh (S) thích hợp chứa liên kết giữa các nucleotit được nêu ở đây có thể được ưu tiên hơn, như phosphothioat hoặc phosphodithioat. Liên kết giữa các nucleotit phosphothioat cũng được ưu tiên hơn, cụ thể là đối với vùng thứ nhất, như trong gapme, mixme, oligome chuyển đổi nối antimir, và totalme.

Thuật ngữ 'mixme' chỉ oligome chứa cả nucleotit có trong tự nhiên và không có trong tự nhiên, trong đó, đối lập với gapme, tailme, và headme không có trình tự liền kề

nhiều hơn 5, và theo một số phương án không nhiều hơn 4 nucleotit có trong tự nhiên liên tiếp, như không nhiều hơn ba nucleotit có trong tự nhiên liên tiếp, như đơn vị ADN

Thuật ngữ “totalme” chỉ oligome sợi đơn chỉ bao gồm nucleosit không có trong tự nhiên, như thể tương đồng nucleosit được biến đổi ở gốc đường.

Đối với gapme, liên kết giữa các nucleotit trong oligome có thể, ví dụ là phosphothioat hoặc boranophosphat sao cho cho phép phân cắt RNaza H ARN đích. Phosphothioat được ưu tiên, để cải thiện tính kháng nucleaza và các lý do khác, như dễ sản xuất.

Theo một khía cạnh, ngoại trừ liên kết phosphodiester giữa vùng thứ nhất và vùng thứ hai, và tùy ý trong vùng B, liên kết giữa các nucleosit còn lại của oligome theo sáng chế, nucleotit và/hoặc thể tương đồng nucleotit được liên kết với nhau bằng nhóm phosphothioat. Theo một số phương án, ít nhất 50%, như ít nhất 70%, như ít nhất 80%, như ít nhất 90% như tất cả các liên kết giữa các nucleosit giữa nucleosit trong vùng thứ nhất là liên kết khác ngoài phosphodiester (phosphat), như được chọn từ nhóm bao gồm phosphothioat phosphodithioat, hoặc boranophosphat. Theo một số phương án, ít nhất 50%, như ít nhất 70%, như ít nhất 80%, như ít nhất 90% như tất cả liên kết giữa các nucleosit giữa nucleosit trong vùng thứ nhất là phosphothioat.

WO09124238 chỉ hợp chất oligome có ít nhất một nucleosit hai vòng được gắn vào đầu tận 3' hoặc 5' bằng liên kết giữa các nucleosit trung tính. Do đó, oligome theo sáng chế có thể có ít nhất một nucleosit hai vòng gắn vào đầu tận 3' hoặc 5' bằng liên kết giữa các nucleosit trung tính, như một hoặc nhiều phosphotriester, methylphosphonat, MMI, amit-3, formaxetal hoặc thioformaxetal. Liên kết còn lại có thể là phosphothioat. Thể liên hợp oligome (Vùng C)

Một khía cạnh khác của sáng chế là thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa chứa oligome theo sáng chế, và ít nhất một gốc không phải nucleotit hoặc không phải polynucleotit (C) được liên kết cộng hóa trị với oligome này (A), tùy ý thông qua vùng liên kết có vị trí ở giữa trình tự liên kế của oligome và gốc liên hợp này (B và/hoặc Y).

Các gốc liên hợp tiêu biểu mà đã được sử dụng với oligonucleotit có thể bao gồm các phân tử ưa chất béo (thơm và không thơm) bao gồm các phân tử steroid; các protein (ví dụ, kháng thể, enzym, protein huyết thanh); các peptit; các vitamin (tan trong nước hoặc tan trong lipid); các polyme (tan trong nước hoặc tan trong lipid); các phân tử nhỏ bao gồm thuốc, độc tố, phân tử báo cáo, và phối tử của thụ thể; phức hợp cacbon hydrat;

phức hợp phân tách axit nucleic; chất chelat hóa kim loại (ví dụ, porphyrin, texaphyrin, ete chóp, v.v.); các chất trung gian bao gồm photonucleaza lai/chất trung gian; các thành phần liên kết chéo (ví dụ, quang hoạt, hoạt tính oxy hóa-khử), và các tổ hợp và các dẫn xuất của chúng. Các gốc liên hợp thích hợp, việc điều chế chúng và sự liên kết với các hợp chất oligome được đề xuất, ví dụ, trong WO 93/07883 và patent Mỹ số 6,395,492, mỗi tài liệu này được kết hợp toàn bộ ở đây để tham khảo. Các thể liên hợp oligonucleotit và việc tổng hợp chúng cũng được báo cáo trong các cuộc thăm tra toàn diện bởi Manoharan trong *Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications*, S.T. Crooke, ed., Ch. 16, Marcel Dekker, Inc., 2001 và Manoharan, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 2002, 12, 103, mỗi tài liệu này được kết hợp toàn bộ ở đây để tham khảo.

Theo một số phương án, oligome theo sáng chế được nhắm đích đến gan - tức là sau khi sử dụng toàn thân hợp chất tích tụ trong tế bào ở gan (như tế bào gan). Việc nhắm đích đến gan có thể chủ yếu được tăng cường bằng cách bổ sung gốc liên hợp (C). Tuy nhiên, để tối đa hóa tính hiệu quả của oligome, thường được mong muốn là thể liên hợp (hoặc gốc nhắm đích) được liên kết với oligome thông qua thành phần liên kết phân tách sinh học (B), như thành phần liên kết nucleotit phosphat. Do đó mong muốn là sử dụng gốc liên hợp mà tăng cường sự hấp thu và hoạt tính trong các tế bào gan. Sự tăng cường hoạt tính có thể là do sự hấp thu được tăng cường hoặc có thể là do tính hiệu nghiệm của hợp chất trong các tế bào gan được tăng cường.

Theo một số phương án, hợp chất oligome là oligome LNA, như gapme, hoặc ví dụ, oligome đối nghĩa LNA, (mà có thể được gọi là vùng A trong bản mô tả) bao gồm oligome đối nghĩa, tùy ý thành phần liên kết phân tách sinh học, như vùng B, và thể liên hợp cacbon hydrat (mà có thể được gọi là vùng C). Oligome đối nghĩa LNA có thể có chiều dài từ 7 đến 30, như từ 8 đến 26 nucleosit và chứa ít nhất một đơn vị LNA (nucleosit).

Theo một số phương án, thể liên hợp là hoặc có thể chứa cacbon hydrat hoặc chứa nhóm cacbon hydrat. Theo một số phương án, cacbon hydrat này được chọn từ nhóm bao gồm galactosa, lactosa, n-acetylgalactosamin, mannoza, và mannoza-6-phosphat. Theo một số phương án, nhóm thể liên hợp là hoặc có thể chứa mannoza hoặc mannoza-6-phosphat. Thể liên hợp cacbon hydrat có thể được sử dụng để tăng cường sự phân phối hoặc hoạt tính trong phạm vi các mô, như gan và/hoặc cơ. Xem, ví dụ, EP1495769,

WO99/65925, Yang et al., *Bioconjug Chem* (2009) 20(2): 213-21. Zatsepin & Oretskaya *Chem Biodivers.* (2004) 1(10): 1401-17.

Theo một số phương án, gốc cacbon hydrat không phải là polyme cacbon hydrat mạch thẳng. Theo một số phương án, hợp chất oligome là oligome LNA, ví dụ, oligome đối nghĩa LNA, (mà có thể được gọi là vùng A trong bản mô tả) chứa oligome đối nghĩa, vùng B như được xác định trong bản mô tả, và gốc liên hợp nhắm đích thụ thể asialoglycoprotein, như gốc GalNAc (mà có thể được gọi là vùng C). Gốc cacbon hydrat có thể là đa hóa trị, như, ví dụ 2, 3, 4 hoặc 4 gốc cacbon hydrat giống nhau hoặc không giống nhau có thể được liên kết đồng hóa trị với oligome, tùy ý thông qua một thành phần liên kết hoặc các thành phần liên kết (như vùng Y).

Các gốc liên hợp GalNAc

Theo một số phương án, gốc cacbon hydrat không phải là polyme cacbon hydrat mạch thẳng. Tuy nhiên, gốc cacbon hydrat có thể là đa hóa trị, như, ví dụ 2, 3, 4 hoặc 4 gốc cacbon hydrat giống nhau hoặc không giống nhau có thể được liên kết đồng hóa trị với oligome, tùy ý thông qua một thành phần liên kết hoặc các thành phần liên kết. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thể liên hợp chứa oligome theo sáng chế và gốc liên hợp cacbon hydrat. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thể liên hợp chứa oligome theo sáng chế và gốc liên hợp nhắm đích thụ thể asialoglycoprotein, như gốc GalNAc, mà có thể tạo ra một phần của vùng khác (còn được gọi là vùng C).

Sáng chế còn đề xuất oligonucleotit đối nghĩa LNA mà được liên hợp với gốc nhắm đích thụ thể asialoglycoprotein. Theo một số phương án, gốc liên hợp (như vùng thứ ba hoặc vùng C) chứa gốc nhắm đích thụ thể asialoglycoprotein, như galactosa, galactosamin, N-formyl-galactosamin, N-axetyl-galactosamin, N-propionyl-galactosamin, N-n-butanoyl-galactosamin, và N-isobutanoyl-galactosamin. Theo một số phương án, thể liên hợp chứa nhóm galactosa, như trime N-axetyl-galactosamin. Theo một số phương án, gốc liên hợp chứa GalNAc (N-axetyl-galactosamin), như GalNAc hóa trị một, hóa trị hai, hóa trị ba của GalNAc hóa trị bốn. Thể liên hợp GalNAc hóa trị ba có thể được sử dụng để nhắm đích hợp chất đến gan. Thể liên hợp GalNAc đã được sử dụng với metylphosphonat và oligonucleotit đối nghĩa PNA (ví dụ, US 5994517 and Hangeland et al., *Bioconjug Chem.* 1995 Nov-Dec;6(6):695-701) và siARN (ví dụ, WO 2009/126933, WO 2012/089352 & WO 2012/083046). Các tài liệu tham khảo về GalNAc và các thể liên hợp đặc hiệu được sử dụng ở đây được kết hợp trong bản mô tả

để tham khảo. WO 2012/083046 bộc lộ siARN với các gốc liên hợp GalNAc mà chứa các chất điều biến được động học phân tách được, mà thích hợp để sử dụng trong sáng chế, chất điều biến được động học được ưu tiên là nhóm kỵ nước C16 như palmitoyl, hexadec-8-enoyl, oleyl, (9E, 12E)-octadeca-9,12-dienoyl, dioctanoyl, và C16-C20 axyl. 'Chất điều biến được động học phân tách được 046 cũng có thể là cholesterol.

Các gốc nhắm đích (các gốc liên hợp) có thể được chọn từ nhóm bao gồm: galactosa, galactosamin, N-formyl-galactosamin, N-axetyl-galactosamin, N-propionyl-galactosamin, N-n-butanoyl-galactosamin, N-iso-butanoyl-galactosamin, nhóm galactosa, và trime N-axetyl-galactosamin và có thể có chất điều biến được động học được chọn từ nhóm bao gồm: nhóm kỵ nước có 16 nguyên tử cacbon hoặc nhiều hơn, nhóm kỵ nước có 16 đến 20 nguyên tử cacbon, palmitoyl, hexadec-8-enoyl, oleyl, (9E,12E)-octadeca-9,12dienoyl, dioctanoyl, và C16-C20 axyl, và cholesterol. Một số cụm GalNAc đã biết được bộc lộ trong '046 bao gồm: (E)-hexadec-8-enoyl (C16), oleyl (C18), (9E,12E)-octadeca-9,12-dienoyl (C18), octanoyl (C8), dodececanoyl (C12), C-20 axyl, C24 axyl, dioctanoyl (2xC8). Gốc nhắm đích chất điều biến được động học - gốc nhắm đích có thể được liên kết với polynucleotit thông qua liên kết không bền về mặt sinh lý hoặc, ví dụ, liên kết disulfua, hoặc thành phần liên kết PEG. Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng thành phần liên kết phosphodiester giữa oligome và nhóm thể liên hợp (các thành phần liên kết này được gọi là vùng B trong bản mô tả, và thích hợp là có vị trí ở giữa oligome LNA và nhóm liên hợp cacbon hydrat).

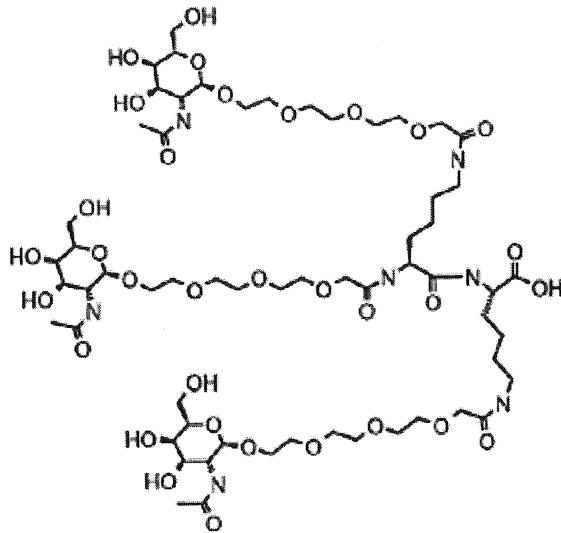
Để nhắm đích các tế bào gan trong gan, phối tử nhắm đích được ưu tiên là nhóm galactosa.

Nhóm galactosa chứa phân tử ví dụ chứa hai đến bốn dẫn xuất galactosa tận cùng. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ dẫn xuất galactosa bao gồm cả galactosa và các dẫn xuất của galactosa có ái lực đối với thụ thể asialoglycoprotein bằng hoặc lớn hơn ái lực đối với thụ thể asialoglycoprotein của galactosa. Dẫn xuất galactosa tận cùng được gắn vào phân tử thông qua C-1 cacbon của nó. Thụ thể asialoglycoprotein (ASGPr) chủ yếu được biểu hiện trên các tế bào gan và liên kết các glycoprotein đầu tận cùng galactosa được phân nhánh. Nhóm galactosa được ưu tiên có ba galactosamin tận cùng hoặc các dẫn xuất galactosamin, mỗi galactosamin tận cùng hoặc dẫn xuất galactosamin này có ái lực đối với thụ thể asialoglycoprotein. Nhóm galactosa được ưu tiên hơn có ba N-axetyl-galactosamin tận cùng. Các thuật ngữ khác thông dụng trong lĩnh vực này

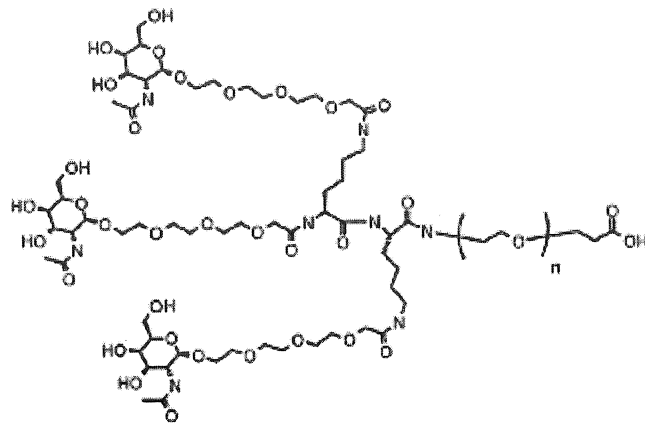
bao gồm galactoza ba râu, galactoza hóa trị ba và galactoza trime. Đã biết rằng các cụm dẫn xuất galactoza ba râu được liên kết với ASGPr với ái lực lớn hơn so với các cấu trúc dẫn xuất galactoza hai râu hoặc một râu (Baenziger and Fiete, 1980, Cell, 22, 611-620; Connolly et al., 1982, 1. Biol. Chern., 257, 939-945). Tính đa hóa trị được yêu cầu để đạt được nM ái lực. Theo WO 2012/083046, việc gắn dẫn xuất galactoza đơn có ái lực đối với thụ thể asialoglycoprotein không tạo ra sự phân phối chức năng của RNAi polynucleotit đến các tế bào gan in vivo khi được đồng sử dụng với polyme phân phối.

Nhóm galactoza có thể bao gồm hai hoặc tốt hơn là ba dẫn xuất galactoza, mỗi dẫn xuất galactoza này được liên kết với điểm nhánh trung tâm. Các dẫn xuất galactoza được gắn vào điểm nhánh trung tâm thông qua các C-1 cacbon của các sacarit. Dẫn xuất galactoza tốt hơn là được liên kết với điểm nhánh thông qua các thành phần liên kết hoặc các đoạn đệm. Đoạn đệm được ưu tiên là đoạn đệm ưa nước linh hoạt (patent Mỹ 5885968; Biessen et al. J. Med. Chern. 1995 Vol. 39 p. 1538-1546). Đoạn đệm ưa nước linh hoạt được ưu tiên là đoạn đệm PEG. Đoạn đệm PEG được ưu tiên là đoạn đệm PEG3. Điểm nhánh có thể là phân tử nhỏ bất kỳ mà cho phép gắn ba dẫn xuất galactoza và còn cho phép gắn điểm nhánh với oligome. Nhóm điểm nhánh được lấy làm ví dụ là di-lysin. Phân tử di-lysin chứa ba nhóm amin mà ba dẫn xuất galactoza có thể được gắn vào và nhóm phản ứng carboxyl mà di-lysin có thể được gắn vào oligome. Việc gắn điểm nhánh với oligome có thể xảy ra thông qua thành phần liên kết hoặc đoạn đệm. Đoạn đệm được ưu tiên là đoạn đệm ưa nước linh hoạt. Đoạn đệm ưa nước linh hoạt được ưu tiên là đoạn đệm PEG. Đoạn đệm PEG được ưu tiên là đoạn đệm PEG3 (ba đơn vị etylen). Nhóm galactoza có thể được gắn vào đầu 3' hoặc 5' của oligome bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Dẫn xuất galactoza được ưu tiên là N-acetyl-galactosamin (GalNAc). Các sacarit khác có ái lực đối với thụ thể asialoglycoprotein có thể được chọn từ danh sách bao gồm: galactosamin, N-n-butanoylgalactosamin, và N-iso-butanoylgalactosamin. Các ái lực của các dẫn xuất galactoza đối với thụ thể asialoglycoprotein đã được nghiên cứu (xem ví dụ: Jobst, S.T. and Drickamer, K. JB.C. 1996, 271, 6686) hoặc dễ dàng được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp điển hình trong lĩnh vực này.

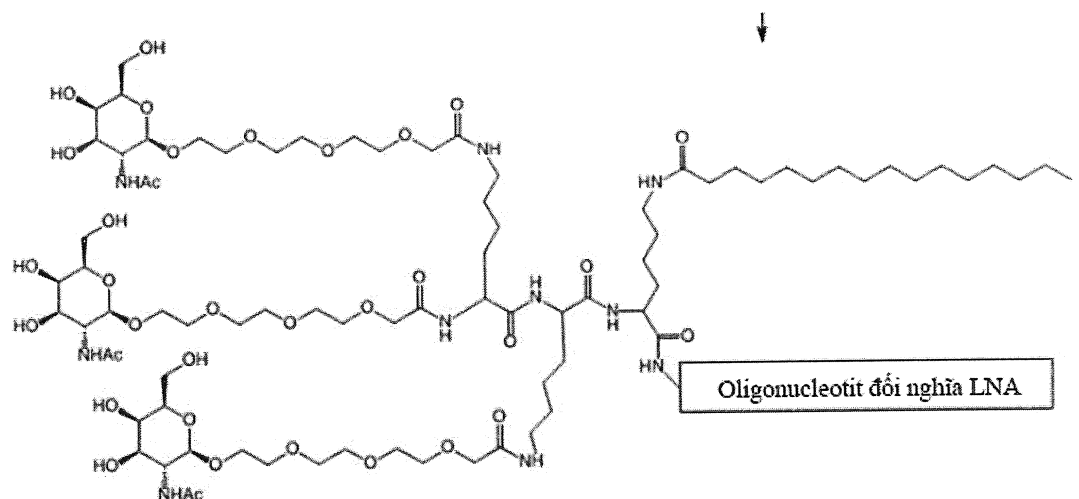


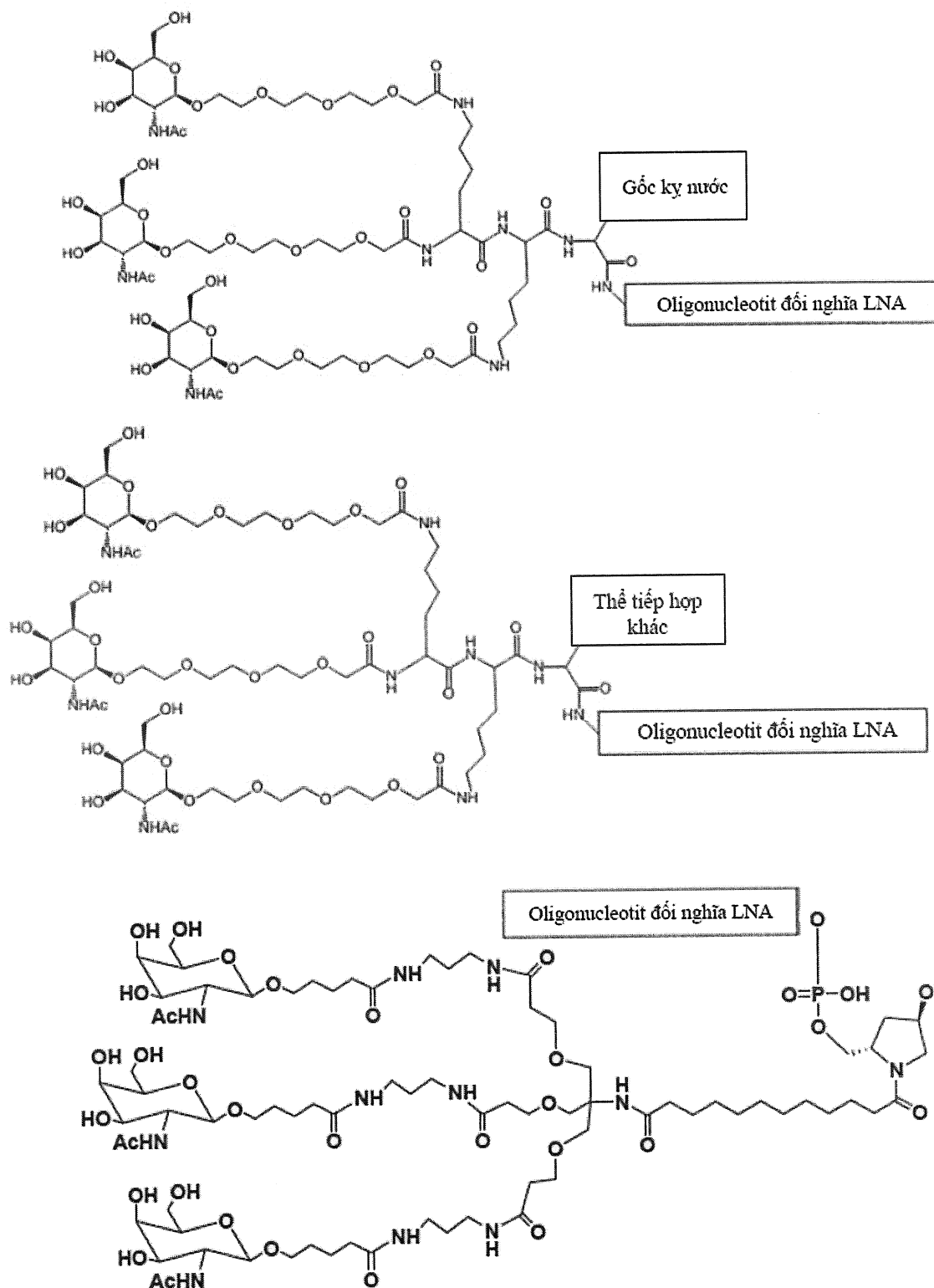
Một phương án về cụm galactoza



Cụm galactoza với đoạn đệm PEG giữa điểm nhánh và axit nucleic

Các ví dụ khác về thể liên hợp theo sáng chế được minh họa dưới đây:





Nếu ở gốc kỵ nước hoặc ưa chất béo (hoặc thế liên hợp khác) (tức là chất điều biến được động học) trong các thế liên hợp nhóm GalNAc nêu trên là, khi sử dụng các oligome LNA, như oligonucleotit đối nghĩa LNA, tùy ý.

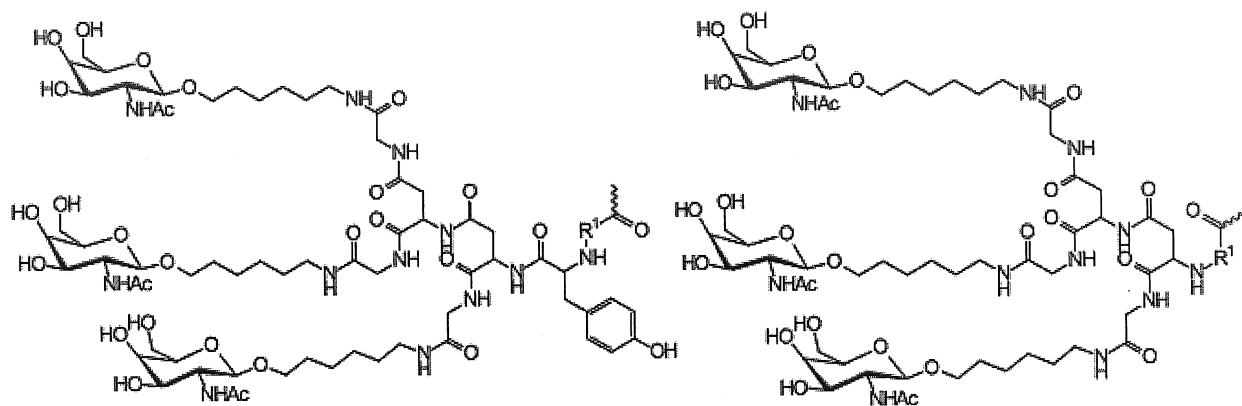
Xem các hình vẽ về các nhóm GalNAc cụ thể được sử dụng trong nghiên cứu này, Conj 1, 2, 3, 4 và Conj1a, 2a, 3a và 4a (mà được thể hiện với thành phần liên kết C6 tùy ý mà nhóm liên kết GalNAc với oligome).

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, gốc liên hợp của thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa chứa hoặc gồm có Conj 1, 2, 3, 4 và Conj1a, 2a, 3a và 4a. Tốt nhất là gốc liên hợp chứa hoặc gồm có Conj 2a.

Theo một phương án được ưu tiên khác, thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, và 24.

Do đó, mỗi gốc cacbon hydrat của nhóm GalNAc (ví dụ, GalNAc) có thể được liên kết với oligome thông qua đoạn đệm, như thành phần liên kết (poly)etylen glycol (PEG), như thành phần liên kết di, tri, tetra, penta, hexa-etylen glycol. Như được thể hiện trên đây, gốc PEG tạo ra đoạn đệm giữa gốc đường galactosa và thành phần liên kết peptit (trilysin được thể hiện).

Theo một số phương án, nhóm GalNAc chứa thành phần liên kết peptit, ví dụ, Tyr-Asp(Asp) tripeptit hoặc Asp(Asp) dipeptit, mà được gắn vào oligome (hoặc với vùng Y hoặc vùng B) thông qua thành phần liên kết hai gốc, ví dụ, nhóm GalNAc có thể chứa các thành phần liên kết hai gốc sau:



R^1 là lưỡng gốc tốt hơn là được chọn từ $-C_2H_4-$, $-C_3H_6-$, $-C_4H_8-$, $-C_5H_{10}-$, $-C_6H_{12}-$, 1,4-xyclohexyl ($-C_6H_{10}-$), 1,4-phenyl ($-C_6H_4-$), $-C_2H_4OC_2H_4-$, $-C_2H_4(OC_2H_4)_2-$ hoặc $-C_2H_4(OC_2H_4)_3-$, $C(O)CH_2-$, $-C(O)C_2H_4-$, $-C(O)C_3H_6-$, $-C(O)C_4H_8-$, $-C(O)C_5H_{10}-$, $-C(O)C_6H_{12}-$, 1,4-xyclohexyl ($-C(O)C_6H_{10}-$), 1,4-phenyl ($-C(O)C_6H_4-$), $-C(O)C_2H_4OC_2H_4-$, $-C(O)C_2H_4(OC_2H_4)_2-$ hoặc $-C(O)C_2H_4(OC_2H_4)_3-$.

Theo một số phương án, R^1 là lưỡng gốc tốt hơn là được chọn từ $-C_2H_4-$, $-C_3H_6-$, $-C_4H_8-$, $-C_5H_{10}-$, $-C_6H_{12}-$, 1,4-xyclohexyl ($-C_6H_{10}-$), 1,4-phenyl ($-C_6H_4-$), $-C_2H_4OC_2H_4-$, $-C_2H_4(OC_2H_4)_2-$ hoặc $-C_2H_4(OC_2H_4)_3-$.

Thể liên hợp cacbon hydrat (ví dụ, GalNAc), hoặc gốc thành phần liên kết-cacbon hydrat (ví dụ, gốc cacbon hydrat-PEG) có thể được nối (được liên kết) đồng hóa trị với oligome thông qua nhóm điểm nhánh như, axit amin, hoặc peptit, mà thích hợp chứa hai

hoặc nhiều nhóm amin (như 3, 4, hoặc 5), như lysin, di-lysin hoặc tri-lysin hoặc tetra-lysin. Phân tử tri-lysin chứa bốn nhóm amin mà ba nhóm liên hợp cacbon hydrat, như galactosa & các dẫn xuất (ví dụ, GalNAc) và thể liên hợp khác như gốc/nhóm kỵ nước hoặc ưa chất béo có thể được gắn và nhóm phản ứng carboxyl mà thông qua đó tri-lysin có thể được gắn vào oligome. Thể liên hợp khác, như gốc ưa chất béo/kỵ nước có thể được gắn vào gốc lysin mà được gắn vào oligome.

Ngạc nhiên là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng các thể liên hợp GalNAc để sử dụng với oligome LNA không yêu cầu chất điều biến được động học (như được mô tả dưới đây), và cụ thể là, theo một số phương án, thể liên hợp GalNAc không được liên kết đồng hóa trị với gốc ưa chất béo hoặc kỵ nước, như các gốc được mô tả ở đây, ví dụ, không chứa axit béo C8 – C36 hoặc sterol. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến thể liên hợp GalNAc của oligome LNA mà không chứa chất điều biến được động học ưa chất béo hoặc kỵ nước hoặc gốc/nhóm liên hợp.

Chất điều biến được động học

Hợp chất theo sáng chế còn có thể chứa một hoặc nhiều gốc liên hợp bổ sung, mà các gốc ưa chất béo hoặc kỵ nước của nó đáng quan tâm một cách đặc biệt, như khi nhóm thể liên hợp là gốc cacbon hydrat. Các gốc ưa chất béo hoặc kỵ nước này có thể hoạt động như chất điều biến được động học, và có thể được liên kết đồng hóa trị với thể liên hợp cacbon hydrat, thành phần liên kết liên kết thể liên hợp cacbon hydrat với oligome hoặc thành phần liên kết liên kết các thể liên hợp (đa hóa trị) liên hợp cacbon hydrat, hoặc với oligome, tùy ý thông qua thành phần liên kết, như thành phần liên kết phân tách sinh học.

Do đó, oligome hoặc gốc liên hợp có thể chứa chất điều biến được động học, như gốc ưa chất béo hoặc kỵ nước. Các gốc này được bộc lộ trong ngữ cảnh của thể liên hợp siARN trong WO 2012/082046. Gốc kỵ nước có thể chứa C8 – C36 axit béo, mà có thể là no hoặc không no. Theo một số phương án, axit béo C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28, C30, C32 và C34 có thể được sử dụng. Nhóm kỵ nước có thể có 16 nguyên tử cacbon hoặc nhiều hơn. Các nhóm kỵ nước thích hợp được lấy làm ví dụ có thể được chọn từ nhóm bao gồm: sterol, cholesterol, palmitoyl, hexadec-8-enoyl, oleyl, (9E, 12E)-octadeca-9,12-dienoyl, dioctanoyl, và C16-C20 axyl. Theo WO'346, nhóm kỵ nước có ít hơn 16 nguyên tử cacbon ít hiệu quả hơn trong việc tăng cường nhắm đích polynucleotit, nhưng chúng có thể được sử dụng nhiều lần (ví dụ, 2x, như 2x

C8 hoặc C10, C12 hoặc C14) để tăng cường tính hiệu quả. Chất điều biến được động học hữu ích để làm các gốc nhắm đích polynucleotit có thể được chọn từ nhóm bao gồm: cholesterol, nhóm alkyl, nhóm alkenyl, nhóm alkynyl, nhóm aryl, nhóm aralkyl, nhóm aralkenyl, và nhóm aralkynyl, mỗi nhóm này có thể là mạch thẳng, mạch nhánh, hoặc mạch vòng. Chất điều biến được động học tốt hơn là hydrocarbon, chỉ chứa các nguyên tử cacbon và hydro. Tuy nhiên, các thay thế hoặc nguyên tử khác loại mà duy trì tính kỵ nước, ví dụ, flo, có thể được cho phép.

Thể liên hợp ưa chất béo

Theo một số phương án, nhóm thể liên hợp là hoặc có thể chứa gốc ưa chất béo, như sterol (ví dụ, cholesterol, cholesteryl, cholestanol, stigmasterol, axit cholanin và ergosterol). Theo một số phương án, thể liên hợp là hoặc chứa tocopherol (ví dụ như Conj 6 và Conj 6a trên Fig. 2). Theo một số phương án, thể liên hợp là hoặc có thể chứa cholesterol (ví dụ như Conj 5 và Conj 5a trên Fig. 2).

Theo một số phương án, thể liên hợp là, hoặc có thể chứa lipid, phospholipit hoặc rượu ưa chất béo, như lipid cation, lipid trung hòa, sphingolipit, và axit béo như axit stearic, oleic, elaidic, linoleic, linoleaidic, linolenic, và myristic. Theo một số phương án, axit béo bao gồm chuỗi alkyl C4 – C30 no hoặc không no. Chuỗi alkyl có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh.

Các gốc liên hợp ưa chất béo có thể được sử dụng, ví dụ, để chống lại bản chất ưa nước của hợp chất oligome và tăng cường sự thẩm thấu tế bào.

Các gốc ưa chất béo bao gồm, ví dụ, sterol stanol, và steroid và các hợp chất liên quan như cholesterol (Patent Mỹ số 4,958,013 và Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553), thiocholesterol (Oberhauser et al, Nucl Acids Res., 1992, 20, 533), lanosterol, coprostanol, stigmasterol, ergosterol, calxiferol, axit cholic, axit deoxycholic, estron, estradiol, estratriol, progesteron, stilbestrol, testosteron, androsteron, deoxycorticosteron, cortison, 17-hydroxycorticosteron, các dẫn xuất của chúng, và hợp chất tương tự. Theo một số phương án, thể liên hợp có thể được chọn từ nhóm bao gồm cholesterol, thiocholesterol, lanosterol, coprostanol, stigmasterol, ergosterol, calxiferol, axit cholic, axit deoxycholic, estron, estradiol, estratriol, progesteron, stilbestrol, testosteron, androsteron, deoxycorticosteron, cortison, và 17-hydroxycorticosteron. Các gốc liên hợp ưa chất béo khác bao gồm nhóm béo, như, ví dụ, alkyl, alkenyl, và alkynyl mạch thẳng, mạch nhánh, và mạch vòng. Các nhóm béo

có thể có, ví dụ, 5 đến khoảng 50, 6 đến khoảng 50, 8 đến khoảng 50, hoặc 10 đến khoảng 50 nguyên tử cacbon. Ví dụ về nhóm béo bao gồm undexyl, dodexyl, hexadexyl, heptadexyl, octadexyl, nonadexyl, terpen, bornyl, adamantyl, các dẫn xuất của chúng và hợp chất tương tự. Theo một số phương án, một hoặc nhiều nguyên tử cacbon trong nhóm béo có thể được thay thế bằng nguyên tử khác loại như O, S, hoặc N (ví dụ, geranyloxyhexyl). Các gốc liên hợp ưa chất béo thích hợp khác bao gồm các dẫn xuất béo của glyxerol như alkylglyxerol, bis(alkyl)glyxerol, tris(alkyl)glyxerol, monoglyxerit, diglyxerit, và triglyxerit. Theo một số phương án, thể liên hợp ưa chất béo là di-hexyldexyl-rac-glyxerol hoặc 1,2-di-O- hexyldexyl-rac-glyxerol (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea, et al., Nuc. Acids Res., 1990, 18, 3777) hoặc phosphonat của chúng. Các nhóm chức béo no và không no, như, ví dụ, axit béo, rượu béo, este béo, và amin béo, cũng có thể dùng làm các gốc liên hợp ưa chất béo. Theo một số phương án, các nhóm chức béo có thể chứa khoảng 6 nguyên tử cacbon đến khoảng 30 hoặc khoảng 8 đến khoảng 22 nguyên tử cacbon. Ví dụ về axit béo bao gồm, axit capric, axit caprylic, axit lauric, axit palmitic, axit myristic, axit stearic, axit oleic, axit linoleic, axit linolenic, axit arachidonic, axit eicosenoic và các axit tương tự.

Theo các phương án khác, nhóm liên hợp ưa chất béo có thể là nhóm thơm nhiều vòng có 6 đến khoảng 50, 10 đến khoảng 50, hoặc 14 đến khoảng 40 nguyên tử cacbon. Ví dụ về nhóm thơm nhiều vòng bao gồm pyren, purin, acridin, xanthen, floren, phenanthren, anthraxen, quinolin, isoquinolin, naphtalen, các dẫn xuất của chúng và hợp chất tương tự. Các gốc liên hợp ưa chất béo thích hợp khác bao gồm menthol, trityl (ví dụ, dimetoxyltrityl (DMT)), phenoxazin, axit lipoic, phospholipit, ete, thioete (ví dụ, hexyl-S-tritylthiol), các dẫn xuất của chúng và hợp chất tương tự. Việc điều chế thể liên hợp ưa chất béo của hợp chất oligome được mô tả rõ ràng trong lĩnh vực này, như trong, ví dụ, Saison-Behmoaras et al, EMBO J., 1991, 10, 1111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk et al, Biochimie, 1993, 75, 49; (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229, và Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651.

Hợp chất oligome chứa các gốc liên hợp có ái lực đối với lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL) có thể giúp tạo ra hệ phân phối được nhắm đích hiệu quả. Mức độ biểu hiện cao của các thụ thể LDL trên các tế bào khối u khiến cho LDL thành chất mang thu hút để phân phối có chọn lọc thuốc đến các tế bào này (Rump, et al., Bioconjugate Chem., 1998, 9, 341; Firestone, Bioconjugate Chem., 1994, 5, 105; Mishra, et al., Biochim.

Biophys. Acta, 1995, 1264, 229). Các gốc có ái lực đối với LDL bao gồm nhiều nhóm ưa chất béo như steroid (ví dụ, cholesterol), axit béo, các dẫn xuất của chúng và các tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, các gốc liên hợp có ái lực LDL có thể là dioleoyl este của axit cholic như axit chenodeoxycholic và axit lithocholic.

Theo một số phương án, thể liên hợp ưa chất béo có thể là hoặc có thể chứa biotin. Theo một số phương án, thể liên hợp ưa chất béo có thể là hoặc có thể chứa glyxerit hoặc glyxerit este.

Thể liên hợp ưa chất béo, như sterol, stanol, và stanol, như cholesterol hoặc như được bộc lộ trong bản mô tả, có thể được sử dụng để tăng cường sự phân phối của oligonucleotit đến, ví dụ, gan (cụ thể là các tế bào gan).

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, gốc liên hợp của thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa chứa hoặc gồm có Conj 5, 5a, 6 hoặc 6a. Tốt nhất là gốc liên hợp chứa hoặc gồm có Conj 5a.

Theo một phương án được ưu tiên khác, thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 41, 42 và 43.

Các tài liệu tham khảo sau cũng đề cập đến việc sử dụng thể liên hợp ưa chất béo: Kobylanska et al., Acta Biochim Pol. (1999); 46(3): 679 – 91. Felber et al., Biomaterials (2012) 33(25): 599-65); Grijalvo et al., J Org Chem (2010) 75(20): 6806 – 13. Koufaki et al., Curr Med Chem (2009) 16(35): 4728-42. Godeau et al J. Med. Chem. (2008) 51(15): 4374-6.

Thành phần liên kết (ví dụ, vùng B hoặc Y)

Liên kết hoặc thành phần liên kết là sự nối giữa hai nguyên tử mà liên kết một nhóm hoặc đoạn hóa học quan tâm với một nhóm hoặc đoạn hóa học đáng quan tâm khác thông qua một hoặc nhiều liên kết đồng hóa trị. Các gốc liên hợp (hoặc gốc nhắm đích hoặc phong bế) có thể được gắn vào hợp chất oligome trực tiếp hoặc thông qua gốc liên kết (thành phần liên kết hoặc thành phần nối) – thành phần liên kết. Các thành phần liên kết là các gốc hai chức mà nhằm để nối đồng hóa trị vùng thứ ba, ví dụ, gốc liên hợp, với hợp chất oligome (như với vùng A). Theo một số phương án, thành phần liên kết chứa cấu trúc chuỗi hoặc oligome của các đơn vị lặp lại như các đơn vị etylen glycol hoặc axit amin. Thành phần liên kết có thể có ít nhất hai nhóm chức, một nhóm để gắn vào hợp chất oligome và nhóm còn lại để gắn vào gốc liên hợp. Các nhóm chức liên kết lấy làm ví dụ có thể là ưa điện tử để phản ứng với nhóm ưa nhân trên oligome hoặc gốc

liên hợp, hoặc ưa nhân để phản ứng với nhóm ưa điện tử. Theo một số phương án, các nhóm chức liên kết bao gồm amino, hydroxyl, axit carboxylic, thiol, phosphoramidat, phosphothioat, phosphat, phosphit, các nhóm không no (ví dụ, liên kết đôi hoặc liên kết ba), và hợp chất tương tự. Một số ví dụ về các thành phần liên kết bao gồm axit 8-amino-3,6-dioxaoctanoic (ADO), succinimidyl 4-(N-maleimidometyl)xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), axit 6-aminohexanoic (AHEx hoặc AHA), 6-aminohexyloxy, axit 4-aminobutyric, axit 4-aminoxycyclohexylcarboxylic, succinimidyl 4-(N-maleimidometyl)xyclohexan-1-carboxy-(6-amido-caproat) (LCSMCC), succinimidyl m-maleimido-benzoylat (MBS), succinimidyl N-ε-maleimido-caproylat (EMCS), succinimidyl 6-(β-maleimido-propionamido) hexanoat (SMPH), succinimidyl N-(α-maleimido axetat) (AMAS), succinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)butyrat (SMPB), β-alanin (β-ALA), phenylglyxin (PHG), axit 4-aminoxycyclohexanoic (ACHC), β-(xyclopropyl) alanin (β-CYPR), axit amin dodecanoic (ADC), alylen diol, polyetylen glycol, axit amin, và thành phần tương tự.

Nhiều nhóm thành phần liên kết khác nhau là đã biết trong lĩnh vực này mà có thể hữu ích trong việc gắn các gốc liên hợp với hợp chất oligome. Bài viết về nhiều nhóm thành phần liên kết hữu ích có thể được tìm thấy trong, ví dụ, Antisense Research and Applications, S. T. Crooke và B. Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, p. 303-350. Liên kết disulfua đã được sử dụng để liên kết đầu tận cùng 3' của ligonucleotit với peptit (Corey, et al., Science 1987, 238, 1401; Zuckermann, et al, J Am. Chem. Soc. 1988, 110, 1614; và Corey, et al., J Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8524). Nelson, et al., Nuc. Acids Res. 1989, 17, 7187 mô tả chất phản ứng liên kết để gắn biotin với đầu tận cùng 3' của oligonucleotit. Chất phản ứng này, N-Fmoc-O-DMT-3-amino-1,2-propandiol có thể mua được trên thị trường của Clontech Laboratories (Palo Alto, Calif.) dưới tên 3'-Amine. Nó cũng có thể mua được trên thị trường dưới tên chất phản ứng 3'-Amino-Modifier của Glen Research Corporation (Sterling, Va.). Chất phản ứng này cũng được sử dụng để liên kết peptit với oligonucleotit như được báo cáo bởi Judy, et al., Tetrahedron Letters 1991, 32, 879. Chất phản ứng được bán trên thị trường tương tự để liên kết với đầu tận cùng 5' của oligonucleotit là 5'-Amino-Modifier C6. Các chất phản ứng này có sẵn của Glen Research Corporation (Sterling, Va.). Các hợp chất này hoặc các hợp chất tương tự được sử dụng bởi Krieg, et al, Antisense Research and Development 1991, 1, 161 để liên kết fluorescein với đầu tận cùng 5' của oligonucleotit.

Các hợp chất khác như acridin đã được gắn vào nhóm phosphat đầu tận cùng 3' của oligonucleotit thông qua liên kết polymetylen (Asseline, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984, 81, 3297). [0074] Nhóm bất kỳ trong các nhóm nêu trên có thể được sử dụng để làm thành phần liên kết đơn hoặc kết hợp với một hoặc nhiều thành phần liên kết khác.

Các thành phần liên kết và việc sử dụng chúng để điều chế các thể liên hợp của hợp chất oligome được đề xuất trong toàn bộ lĩnh vực như trong WO 96/11205 và WO 98/52614 và Patent Mỹ số 4948882; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5580731; 5486603; 5608046; 4587044; 4667025; 5254469; 5245022; 5112963; 5391723; 5510475; 5512667; 5574142; 5684142; 5770716; 6096875; 6335432; và 6335437, WO 2012/083046 mỗi tài liệu được kết hợp toàn bộ ở đây để tham khảo.

Như được sử dụng trong bản mô tả, liên kết không bền về mặt sinh lý là liên kết không bền mà phân tách được trong các điều kiện thường gặp hoặc tương tự với các điều kiện gặp phải trong cơ thể động vật có vú (còn được gọi là thành phần liên kết phân tách được, được minh họa là vùng B trên Fig. 12 và 13). Nhóm liên kết không bền về mặt sinh lý được chọn sao cho chúng trải qua sự biến đổi hóa học (ví dụ, phân tách) khi có mặt trong các điều kiện vật lý nhất định. Các điều kiện trong tế bào động vật có vú bao gồm các điều kiện hóa học như độ pH, nhiệt độ, các điều kiện hoặc chất oxy hóa hoặc khử, và nồng độ muối được phát hiện trong hoặc tương tự như các điều kiện gặp phải trong các tế bào động vật có vú. Các điều kiện trong tế bào động vật có vú còn bao gồm sự có mặt của hoạt tính enzym thường có mặt trong tế bào động vật có vú như từ enzym phân giải protein hoặc thủy phân. Theo một số phương án, thành phần liên kết phân tách nhạy với (các) nucleaza mà ví dụ có thể, được biểu hiện trong tế bào đích – và cụ thể là, như được nêu chi tiết trong bản mô tả, thành phần liên kết này có thể là nucleosit được liên kết phosphodiester vùng ngắn (ví dụ, 1 – 10), như nucleosit ADN.

Sự biến đổi hóa học (sự phân tách của liên kết không bền) có thể được khởi phát do bổ sung chất được dùng vào tế bào hoặc có thể xảy ra tự phát khi phân tử chứa liên kết không bền tiến đến môi trường nội bào và/hoặc ngoại bào thích hợp. Ví dụ, liên kết không bền do pH có thể được phân tách khi phân tử đi vào endosom được axit hóa. Do vậy, liên kết không bền do pH có thể được coi là liên kết phân tách được bằng endosom. Liên kết phân tách được bằng enzym có thể được phân tách khi được tiếp xúc với các enzym như các enzym có mặt trong endosom hoặc lysosom hoặc trong bào tương. Liên

kết disulfua có thể được phân tách khi phân tử đi vào môi trường khử mạnh hơn của bào tương tế bào. Do vậy, disulfua có thể được coi là liên kết phân tách được trong bào tương. Như được sử dụng trong bản mô tả, liên kết không bền do pH là liên kết không bền mà bị phá hủy có chọn lọc trong điều kiện axit ($\text{pH} < 7$). Các liên kết này cũng có thể là liên kết không bền trong endosom được định nghĩa, do các endosom tế bào và lysosom có độ pH nhỏ hơn 7.

Thể liên hợp phân tách sinh học được liên kết oligome

Hợp chất oligome có thể tùy ý, chứa vùng thứ hai (vùng B) mà nằm ở giữa oligome (được gọi là vùng A) và thể liên hợp (được gọi là vùng C) Xem Fig. 12 và 13 để minh họa). Vùng B có thể là thành phần liên kết như thành phần liên kết phân tách được (còn được gọi là liên kết không bền về mặt sinh lý). Các liên kết không bền về mặt sinh lý nhạy nucleaza: Theo một số phương án, oligome (còn được gọi là hợp chất oligome) theo sáng chế (hoặc thể liên hợp) chứa ba vùng:

- i) vùng thứ nhất (vùng A), chứa 10 đến 18 nucleotit liên kế;
- ii) vùng thứ hai (vùng B) chứa thành phần liên kết phân tách sinh học
- iii) vùng thứ ba (C) mà chứa gốc liên hợp, gốc nhắm đích, gốc hoạt hóa, trong đó vùng thứ ba được liên kết đồng hóa trị với vùng thứ hai.

Theo một số phương án, vùng B có thể là thành phần liên kết phosphat nucleotit. Ví dụ, các thành phần liên kết này có thể được sử dụng khi thể liên hợp là thể liên hợp ưa chất béo, như lipit, axit béo, sterol, như cholesterol hoặc tocopherol. Các thành phần liên kết phosphat nucleotit cũng có thể được sử dụng cho các thể liên hợp khác, ví dụ, thể liên hợp cacbon hydrat, như GalNAc.

Các thành phần liên kết peptit

Theo một số phương án, thành phần liên kết phân tách được (vùng B) là peptit, như thành phần liên kết trilysin peptit mà có thể được sử dụng trong thể liên hợp polyGalNAc, như thể liên hợp triGalNAc. Cũng xem các peptit hai gốc được đề cập trong bản mô tả.

Các thành phần liên kết khác đã biết trong lĩnh vực này mà có thể được sử dụng, bao gồm các thành phần liên kết disulfua.

Các thành phần liên kết phosphat nucleotit

Theo một số phương án, vùng B bao gồm 1 đến 6 nucleotit, mà được liên kết đồng hóa trị với nucleotit 5' hoặc 3' của vùng thứ nhất, như thông qua nhóm liên kết giữa các nucleosit như liên kết phosphodiester, trong đó

- a. liên kết giữa các nucleosit giữa vùng thứ nhất và vùng thứ hai là liên kết phosphodiester và nucleosit của vùng thứ hai [như ngay] liền kề với vùng thứ nhất là ADN hoặc ARN; và/hoặc
- b. ít nhất 1 nucleosit của vùng thứ hai là nucleosit ADN hoặc ARN được liên kết phosphodiester;

Theo một số phương án, vùng A và vùng B tạo ra trình tự nucleotit liền kề đơn có chiều dài 12 đến 22 nucleotit.

Theo một số khía cạnh, liên kết giữa các nucleosit giữa vùng thứ nhất và vùng thứ hai có thể được coi là một phần của vùng thứ hai.

Theo một số phương án, có nhóm liên kết chứa phospho giữa vùng thứ hai và vùng thứ ba. Nhóm liên kết phospho, có thể, ví dụ, là nhóm phosphat (phosphodiester), nhóm phosphothioat, nhóm phosphodithioat hoặc nhóm boranophosphat. Theo một số phương án, nhóm liên kết chứa phospho này nằm ở giữa vùng thứ hai và vùng liên kết mà được gắn vào vùng thứ ba. Theo một số phương án, nhóm phosphat là phosphodiester.

Do đó, theo một số khía cạnh, hợp chất oligome chứa ít nhất hai nhóm phosphodiester, trong đó ít nhất một nhóm là như theo phần mô tả nêu trên của sáng chế, và nhóm còn lại nằm ở giữa vùng thứ hai và vùng thứ ba, tùy ý giữa nhóm thành phần liên kết và vùng thứ hai.

Theo một số phương án, vùng thứ ba là nhóm hoạt hóa, như nhóm hoạt hóa để sử dụng để liên hợp. Theo khía cạnh này, sáng chế còn đề xuất oligome được hoạt hóa chứa vùng A và B và nhóm hoạt hóa, ví dụ, hợp chất trung gian mà thích hợp để liên kết tiếp với vùng thứ ba, như thích hợp để liên hợp.

Theo một số phương án, vùng thứ ba là nhóm phản ứng, như nhóm phản ứng để sử dụng để liên hợp. Theo khía cạnh này, sáng chế còn đề xuất oligome chứa vùng A và B và nhóm phản ứng, ví dụ, hợp chất trung gian mà thích hợp để liên kết tiếp với vùng thứ ba, như thích hợp để liên hợp. Nhóm phản ứng có thể, theo một số phương án chứa amin của nhóm rượu, như nhóm amin.

Theo một số phương án, vùng A chứa ít nhất một, như 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, hoặc 21 liên kết giữa các nucleosit khác với phosphodiester, như liên kết giữa các nucleosit mà (tùy ý độc lập) được chọn từ nhóm bao gồm phosphothioat, phosphodithioat, và boranophosphat, và metylphosphonat, như phosphothioat. Theo một số phương án, vùng A chứa ít nhất một liên kết phosphothioat. Theo một số phương án, ít nhất 50%, như ít nhất 75%, như ít nhất 90% liên kết giữa các nucleosit, như tất cả các liên kết giữa các nucleosit nằm trong vùng A khác với phosphodiester, ví dụ, là liên kết phosphothioat. Theo một số phương án, tất cả các liên kết giữa các nucleosit trong vùng A khác với phosphodiester.

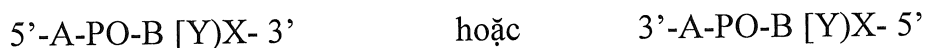
Theo một số phương án, hợp chất oligome chứa oligonucleotit đối nghĩa, như thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa. Oligonucleotit đối nghĩa có thể là hoặc có thể chứa vùng thứ nhất, và tùy ý vùng thứ hai. Theo khía cạnh này, theo một số phương án, vùng B có thể tạo ra một phần của trình tự nucleobaza liền kề mà bổ trợ với đích (axit nucleic). Theo các phương án khác, vùng B có thể thiếu tính bổ trợ với đích.

Được nêu theo một cách khác, theo một số phương án, sáng chế đề xuất phi phosphodiester được liên kết, như phosphothioat được liên kết, oligonucleotit (ví dụ, oligonucleotit đối nghĩa) mà có ít nhất một nucleosit ADN hoặc ARN (5' và/hoặc 3') tận cùng được liên kết với nucleosit liền kề của oligonucleotit thông qua liên kết phosphodiester, trong đó nucleosit ADN hoặc ARN tận cùng còn được liên kết đồng hóa trị với gốc liên hợp, gốc nhắm đích hoặc gốc phong bế, tùy ý thông qua gốc thành phần liên kết.

Theo một số phương án, hợp chất oligome chứa oligonucleotit đối nghĩa, như thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa. Oligonucleotit đối nghĩa có thể là hoặc có thể chứa vùng thứ nhất, và tùy ý vùng thứ hai. Theo khía cạnh này, theo một số phương án, vùng B có thể tạo ra một phần trình tự nucleobaza liền kề mà bổ trợ với đích (axit nucleic). Theo các phương án khác, vùng B có thể thiếu tính bổ trợ với đích.

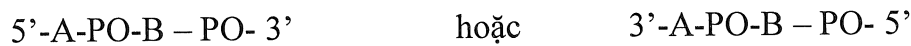
Theo một số phương án, ít nhất hai nucleosit liên tiếp của vùng thứ hai là nucleosit ADN (như ít nhất 3 hoặc 4 hoặc 5 nucleotit ADN liên tiếp).

Theo phương án như vậy, oligonucleotit của sáng chế có thể được mô tả theo công thức sau:



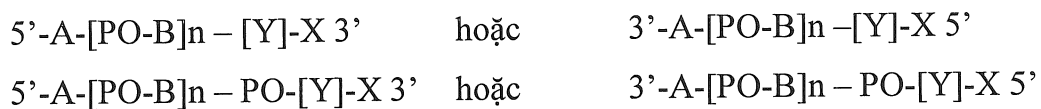
trong đó A là vùng A, PO là liên kết phosphodiester, B là vùng B, Y là nhóm liên kết tùy ý, và X là nhóm liên hợp, nhóm nhắm đích, nhóm phong bế hoặc nhóm phản ứng hoặc nhóm hoạt hóa.

Theo một số phương án, vùng B chứa 3' – 5' hoặc 5'-3': i) liên kết phosphodiester với nucleosit 5' hoặc 3' của vùng A, ii) nucleosit ADN hoặc ARN, như nucleosit ADN, và iii) liên kết phosphodiester khác



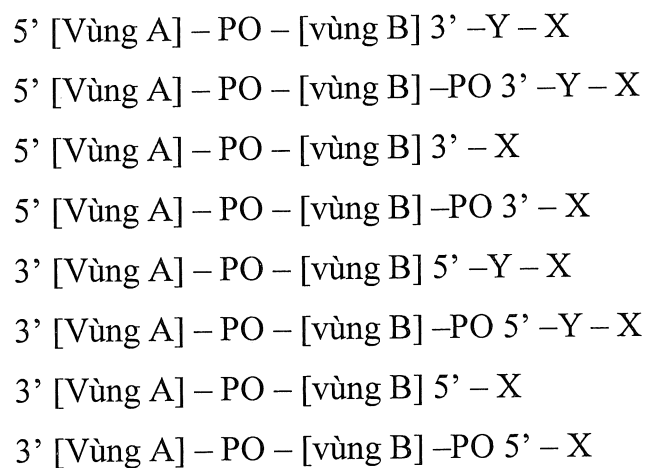
Liên kết phosphodiester khác liên kết nucleosit của vùng B với một hoặc nhiều nucleosit khác, như một hoặc nhiều nucleosit ADN hoặc ARN, hoặc có thể liên kết với X (là nhóm liên hợp, nhóm nhắm đích hoặc nhóm phong bế hoặc nhóm phản ứng hoặc nhóm hoạt hóa) tùy ý thông qua nhóm liên kết (Y).

Theo một số phương án, vùng B chứa 3' – 5' hoặc 5'-3': i) liên kết phosphodiester với nucleosit 5' hoặc 3' của vùng A, ii) 2 đến 10 nucleosit được liên kết phosphodiester ADN hoặc ARN, như nucleosit ADN, và tùy ý iii) liên kết phosphodiester khác:

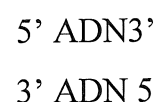


trong đó A là vùng A, $[PO-B]_n$ là vùng B, trong đó n nằm trong khoảng từ 1 đến 10, như 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10, PO là nhóm liên kết phosphodiester tùy ý giữa vùng B và X (hoặc Y nếu có).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hợp chất theo (hoặc bao gồm) một trong số các công thức sau:



Vùng B, ví dụ có thể, chứa hoặc gồm có:



5' ADN-PO-ADN-3'

3' ADN-PO-ADN-5'

5' ADN-PO-ADN-PO-ADN 3'

3' ADN-PO-ADN-PO-ADN 5'

5' ADN-PO-ADN-PO-ADN-PO-ADN 3'

3' ADN-PO-ADN-PO-ADN-PO-ADN 5'

5' ADN-PO-ADN-PO-ADN-PO-ADN-PO-ADN 3'

3' ADN-PO-ADN-PO-ADN-PO-ADN-PO-ADN 5'

Cần thấy rằng, các thành phần liên kết phân tách sinh học được liên kết phosphat có thể sử dụng nucleosit khác với ADN và ARN. Các thành phần liên kết nucleotit phân tách sinh học có thể được nhận biết bằng cách sử dụng các thử nghiệm trong ví dụ 6.

Theo một số phương án, hợp chất theo sáng chế chứa thành phần liên kết phân tách sinh học (còn được gọi là thành phần liên kết không bền về mặt sinh lý, liên kết không bền về mặt sinh lý nhạy nucleaza, hoặc thành phần liên kết nhạy nucleaza), ví dụ, thành phần liên kết phosphat nucleotit (như vùng B) hoặc thành phần liên kết peptit, mà nối oligome (hoặc trình tự nucleotit liền kề hoặc vùng A), với gốc liên hợp (hoặc vùng C).

Tính nhạy với sự phân tách trong thử nghiệm được thể hiện trong ví dụ 6 có thể được sử dụng để xác định liệu rằng thành phần liên kết là phân tách sinh học được hay không bền về mặt sinh lý.

Thành phần liên kết phân tách sinh học theo sáng chế dùng để chỉ các thành phần liên kết mà nhạy với sự phân tách trong mô đích (tức là không bền về mặt sinh lý), ví dụ, gan và/hoặc thận. Tốt hơn là tốc độ phân tách được quan sát trong mô đích lớn hơn so với tốc độ phân tách được phát hiện trong huyết thanh máu. Các phương pháp thích hợp để xác định mức độ (%) phân tách trong mô (ví dụ, gan hoặc thận) và trong huyết thanh được phát hiện trong ví dụ 6. Theo một số phương án, thành phần liên kết phân tách sinh học (còn được gọi là thành phần liên kết không bền về mặt sinh lý, hoặc thành phần liên kết nhạy nucleaza), như vùng B, trong hợp chất theo sáng chế, ít nhất khoảng 20% được phân tách, như ít nhất khoảng 30% được phân tách, như ít nhất khoảng 40% được phân tách, như ít nhất khoảng 50% được phân tách, như ít nhất khoảng 60% được phân tách, như ít nhất khoảng 70% được phân tách, như ít nhất khoảng 75% được phân tách, trong thử nghiệm chất đồng nhất trong gan hoặc thận của ví dụ 6. Theo một số phương án, độ phân tách (%) trong huyết thanh, như được sử dụng trong thử nghiệm

trong ví dụ 6, ít hơn khoảng 30%, ít hơn khoảng 20%, như ít hơn khoảng 10%, như ít hơn 5%, như ít hơn khoảng 1%.

Theo một số phương án, mà có thể là giống hoặc khác nhau, thành phần liên kết phân tách sinh học (còn được gọi là thành phần liên kết không bền về mặt sinh lý, hoặc thành phần liên kết nhạy nucleaza), như vùng B, trong hợp chất theo sáng chế, nhạy với sự phân tách S1 nucleaza. Tính nhạy đối với sự phân tách S1 có thể được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm S1 nucleaza được thể hiện trong ví dụ 6. Theo một số phương án, thành phần liên kết phân tách sinh học (còn được gọi là thành phần liên kết không bền về mặt sinh lý, hoặc thành phần liên kết nhạy nucleaza), như vùng B, trong hợp chất theo sáng chế, ít nhất khoảng 30% được phân tách, như ít nhất khoảng 40% được phân tách, như ít nhất khoảng 50% được phân tách, như ít nhất khoảng 60% được phân tách, như ít nhất khoảng 70% được phân tách, như ít nhất khoảng 80% được phân tách, như ít nhất khoảng 90% được phân tách, như ít nhất 95% được phân tách sau khi ủ trong thời gian 120 phút với S1 nucleaza theo thử nghiệm được sử dụng trong ví dụ 6.

Chọn lọc trình tự trong vùng thứ hai:

Theo một số phương án, vùng B không tạo ra trình tự bổ trợ khi vùng oligonucleotit A và B được sắp xếp thẳng hàng với trình tự đích bổ trợ.

Theo một số phương án, vùng B tạo ra trình tự bổ trợ khi vùng A và B oligonucleotit được sắp xếp thẳng hàng với trình tự đích bổ trợ. Theo khía cạnh này, vùng A và B có thể cùng nhau tạo ra trình tự liên kế đơn mà bổ trợ với trình tự đích.

Theo một số phương án, trình tự của bazơ trong vùng B được chọn để tạo ra vị trí phân tách endonucleaza tối ưu, dựa trên enzym phân tách endonucleaza nổi bật có mặt trong mô đích hoặc tế bào hoặc bộ phận dưới tế bào. Theo khía cạnh này, bằng cách phân lập các phần chiết tế bào từ mô đích và mô không phải đích, trình tự phân tách endonucleaza để sử dụng trong vùng B có thể được chọn dựa trên hoạt tính phân tách ưu tiên trong tế bào đích mong muốn (ví dụ, gan/tế bào gan) khi so với tế bào không phải đích (ví dụ, thận). Theo khía cạnh này, tính hiệu nghiệm của hợp chất đối với việc giảm điều hòa đích có thể được tối ưu hóa cho mô/tế bào mong muốn.

Theo một số phương án, vùng B chứa dinucleotit của trình tự AA, AT, AC, AG, TA, TT, TC, TG, CA, CT, CC, CG, GA, GT, GC, hoặc GG, trong đó C có thể là 5-methylxytosin, và/hoặc T có thể được thay thế bằng U. Theo một số phương án, vùng B chứa trinucleotit của trình tự AAA, AAT, AAC, AAG, ATA, ATT, ATC, ATG, ACA,

ACT, ACC, ACG, AGA, AGT, AGC, AGG, TAA, TAT, TAC, TAG, TTA, TTT, TTC, TAG, TCA, TCT, TCC, TCG, TGA, TGT, TGC, TGG, CAA, CAT, CAC, CAG, CTA, CTG, CTC, CTT, CCA, CCT, CCC, CCG, CGA, CGT, CGC, CGG, GAA, GAT, GAC, CAG, GTA, GTT, GTC, GTG, GCA, GCT, GCC, GCG, GGA, GGT, GGC, và GGG, trong đó C có thể là 5-methylxytosin và/hoặc T có thể được thay thế U. Theo một số phương án, vùng B chứa trinucleotit của trình tự AAAX, AATX, AACX, AAGX, ATAX, ATTX, ATCX, ATGX, ACAX, ACTX, ACCX, ACGX, AGAX, AGTX, AGCX, AGGX, TAAX, TATX, TACX, TAGX, TTAX, TTTX, TTCX, TAGX, TCAX, TCTX, TCCX, TCGX, TGAX, TGTX, TGCX, TGGX, CAAX, CATX, CACX, CAGX, CTAX, CTGX, CTCX, CTTX, CCAX, CCTX, CCCX, CCGX, CGAX, CGTX, CGCX, CGGX, GAAX, GATX, GACX, CAGX, GTAX, GTTX, GTCX, GTGX, GCAX, GCTX, GCCX, GCGX, GGAX, GGTX, GGCX, và GGGX, trong đó X có thể được chọn từ nhóm bao gồm A, T, U, G, C và các chất tương tự của chúng, trong đó C có thể là 5-methylxytosin và/hoặc T có thể được thay thế bằng U. Sẽ nhận biết được rằng khi liên quan đến nucleobaza (có trong tự nhiên) A, T, U, G, C, các nucleobaza này có thể được thế bằng các chất tương tự nucleobaza mà có chức năng như nucleobaza tự nhiên tương đương (ví dụ, cặp bazơ với nucleosit bổ trợ). Theo một số phương án, vùng B không chứa T hoặc U.

Hợp chất trung gian amino alkyl

Sáng chế còn đề cập đến hợp chất trung gian oligome LNA mà chứa oligome LNA đối nghĩa mà chứa thành phần liên kết amino alkyl (ví dụ, tận cùng, 5' hoặc 3'), như nhóm C2 – C36 amino alkyl, ví dụ, nhóm C6 đến C12 amino alkyl, bao gồm ví dụ, nhóm C6 và C12 amino alkyl. Nhóm amino alkyl có thể được bổ sung vào oligome LNA như một phần của quá trình tổng hợp oligonucleotit tiêu chuẩn, ví dụ, sử dụng amino alkyl phosphoramidit (ví dụ, được bảo vệ). Nhóm liên kết giữa amino alkyl và oligome LNA ví dụ có thể, là phosphothioat hoặc phosphodiester, hoặc một trong số các nhóm liên kết nucleosit còn lại được đề cập đến trong bản mô tả chẳng hạn. Nhóm amino alkyl có thể được liên kết đồng hóa trị với, ví dụ, 5' hoặc 3' của oligome LNA, như bằng nhóm liên kết nucleosit, như liên kết phosphothioat hoặc phosphodiester.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tổng hợp oligome LNA bao gồm việc tổng hợp tuần tự oligome LNA, như tổng hợp oligonucleotit pha rắn, bao gồm bước bổ sung nhóm amino alkyl vào oligome, như ví dụ, trong vòng đầu tiên hoặc vòng cuối cùng của

quá trình tổng hợp oligonucleotit. Phương pháp tổng hợp còn có thể bao gồm bước cho thể liên hợp phản ứng với amino alkyl – oligome LNA (bước liên hợp). Thể liên hợp có thể chứa các thành phần liên kết và/hoặc nhóm điểm nhánh thích hợp, và tùy ý các nhóm liên hợp khác, như nhóm kỵ nước hoặc nhóm ưa chất béo, như được mô tả trong bản mô tả. Bước liên hợp có thể được tiến hành trong khi oligome được liên kết với bộ đỡ dạng rắn (ví dụ, sau khi tổng hợp oligonucleotit, nhưng trước khi rửa giải oligome từ bộ đỡ dạng rắn), hoặc sau đó (tức là, sau khi rửa giải). Sáng chế đề xuất việc sử dụng thành phần liên kết amino alkyl trong quá trình tổng hợp oligome theo sáng chế.

Phương pháp sản xuất/tổng hợp

Sáng chế đề xuất phương pháp tổng hợp (hoặc sản xuất) hợp chất oligome, như hợp chất oligome theo sáng chế, phương pháp này bao gồm

Hoặc:

- a) bước cung cấp bộ đỡ tổng hợp oligonucleotit [pha rắn] mà một trong số các nhóm sau được gắn vào [vùng thứ ba]:
 - i) nhóm thành phần liên kết (-Y-)
 - ii) nhóm được chọn từ nhóm bao gồm nhóm liên hợp, nhóm nhắm đích, nhóm phong bế, nhóm phản ứng [ví dụ, amin hoặc rượu] hoặc nhóm hoạt hóa(X-)
 - iii) nhóm -Y – X

và

- b) bước tổng hợp oligonucleotit [tuần tự] của vùng B sau đó là vùng A,

và / hoặc:

- c) bước tổng hợp oligonucleotit [tuần tự] của vùng thứ nhất (A) và vùng thứ hai (B), trong đó sau bước tổng hợp là
- d) bước bổ sung vùng thứ ba [phosphoramidit chứa]
 - i) nhóm thành phần liên kết (-Y-)
 - ii) nhóm được chọn từ nhóm bao gồm nhóm liên hợp, nhóm nhắm đích, nhóm phong bế, nhóm phản ứng [ví dụ, amin hoặc rượu] hoặc nhóm hoạt hóa (X-)
 - iii) nhóm -Y – X

sau đó là

- e) phân tách hợp chất oligome từ bộ đỡ [pha rắn]

trong đó, tùy ý phương pháp này còn bao gồm một bước khác được chọn từ:

- f) trong đó nhóm thứ ba là nhóm hoạt hóa, bước hoạt hóa nhóm hoạt hóa để sản xuất nhóm phản ứng, sau đó là bổ sung nhóm liên hợp, nhóm phong bế, hoặc nhóm nhắm đích vào nhóm phản ứng, tùy ý thông qua nhóm thành phần liên kết (Y);
- g) trong đó vùng thứ ba là nhóm phản ứng, bước bổ sung nhóm liên hợp, nhóm phong bế, hoặc nhóm nhắm đích vào nhóm phản ứng, tùy ý thông qua nhóm thành phần liên kết (Y).
- h) trong đó vùng thứ ba là nhóm thành phần liên kết (Y), bước bổ sung nhóm liên hợp, nhóm phong bế, hoặc nhóm nhắm đích vào nhóm thành phần liên kết (Y)

trong đó bước f), g) hoặc h) được tiến hành trước hoặc tiếp theo bước phân tách hợp chất oligome từ bộ đỡ tổng hợp oligonucleotit. Theo một số phương án, phương pháp này có thể được tiến hành bằng cách sử dụng hóa học phosphoramidit tiêu chuẩn, và cụ thể là vùng X và/hoặc vùng X hoặc vùng X và Y có thể được cung cấp, trước khi kết hợp vào oligome, ở dạng phosphoramidit. Xem Fig. 5 – 10 minh họa các khía cạnh không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về phương pháp theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất phương pháp tổng hợp (hoặc sản xuất) hợp chất oligome, như hợp chất oligome theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm

bước tổng hợp oligonucleotit tuần tự của vùng thứ nhất (A) và vùng thứ hai (B), trong đó sau bước tổng hợp là bước bổ sung phosphoramidit vùng thứ ba chứa vùng X (còn được gọi là vùng C) hoặc Y, như vùng chứa nhóm được chọn từ nhóm bao gồm nhóm liên hợp, nhóm nhắm đích, nhóm phong bế, nhóm chức, nhóm phản ứng (ví dụ, amin hoặc rượu) hoặc nhóm hoạt hóa (X), hoặc nhóm -Y – X, sau đó là sự phân tách hợp chất oligome từ bộ đỡ [pha rắn].

Tuy nhiên, nhận biết được rằng vùng X hoặc X-Y có thể được bổ sung sau khi phân tách từ bộ đỡ dạng rắn. Theo một cách khác, phương pháp tổng hợp có thể bao gồm bước tổng hợp vùng thứ nhất (A), và tùy ý vùng thứ hai (B), sau đó là bước phân tách oligome từ bộ đỡ, với bước tiếp theo là bổ sung vùng thứ ba, như nhóm X hoặc nhóm X-Y vào oligome. Việc bổ sung vùng thứ ba có thể đạt được, ví dụ, bằng cách bổ sung đơn vị amino phosphoramidit trong bước cuối cùng của quá trình tổng hợp oligome (trên giá đỡ), mà có thể, sau khi phân tách từ giá đỡ, được sử dụng để nối với nhóm X

hoặc nhóm X-Y, tùy ý thông qua nhóm hoạt hóa trên nhóm X hoặc Y (khi có mặt). Theo các phương pháp mà thành phần liên kết phân tách được không phải vùng nucleotit, vùng B có thể là thành phần liên kết phân tách được không phải nucleotit, ví dụ, thành phần liên kết peptit, mà có thể tạo ra một phần vùng X (còn được gọi là vùng C) hoặc là vùng Y (hoặc một phần của chúng).

Theo một số phương án về phương pháp, vùng X (như C) hoặc (X-Y), như thể liên hợp (ví dụ, thể liên hợp GalNAc) chứa nhóm hoạt hóa, (nhóm chức được hoạt hóa) và trong phương pháp tổng hợp thể liên hợp được hoạt hóa (hoặc vùng x, hoặc X-Y) được bổ sung vào vùng thứ nhất và vùng thứ hai, như oligome được liên kết amin. Nhóm amin có thể được bổ sung vào oligome nhờ hóa học phosphoramidit tiêu chuẩn, ví dụ, để làm bước cuối cùng trong quá trình tổng hợp oligome (mà thường thu được nhóm amin ở đầu 5' của oligome). Ví dụ, trong bước cuối cùng của quá trình tổng hợp oligonucleotit, amino-alkyl phosphoramidit được bảo vệ được sử dụng, ví dụ, TFA-aminoC6 phosphoramidit (6-(Trifloaxetyl amino)-hexyl-(2-xyanoetyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit).

Vùng X (hoặc vùng C như được đề cập trong bản mô tả), như thể liên hợp (ví dụ, thể liên hợp GalNAc) có thể được hoạt hóa thông qua phương pháp NHS este và sau đó oligome được liên kết amino được bổ sung. Ví dụ, N-hydroxysuccinimide (NHS) có thể được sử dụng để làm nhóm hoạt hóa đối với vùng X (hoặc vùng C, như nhóm liên hợp, như gốc liên hợp GalNAc).

Sáng chế đề xuất oligome được điều chế bởi phương pháp theo sáng chế.

Theo một số phương án, vùng X và/hoặc vùng X hoặc vùng X và Y có thể được nối đồng hóa trị (được liên kết) với vùng B thông qua liên kết phosphat nucleosit, như các liên kết nêu trong bản mô tả, bao gồm phosphodiester hoặc phosphothioat, hoặc thông qua nhóm thay thế, như nhóm triazol.

Theo một số phương án, liên kết giữa các nucleosit giữa vùng thứ nhất và vùng thứ hai là phosphodiester được liên kết với nucleosit ADN hoặc ARN thứ nhất (hoặc duy nhất) của vùng thứ hai, hoặc vùng B chứa ít nhất một nucleosit ADN hoặc ARN được liên kết phosphodiester.

Vùng thứ hai có thể, theo một số phương án, còn chứa nucleosit ADN hoặc ARN mà có thể được liên kết phosphodiester. Vùng thứ hai còn được liên kết đồng hóa trị với

vùng thứ ba mà có thể, ví dụ, là nhóm liên hợp, nhóm nhắm đích, nhóm phản ứng, và/hoặc nhóm phong bế.

Theo một số khía cạnh, sáng chế dựa trên điều kiện về vùng không bền, vùng thứ hai, liên kết vùng thứ nhất, ví dụ, oligonucleotit đối nghĩa, và nhóm liên hợp hoặc nhóm chức, ví dụ, nhóm nhắm đích hoặc nhóm phong bế. Vùng không bền chứa ít nhất một nucleosit được liên kết phosphodiester, như nucleosit ADN hoặc ARN, như 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 nucleosit được liên kết phosphodiester, như ADN hoặc ARN. Theo một số phương án, hợp chất oligome chứa thành phần liên kết phân tách được (không bền). Theo khía cạnh này, thành phần liên kết phân tách được tốt hơn là có mặt trong vùng B (hoặc theo một số phương án, giữa vùng A và B).

Được nêu theo một cách khác, theo một số phương án, sáng chế đề xuất phi phosphodiester được liên kết, như phosphothioat được liên kết, oligonucleotit (ví dụ, oligonucleotit đối nghĩa) mà có ít nhất một nucleosit ADN hoặc ARN (5' và/hoặc 3') tận cùng được liên kết với nucleosit liền kề của oligonucleotit thông qua liên kết phosphodiester, trong đó nucleosit ADN hoặc ARN tận cùng còn được liên kết đồng hóa trị với gốc liên hợp, gốc nhắm đích hoặc gốc phong bế, tùy ý thông qua gốc thành phần liên kết.

Chế phẩm

Oligome hoặc thể liên hợp oligome theo sáng chế có thể được sử dụng trong dược phẩm và chế phẩm. Thích hợp là, chế phẩm này chứa chất pha loãng, chất mang, muối hoặc chất hỗ trợ được dụng. WO 2007/031091 đề cập đến chất pha loãng, chất mang, và chất hỗ trợ được dụng thích hợp và được ưu tiên - mà được kết hợp ở đây để tham khảo. Các liều lượng thích hợp, dạng phối trộn, đường dùng, chế phẩm, dạng liều lượng, các tổ hợp với các chất trị liệu khác, dạng phối trộn tiền được chất cũng được đề xuất trong WO 2007/031091- mà cũng được kết hợp ở đây để tham khảo.

Ứng dụng

Oligome hoặc thể liên hợp oligome theo sáng chế có thể được sử dụng để làm chất phản ứng nghiên cứu để, ví dụ, chẩn đoán, trị liệu và phòng ngừa bệnh.

Trong nghiên cứu, oligome này có thể được sử dụng để ức chế đặc hiệu sự tổng hợp của protein PCSK9 (cụ thể bằng cách làm biến chất hoặc ức chế ARN thông tin và nhờ đó ức chế sự hình thành protein) trong các tế bào và động vật thử nghiệm nhờ đó

tạo điều kiện cho sự phân tích chức năng của đích hoặc sự đánh giá về tính hữu hiệu của nó để làm đích để can thiệp trị liệu.

Trong chẩn đoán, oligome có thể được sử dụng để phát hiện và định lượng sự biểu hiện PCSK9 trong tế bào và mô bằng cách tách Northern, lai in-situ hoặc các kỹ thuật tương tự.

Để trị liệu, động vật hoặc người, bị nghi là bị bệnh hoặc rối loạn, mà có thể được điều trị bằng cách điều biến sự biểu hiện của PCSK9 được điều trị bằng cách sử dụng hợp chất oligome theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất các phương pháp điều trị cho động vật có vú, như điều trị cho người, bị nghi là bị hoặc có khả năng mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh lý, kết hợp với sự biểu hiện PCSK9 bằng cách sử dụng lượng hữu hiệu trị liệu hoặc phòng ngừa của một hoặc nhiều oligome hoặc chế phẩm theo sáng chế. Oligome, nhóm liên hợp hoặc được phẩm theo sáng chế thường được sử dụng với lượng hữu hiệu.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng hợp chất hoặc thể liên hợp theo sáng chế như được mô tả để sản xuất được phẩm để điều trị rối loạn như được đề cập trong bản mô tả, hoặc dùng cho phương pháp điều trị rối loạn như được đề cập trong bản mô tả.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều trị rối loạn như được đề cập trong bản mô tả, phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng hợp chất theo sáng chế như được nêu trong bản mô tả, và/hoặc nhóm liên hợp theo sáng chế, và/hoặc được phẩm theo sáng chế.

Chỉ định y tế

Oligome, thể liên hợp oligome và chế phẩm khác theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các tình trạng bệnh lý liên quan đến sự biểu hiện quá mức hoặc sự biểu hiện của phiên bản đột biến của PCSK9.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng hợp chất theo sáng chế để sản xuất được phẩm để điều trị bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý như được đề cập trong bản mô tả.

Thường được đề cập, một khía cạnh của sáng chế mô tả phương pháp điều trị động vật có vú mắc hoặc nhạy với các tình trạng bệnh lý liên quan đến các mức độ bất thường và/hoặc hoạt tính của PCSK9, bao gồm việc cho động vật có vú sử dụng và lượng hữu hiệu trị liệu của oligome hoặc thể liên hợp oligome nhắm đích PCSK9 mà chứa một hoặc nhiều đơn vị LNA. Oligome, nhóm liên hợp hoặc được phẩm theo sáng chế thường được sử dụng ở lượng hữu hiệu.

Bệnh hoặc rối loạn, như được đề cập trong bản mô tả, có thể, theo một số phương án, được kết hợp với đột biến trong gen PCSK9 hoặc gen có sản phẩm protein được kết hợp với hoặc tương tác với PCSK9. Do đó, theo một số phương án, ARN thông tin đích là dạng đột biến của trình tự PCSK9.

Một khía cạnh đáng quan tâm theo sáng chế đề xuất việc sử dụng oligome (hợp chất) như được xác định trong bản mô tả hoặc nhóm liên hợp như được xác định trong bản mô tả để bào chế được phẩm để điều trị bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý như được đề cập trong bản mô tả.

Phương pháp theo sáng chế tốt hơn là được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa chống lại các bệnh gây ra bởi các mức độ bất thường và/hoặc hoạt tính của PCSK9.

Được nêu theo một cách khác, theo một số phương án, sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị các mức độ bất thường và/hoặc hoạt tính của PCSK9, phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng oligome theo sáng chế, hoặc nhóm liên hợp theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến oligome, chế phẩm hoặc nhóm liên hợp như được xác định trong bản mô tả để sử dụng làm được phẩm.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng hợp chất, chế phẩm, hoặc nhóm liên hợp như được xác định trong bản mô tả để sản xuất sản phẩm để điều trị các mức độ bất thường và/hoặc hoạt tính của PCSK9 hoặc sự biểu hiện của dạng đột biến của PCSK9 (như biến thể dị ứng, như biến thể liên quan đến một trong số các bệnh được đề cập trong bản mô tả).

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị đối tượng mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh lý như các bệnh hoặc tình trạng bệnh lý được nêu trong bản mô tả.

Bệnh nhân cần điều trị là bệnh nhân mắc hoặc có thể mắc bệnh hoặc rối loạn.

Theo một số phương án, thuật ngữ 'điều trị' như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ cả việc điều trị bệnh đang tồn tại (ví dụ, bệnh hoặc rối loạn như được đề cập trong bản mô tả), hoặc ngăn ngừa bệnh, tức là phòng ngừa bệnh. Do đó nhận biết được rằng việc điều trị như được đề cập trong bản mô tả có thể, theo một số phương án, để phòng ngừa bệnh.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất hoặc chế phẩm chứa hợp chất để điều trị bệnh tăng cholesterol huyết và các rối loạn liên quan, hoặc các phương pháp điều trị bằng cách sử dụng các hợp chất hoặc chế phẩm để điều trị bệnh tăng cholesterol

huyết và các rối loạn liên quan, trong đó thuật ngữ “rối loạn liên quan” khi dùng để chỉ bệnh tăng cholesterol huyết được dùng để chỉ một hoặc nhiều tình trạng bệnh lý được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh xơ vữa động mạch, bệnh tăng lipit huyết, bệnh tăng cholesterol huyết, bệnh tăng cholesterol huyết di truyền ví dụ, thu được các đột biến chức năng trong PCSK9, chứng mất cân bằng HDL/LDL cholesterol, bệnh rối loạn mỡ máu, ví dụ, bệnh tăng lipit huyết di truyền (familial hyperlipidemia - FCHL) hoặc bệnh tăng cholesterol huyết di truyền (familial hypercholesterolemia - FHC), bệnh tăng lipit huyết mắc phải, bệnh tăng cholesterol huyết kháng statin, bệnh động mạch vành (coronary artery disease-CAD), và bệnh tim mạch vành (coronary heart disease-CHD).

Điều trị bệnh kết hợp

Theo một số phương án, hợp chất theo sáng chế để sử dụng để điều trị kết hợp với chất trị liệu khác. Ví dụ, chất ức chế của HMG CoA reductaza, như statin, ví dụ, được sử dụng rộng rãi trong điều trị bệnh chuyển hóa (xem WO 2009/043354, được kết hợp ở đây để tham khảo, ví dụ, về điều trị kết hợp). Việc điều trị kết hợp có thể là hợp chất làm giảm cholesterol khác, như hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm nhựa cô lập muối mật (ví dụ, cholestyramin, cholestipol, và cholestyramin hydroclorua), chất ức chế HMGCoA-reductaza (ví dụ, lovastatin, cerivastatin, pravastatin, atorvastatin, simvastatin, rosuvastatin, và fluvastatin), axit nicotinic, các dẫn xuất axit fibric (ví dụ, clofibrat, gemfibrozil, fenofibrat, bezafibrat, và ciprofibrat), probucol, neomycin, dextrothyroxin, este thực vật-stanol, chất ức chế hấp thu cholesterol (ví dụ, ezetimib), imipitapit, chất ức chế các chất truyền axit mật (chất truyền axit mật phụ thuộc vào natri đỉnh), chất điều hòa CYP7a gan, chất trị liệu thay thế estrogen (ví dụ, tamoxifen), và các chất kháng viêm (ví dụ, glucocorticoid). Các tổ hợp với statin có thể đặc biệt được ưu tiên.

Các phương án cụ thể của sáng chế

1. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa chứa

- a. oligome đối nghĩa (A) có chiều dài 12 đến 22 nucleotit, chứa trình tự liên kề có 10 đến 16 nucleotit mà bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 30 hoặc 31 hoặc 32 hoặc 33 hoặc 34 hoặc 45, và
- b. ít nhất một gốc liên hợp không phải nucleotit hoặc không phải polynucleotit (C) liên kết cộng hóa trị với oligome này (A).

2. Thẻ liên hợp oligonucleotit theo phương án 1, trong đó oligome đối nghĩa chứa trình tự liên kế được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO 25, 26, 27, 28, 29 và 44.
3. Thẻ liên hợp oligonucleotit theo phương án 1 hoặc 2, trong đó oligome đối nghĩa nhắm đích PCSK9.
4. Thẻ liên hợp oligonucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó oligome đối nghĩa chứa các thẻ tương đồng nucleotit tăng cường ái lực.
5. Thẻ liên hợp oligonucleotit theo phương án 4, trong đó các thẻ tương đồng nucleotit là nucleotit được cải biến đường, như nucleotit được cải biến đường độc lập hoặc phụ thuộc được chọn từ nhóm bao gồm: đơn vị axit nucleic (LNA) bị khóa; đơn vị 2'-O-alkyl-ARN, đơn vị 2'-OMe-ARN, đơn vị 2'-amino-ADN, và đơn vị 2'-flo-ADN.
6. Thẻ liên hợp oligonucleotit theo phương án 4 hoặc 5, trong đó các thẻ tương đồng nucleotit chứa hoặc là đơn vị axit nucleic (LNA) bị khóa.
7. Thẻ liên hợp oligonucleotit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 6, trong đó oligome đối nghĩa là gapme.
8. Thẻ liên hợp oligonucleotit theo phương án 7, trong đó gapme chứa viền ở mỗi bên (5' và 3') của 2 đến 4 thẻ tương đồng nucleotit, tốt hơn là các chất tương tự LNA.
9. Thẻ liên hợp oligonucleotit theo phương án 7 hoặc 8, trong đó thiết kế gapme được chọn từ nhóm bao gồm 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-2, 2-8-4, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 2-10-2, 2-10-3, 3-10-2, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 2-11-2, 2-11-3, 3-11-2, 3-11-3, 3-11-4, 4-11-3 và 4-11-4.
10. Thẻ liên hợp oligonucleotit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 7 đến 9, trong đó thiết kế gapme được chọn từ nhóm bao gồm 2-8-3, 3-8-3, 3-9-4, 3-10-3, 2-11-2, 2-11-3 và 3-11-2.
11. Thẻ liên hợp oligonucleotit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 10, trong đó oligome chứa trình tự liên kế có 13, 14, 15 hoặc 16 nucleotit.
12. Thẻ liên hợp oligonucleotit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 11, trong đó oligome chứa một hoặc nhiều liên kết nucleosit được chọn từ nhóm bao gồm phosphothioat, phosphodithioat và boranophosphat.
13. Thẻ liên hợp oligonucleotit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 12, trong đó oligome chứa hoặc gồm có liên kết phosphothioat nucleosit.

14. Thể liên hợp oligonucleotit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 12, trong đó oligome chứa trình tự liên kế được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, và 8.
15. Thể liên hợp oligonucleotit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14, trong đó gốc liên hợp (C) được chọn từ nhóm bao gồm hoặc cacbon hydrat, như GalNAc hoặc nhóm GalNAc; nhóm ưa chất béo, như lipid, axit béo; sterol, như cholesterol hoặc tocopherol; hoặc statin.
16. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 15, trong đó gốc liên hợp (C) làm tăng cường sự phân phối và/hoặc hấp thu đến các tế bào ở gan.
17. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 16, trong đó gốc liên hợp (C) chứa sterol như tocopherol, cholesterol, như các gốc được thể hiện là Conj 5, Conj 5, Conj 6 hoặc Conj 6a.
18. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo phương án 1 đến 16, trong đó gốc liên hợp (C) chứa cacbon hydrat như GalNAc hoặc GalNAc hóa trị ba, như các gốc liên hợp được thể hiện là Conj 1, 2, 3 hoặc 4, hoặc 1a, 2a, 3a hoặc 4a.
19. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo phương án 18, trong đó gốc liên hợp (C) chứa Conj 2a.
20. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 19, mà được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, và 24.
21. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 20, trong đó oligome đối nghĩa (A) được liên hợp với gốc liên hợp (C) thông qua vùng liên kết nằm ở giữa trình tự liên kế của oligome và gốc liên hợp (B và/hoặc Y).
22. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo phương án 21, trong đó thành phần liên kết được chọn từ nhóm bao gồm các thành phần liên kết amino alkyl, các thành phần liên kết phosphat nucleotit và các thành phần liên kết peptit.
23. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo phương án 21 hoặc 22, trong đó thành phần liên kết được chọn từ nhóm C6 đến C12 amino alkyl.

24. Thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo phương án 21 hoặc 22, trong đó thành phần liên kết là thành phần liên kết phosphat nucleotit phân tách sinh học chứa 1 đến 6 nucleotit.
25. Thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 21 đến 24, trong đó thành phần liên kết (B) là liên kết phosphodiester nucleotit chứa một hoặc nhiều phosphodiester nucleotit ADN liên kề, như 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 phosphodiester nucleotit ADN mà liên kề với đầu 5' hoặc 3' của trình tự liên kề của oligome, và mà có thể hoặc không thể tạo ra cặp bazơ bổ trợ đối với trình tự đích PCSK9.
26. Thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo phương án 24 hoặc 25, trong đó liên kết phosphodiester nucleotit (hoặc thành phần liên kết phân tách sinh học) chứa 1, 2 hoặc 3 phosphodiester nucleotit ADN, như hai phosphodiester nucleotit ADN, như 5' CA 3' dinucleotit.
27. Oligome có chiều dài 12 đến 22 nucleotit, chứa
 - a. trình tự liên kề có 16 nucleotit mà bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 31, hoặc
 - b. trình tự liên kề có 10 đến 16 nucleotit mà bổ trợ với đoạn có chiều dài tương ứng của SEQ ID NO 33 hoặc 34 hoặc 45.
28. Oligome theo phương án 27, mà chứa trình tự liên kề được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO 26, 27, 28, 29 và 44.
29. Oligome theo phương án bất kỳ trong số các phương án 27 hoặc 28, trong đó oligome nhắm đích PCSK9.
30. Oligome theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 27 đến 29, trong đó trình tự liên kề chứa các thẻ tương đồng nucleotit tăng cường ái lực.
31. Oligome theo phương án 30, trong đó các thẻ tương đồng nucleotit là nucleotit được cải biến đường, như nucleotit được cải biến đường độc lập hoặc phụ thuộc được chọn từ nhóm bao gồm: đơn vị axit nucleic (LNA) bị khóa; đơn vị 2'-O-alkyl-ARN, đơn vị 2'-OMe-ARN, đơn vị 2'-amino-ADN, và đơn vị 2'-flo-ADN.
32. Oligome theo phương án 30 hoặc 31, trong đó các thẻ tương đồng nucleotit chứa hoặc là đơn vị axit nucleic (LNA) bị khóa.
33. Oligome theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 27 đến 32, mà là gapme, như oligonucleotit của gapme axit nucleic bị khóa.

34. Thễ liên hợp oligonucleotit theo phương án 33, trong đó gapme chứa viền ở mỗi bên (5' và 3') của 2 đến 4 thễ tương đồng nucleotit, tốt hơn là các chất tương tự LNA.
35. Thễ liên hợp oligonucleotit theo phương án 33 hoặc 34, trong đó thiết kế gapme được chọn từ nhóm bao gồm 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-2, 2-8-4, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 2-10-2, 2-10-3, 3-10-2, 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 2-11-2, 2-11-3, 3-11-2, 3-11-3, 3-11-4, 4-11-3 và 4-11-4.
36. Thễ liên hợp oligonucleotit theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 33 đến 35, trong đó thiết kế gapme được chọn từ nhóm bao gồm 2-8-3, 3-8-3, 3-9-4, 3-10-3, 2-11-2, 2-11-3 và 3-11-2.
37. Oligome theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 27 đến 36, trong đó oligome chứa trình tự liên kế có 13, 14, 15 hoặc 16 nucleotit.
38. Oligome theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 27 đến 37, trong đó oligome chứa một hoặc nhiều liên kết nucleosit được chọn từ nhóm bao gồm phosphothioat, phosphodithioat và boranophosphat.
39. Oligome theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 27 đến 38, trong đó oligome chứa hoặc gồm có liên kết phosphothioat nucleosit.
40. Oligome theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 27 đến 38, mà chứa trình tự liên kế được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO 2, 3, 4, 5, 6, 7, và 8.
41. Dược phẩm chứa oligome hoặc thễ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 40 và chất pha loãng, chất mang, muối hoặc chất bổ trợ dược dụng.
42. Oligome hoặc thễ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa hoặc dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 41, để sử dụng để bào chế dược phẩm, như để điều trị bệnh tăng cholesterol huyết hoặc rối loạn liên quan, như rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh xơ vữa động mạch, bệnh tăng lipit huyết, bệnh tăng cholesterol huyết, bệnh tăng cholesterol huyết di truyền, ví dụ, thu được các đột biến chức năng trong PCSK9, chứng mất cân bằng HDL/LDL cholesterol, bệnh rối loạn mỡ máu, ví dụ, bệnh tăng lipit huyết di truyền (FCHL) hoặc bệnh tăng cholesterol huyết di truyền (FHC), bệnh tăng lipit huyết mắc phải, bệnh tăng cholesterol huyết kháng statin, bệnh động mạch vành (CAD), và bệnh tim mạch vành (CHD).

43. Sử dụng oligome hoặc thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa hoặc được phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 41, để sản xuất được phẩm để điều trị bệnh tăng cholesterol huyết hoặc rối loạn liên quan, như rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh xơ vữa động mạch, bệnh tăng lipit huyết, bệnh tăng cholesterol huyết, bệnh tăng cholesterol huyết di truyền, ví dụ, thu được các đột biến chức năng trong PCSK9, chứng mất cân bằng HDL/LDL cholesterol, bệnh rối loạn mỡ máu, ví dụ, bệnh tăng lipit huyết di truyền (FCHL) hoặc bệnh tăng cholesterol huyết di truyền (FHC), bệnh tăng lipit huyết mắc phải, bệnh tăng cholesterol huyết kháng statin, bệnh động mạch vành (CAD), và bệnh tim mạch vành (CHD).
44. Phương pháp điều trị bệnh tăng cholesterol huyết hoặc rối loạn liên quan, như rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh xơ vữa động mạch, bệnh tăng lipit huyết, bệnh tăng cholesterol huyết, bệnh tăng cholesterol huyết di truyền ví dụ, thu được các đột biến chức năng trong PCSK9, chứng mất cân bằng HDL/LDL cholesterol, bệnh rối loạn mỡ máu, ví dụ, bệnh tăng cholesterol huyết di truyền (FHC), bệnh tăng lipit huyết mắc phải, bệnh tăng cholesterol huyết kháng statin, bệnh động mạch vành (CAD), và bệnh tim mạch vành (CHD), phương pháp này bao gồm việc sử dụng lượng hữu hiệu oligome hoặc thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa hoặc được phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 41, cho bệnh nhân mắc, hoặc có thể mắc bệnh tăng cholesterol huyết hoặc rối loạn liên quan.
45. Phương pháp in vivo hoặc in vitro để ức chế PCSK9 trong tế bào mà biểu hiện PCSK9, phương pháp này bao gồm việc sử dụng oligome hoặc thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa hoặc được phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 41, vào tế bào sao cho để ức chế PCSK9 trong tế bào này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Oligonucleotit được tổng hợp trên bộ đỡ toàn phần uridin bằng cách sử dụng phương pháp phosphoramidit trên bộ phận tổng hợp Expedite 8900/MOSS (Hệ đa tổng hợp oligonucleotit) hoặc bộ phận tạo oligome Oligomaker 48 ở phạm vi 4 hoặc 1 μ mol, một cách lần lượt. Kết thúc tổng hợp, các oligonucleotit được phân tách từ bộ đỡ dạng rắn bằng cách sử dụng amoniac chứa nước trong thời gian từ 5 đến 16 giờ ở nhiệt độ 60°C. Các oligonucleotit được tinh chế bằng HPLC pha đảo (RP-HPLC) hoặc bằng cách chiết pha rắn và được đặc trưng bởi UPLC, và khối lượng phân tử còn được xác nhận bởi ESI-MS. Xem chi tiết hơn dưới đây.

Sự kéo dài oligonucleotit

Sự bắt cặp β -xyanoethyl- phosphoramidit (ADN-A(Bz), ADN- G(ibu), ADN- C(Bz), ADN-T, LNA-5-metyl-C(Bz), LNA-A(Bz), LNA- G(dmf), LNA-T hoặc C6-S-S-C6 thành phần liên kết) được tiến hành bằng cách sử dụng dung dịch chứa 0,1M amidit được bảo vệ 5'-O-DMT trong axetonitril và DCI (4,5-dixyanoimidazol) trong axetonitril (0,25M) để làm chất hoạt hóa. Trong chu kỳ cuối cùng, cholesterol phosphoramidit được liên kết C6 có bán trên thị trường được sử dụng ở 0,1M trong DCM. Tiến hành thiol hóa để đưa liên kết phosphorthioat vào bằng cách sử dụng xanthan hydrua (0,01M trong axetonitril/pyridin 9:1). Các liên kết phosphordiester được đưa vào bằng cách sử dụng iot 0,02M trong THF/Pyridin/nước 7:2:1. Phần còn lại của các chất phản ứng là các chất phản ứng thường được sử dụng để tổng hợp oligonucleotit. Đối với thể liên hợp tổng hợp sau pha rắn, phosphoramidit liên kết C6 amino có bán trên thị trường được sử dụng trong chu kỳ cuối cùng của quá trình tổng hợp pha rắn và sau đó khử bảo vệ và phân tách từ bộ đỡ dạng rắn, oligonucleotit được khử bảo vệ amino liên kết được phân lập. Thể liên hợp được đưa vào thông qua sự hoạt hóa của nhóm chức bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp chuẩn.

Tinh chế bằng RP-HPLC:

Các hợp chất thô được tinh chế bằng RP-HPLC điều chế trên Phenomenex Jupiter cột C18 10 μ 150x10mm. Amoni axetat 0,1M pH 8 và axetonitril được sử dụng để làm dung dịch đệm với tốc độ chảy là 5mL/phút. Các phân đoạn đã được gom được làm khô lạnh để thu được hợp chất tinh chế thường ở dạng chất rắn màu trắng.

Các chữ viết tắt:

DCI: 4,5-Dixyanoimidazol

DCM: Diclometan

DMF: Dimetylformamit

DMT: 4,4'-Dimetoxyltrityl

THF: Tetrahydrofuran

Bz: Benzoyl

Ibu: Isobutyryl

RP-HPLC: Sắc ký lỏng cao áp pha đảo

Các hợp chất được tổng hợp được thể hiện trong Bảng 1 và cũng được minh họa trên các hình vẽ.

Ví dụ 1: Phát hiện ra mô típ đích PCSK9 mới

521 oligonucleotit đối nghĩa kháng PCSK9 – tất cả với ba axit nucleic bị khóa nằm bên sườn ngoài ADN, tức là với thiết kế gapme 16-mer LNA - đặc hiệu đối với PCSK9 của người và động vật linh trưởng được thiết kế và tổng hợp. Dòng tế bào người 15PC3 được ủ trong ba ngày với mẫu mô phỏng hoặc oligonucleotit được cải biến axit nucleic bị khóa được nhắm đích đến PCSK9 người ở nồng độ 0,3 μ M. Mỗi oligonucleotit kháng PCSK9 được thử nghiệm trong ba thử nghiệm độc lập. Mức độ ARN thông tin PCSK9 được định lượng từ ARN được chiết bằng cách sử dụng PCR thời gian thực như được mô tả, và được cho chuẩn hóa với ARN thông tin β -actin và tương quan với mức độ trung bình trong mười hai mẫu được xử lý mô phỏng trên Fig. 8, với phân tử lân cận của tập hợp con các phân tử hiệu nghiệm nhất trên Fig. 9.

Ví dụ 2: Giảm ARN thông tin in vitro

Dòng tế bào người 15PC3 được ủ trong 3 ngày với mẫu mô phỏng hoặc oligonucleotit được cải biến axit nucleic bị khóa với SEQ ID 1 đến 8 được nhắm đích đến PCSK9 người ở nồng độ 0,0012, 0,06, 0,3 và 1,5 μ M. Mức độ ARN thông tin PCSK9 được định lượng từ ARN đã được chiết bằng cách sử dụng PCR thời gian thực như được mô tả, và được cho tương quan với các mức độ trung bình trong bốn mẫu được xử lý mô phỏng trên Fig. 10. Đối với mỗi oligonucleotit, tính hiệu nghiệm, được định lượng là nồng độ hữu hiệu bán tối đa (EC₅₀), được xác định bằng cách bình phương tối thiểu phù hợp với đẳng thức Hill trong dạng logic hai tham số với cận dưới được cố định là 0% và cận trên được cố định là 100%, như EC₅₀ = lượng ước tính $\pm$ độ lệch chuẩn.

Ví dụ 3: Mức độ ALT in vivo

Chuột nhắt cái bốn tuần tuổi NMRI (Taconic, Denmark), cân nặng khoảng 20g lúc mới sinh, được tiêm trong tĩnh mạch một lần với nước muối hoặc oligonucleotit được cải biến axit nucleic bị khóa, được liên hợp cholesterol với SEQ ID 9 đến 16 được nhắm đích đến PCSK9 người ở liều lượng 7,5 và 15mg/kg. Chuột nhắt này được giết sau 7 ngày dùng và mức độ huyết thanh của alanin aminotransferaza (ALT) được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym (Horiba ABX Diagnostics). Đối với mỗi nhóm xử lý năm con, độ lệch trung bình và độ lệch chuẩn được tính và được thể hiện trên Fig. 11 tương quan với các mức độ trung bình trong chuột nhắt được điều trị bằng nước muối. Sự tăng ALT được ghi lại ở cả hai nồng độ đối với một số, nhưng không phải tất cả, phân tử được liên hợp cholesterol. Một vài hợp chất, như SEQ ID NO 9 và 10, không

làm tăng cường ALT ở chuột nhất theo cách có ý nghĩa về mặt lâm sàng ngay cả khi cholesterol được sử dụng làm nhóm liên hợp để làm tăng cường sự hấp thu các hợp chất trong gan.

Ví dụ 4: Nghiên cứu động vật linh trưởng không phải người

Đối tượng động vật linh trưởng đối với nghiên cứu này là để nghiên cứu các chất tạo lipit được chọn trong 7 tuần sau một liều tiêm bolus chậm hợp chất LNA kháng PCSK9 vào khỉ cynomolgus và đánh giá tính độc tiềm tàng của hợp chất này ở khỉ. Các hợp chất được sử dụng trong nghiên cứu này là SEQ ID NO 10, 13, 18, 19, 20 & 21, được điều chế trong nước muối vô trùng (0,9%) ở nồng độ ban đầu là 0,625 và 2,5mg/ml).

Khỉ đực ít nhất 24 tháng tuổi được sử dụng, và có sự tiếp cận tự do với nước máy và 180g chế độ ăn mở rộng MWM(E) SQC SHORT (Dietex France, chênh lệch tiêu chuẩn S, Saint Gratien, France) được phân bổ hằng ngày cho từng con. Tổng lượng thức ăn được phân bổ trong mỗi lồng sẽ được tính theo số lượng con vật trong lồng vào ngày đó. Ngoài ra, trái cây hoặc rau được cung cấp cho từng con hằng ngày. Mỗi con vật được làm thích nghi với môi trường để nghiên cứu các tình trạng bệnh lý trong thời gian ít nhất 14 ngày trước khi bắt đầu giai đoạn điều trị. Trong giai đoạn này, các nghiên cứu trước điều trị được tiến hành. Các con vật được định liều trong tĩnh mạch ở liều đơn là 0,25, 1,0 hoặc 2,5mg/kg (SEQ ID NO 10, 13, 18, và 21) hoặc ở liều đơn là 1,0 hoặc 2,5mg/kg (SEQ ID NO 19 và 20). Thể tích liều là 0,4mL/kg. Mỗi nhóm sử dụng 2 con vật.

Dạng phối trộn theo liều lượng được sử dụng một lần vào ngày 1. Các con vật được quan sát trong thời gian 7 tuần sau khi điều trị, và được thả ra khỏi nghiên cứu vào ngày 51. Ngày 1 tương ứng với ngày thứ nhất của giai đoạn điều trị. Các quan sát lâm sàng và trọng lượng cơ thể và sự hấp thụ thức ăn (trong mỗi nhóm) sẽ được ghi lại trước và trong nghiên cứu.

Máu được lấy mẫu và các phân tích được tiến hành ở các thời điểm sau:

Ngày nghiên cứu	Thông số
-8	RCP, L, Apo-B, PCSK9*, OA
-1	L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
1	Định liều
4	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, OA

8	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
15	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
22	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
29	L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
36	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
43	L, PK, Apo-B, PCSK9* PK, OA
50	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA

RCP (routine clinical pathology) 0 bệnh học lâm sàng thường ngày, LSB = an toàn hóa sinh gan, PK = dược động học, OA = các phân tích khác, L = Lipit.

Các thông số sau được xác định đối với tất cả các con vật sống sót ở các thời điểm được chỉ ra dưới đây:

- Bảng hóa sinh đầy đủ (toàn bộ danh sách dưới đây) - vào Ngày -8, 15 và 50,
- Độ an toàn ở gan (ASAT, ALP, ALAT, TBIL và chỉ GGT) - vào Ngày 4, 8, 22 và 36,
- Profin lipit (tổng cholesterol, HDL-C, LDL-C và Triglyxerit) và chỉ Apo-B - vào Ngày -1, 4, 8, 22, 29, 36, và 43.

Máu (khoảng 1,0mL) được đưa vào ống lithi heparin (bằng cách sử dụng máy phân tích hóa sinh máu ADVIA 1650): Apo-B, natri, kali, clorua, canxi, phospho vô cơ, glucoza, HDL-C, LDL-C, ure, creatinin, tổng bilirubin (TBIL), tổng cholesterol, triglyxerit, phosphataza kiềm (ALP), alanin aminotransferaza (ALAT), aspartat aminotransferaza (ASAT), creatin kinaza, gamma-glutamyl transferaza (GGT), lactat dehydrogenaza, tổng protein, albumin, tỷ lệ albumin/globulin.

Phân tích PCSK9 trong máu: Các mẫu máu để phân tích PCSK9 được gom từ Ngày -8, -1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43 và 50. Máu tĩnh mạch (khoảng 2mL) được gom từ tĩnh mạch thích hợp trong từng con vật vào ống tách huyết thanh (Serum Separating Tube-SST) và cho phép đông cục trong ít nhất 60 ± 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Máu được ly tâm ở tốc độ 10000 m/s^2 trong 10 phút trong các điều kiện làm lạnh (thiết lập để duy trì nhiệt độ $+4^\circ\text{C}$). Huyết thanh này được truyền vào 3 ống riêng biệt và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi được phân tích ở CitoxLAB France bằng cách sử dụng phương pháp ELISA (bộ kit Circulex PCSK9 human ELISA, CY-8079, được phê chuẩn đối với các mẫu từ khỉ cynomolgus).

Các phân tích khác: WO 2011009697 đề xuất phương pháp dùng cho các phân tích sau: qPCR, phân tích ARN thông tin PCSK9. Các phân tích khác bao gồm protein PCSK9 ELISA, phân tích Lp(a) huyết thanh với ELISA (Mercodia No. 10-1106-01), phân tích oligonucleotit trong mô và huyết tương (hàm lượng thuốc), chiết các mẫu, mẫu tiêu chuẩn - và mẫu QC, xác định hàm lượng oligonucleotit bằng ELISA.

Dữ liệu của các hợp chất nhắm đích PCSK9 được thể hiện trong bảng sau:

Trị số đối với liều lượng 2,5mg/kg			Tác dụng PCSK9 tối đa (dữ liệu biểu hiện phần trăm liều lượng sơ bộ)	Tác dụng LDL-C tối đa (dữ liệu biểu hiện phần trăm liều lượng sơ bộ)
Hợp chất SEQ ID	PCSK9 protein ngày 4 (phần trăm liều lượng sơ bộ)	PCSK9 protein ngày 29 (phần trăm liều lượng sơ bộ)		
10	86	71,5	69% (d15)	87% (d29)
13	81	71	71% (d29)	84% (d22)
18	57	42	42% (d29)	71% (d15)
21	80,5	56	55% (d29)	84% (d15)
20	51	53	48% (d4)	94% (D8)
19	55	60	55% (d4)	89% (D4)

Không có chỉ định về tính độc hại gan hoặc tính độc hại thận với hợp chất nhắm đích PCSK9. Đáng chú ý là, hợp chất PCSK9-GalNAc tạo ra sự giảm điều hòa hiệu quả cao và nhanh của PCSK9 mà được duy trì trong khoảng thời gian kéo dài (toàn bộ độ dài nghiên cứu), minh họa rằng hợp chất được liên hợp GalNAc hữu hiệu hơn, cả về sự giảm ban đầu nhanh, và thời gian dài, chỉ ra rằng chúng có thể được định liều tương đối thường xuyên và ở liều lượng thấp hơn, như so với cả hợp chất gốc không được liên hợp, và hợp chất sử dụng kỹ thuật liên hợp thay thế, như liên hợp cholesterol. SEQ ID NO 18 tạo ra sự giảm điều hòa nhanh và thích hợp của PCSK9 và LDL-C trong suốt thời gian nghiên cứu (được quan sát vào ngày 34 ở liều lượng 2,5mg/kg, với sự giảm điều hòa PCSK9 đáng chú ý được quan sát sau 48 ngày dùng liều lượng đơn 2,5mg/kg mà mức độ protein PCSK9 huyết tương là 71% liều lượng sơ bộ).

Ví dụ 5: Đánh giá tính độc gan và thận ở chuột cống.

Hợp chất theo sáng chế có thể được đánh giá về profin tính độc ở các loại gặm nhấm, như ở chuột nhắt hoặc chuột cống. Phương pháp chuẩn sau có thể được sử dụng: Wistar Han Crl:WI(Han) được sử dụng ở độ tuổi khoảng 8 tuần tuổi. Ở độ tuổi này, các con đực có cân nặng khoảng 250g. Tất cả các con vật được tự do tiếp cận với chế độ ăn duy trì dạng viên SSNIFF R/M-H (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) và nước máy (được lọc bằng máy lọc 0,22 μ m) được chứa trong các chai. Mức độ liều lượng là 10 và 40mg/kg/liều được sử dụng (sử dụng dưới da) và được định liều vào ngày 1 và 8. Các con vật được trợ tử vào Ngày 15. Mẫu nước tiểu và mẫu máu được gom vào ngày 7 và 14. Tiến hành đánh giá bệnh học lâm sàng vào ngày 14. Trọng lượng cơ thể được xác định trước nghiên cứu, vào ngày dùng thứ nhất, và 1 tuần trước khi mổ tử thi. Sự tiêu thụ thức ăn trong mỗi nhóm được đánh giá hằng ngày. Mẫu máu được lấy thông qua tĩnh mạch đuôi sau 6 giờ nhịn đói. Việc phân tích huyết thanh máu sau được tiến hành: số lượng hồng cầu, thể tích trung bình tế bào, thể tích tế bào được đóng gói, hemoglobin, nồng độ hemoglobin tế bào trung bình, số lượng tiểu cầu, số lượng bạch cầu, số lượng tế bào trắng biệt hóa với hình thái học tế bào, số lượng tế bào lưới, natri, kali, clorua, canxi, phospho vô cơ, glucoza, ure, creatinin, tổng bilirubin, tổng cholesterol, triglyxerit, phosphataza kiềm, alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, tổng protein, albumin, tỷ lệ albumin/globulin. Tiến hành xét nghiệm nước tiểu: α -GST, β -2 vi globulin, Calbindin, Clusterin, xystatin C, KIM-1, Osteopontin, TIMP-1, VEGF, và NGAL. Bảy chất phân tích (Calbindin, Clusterin, GST- α , KIM-1, Osteopontin, TIMP-1, VEGF) được định lượng trong Bảng 1 (MILLIPLEX® MAP Rat Kidney Toxicity Magnetic Bead Panel 1, RKTIX1MAG-37K). Ba chất phân tích (β -2 Microglobulin, xystatin C, Lipocalin-2/NGAL) được định lượng trong Bảng 2 (MILLIPLEX® MAP Rat Kidney Toxicity Magnetic Bead Panel 2, RKTIX2MAG-37K). Thử nghiệm để xác định các nồng độ của chỉ thị sinh học trong nước tiểu chuột cống là dựa trên công nghệ Luminex xMAP®. Các vi cầu được phủ kháng thể kháng α -GST / β -2 vi globulin / calbindin / clusterin / xystatin C / KIM-1 / osteopontin / TIMP-1 / VEGF / NGAL được mã hóa bằng màu với hai thuốc nhuộm huỳnh quang khác nhau. Các thông số sau được xác định (nước tiểu bằng cách sử dụng ADVIA 1650): protein nước tiểu, creatinin nước tiểu. Các thông số định lượng: thể tích, pH (bằng cách sử dụng băng thử nghiệm 10-Multistix SG/máy phân tích nước tiểu

Clinitek 500), trọng lực cụ thể (bằng cách sử dụng máy đo khúc xạ). Các thông số bán định lượng (bằng cách sử dụng băng thử nghiệm 10-Multistix SG/máy phân tích nước tiểu Clinitek 500): protein, glucoza, keton, bilirubin, nitrit, máu, urobilinogen, tế bào học của cặn (bằng cách kiểm tra bằng kính hiển vi). Các thông số chất lượng: về bên ngoài, màu. Sau khi giết, trọng lượng cơ thể và trọng lượng thận, gan và lá lách được xác định và tỷ lệ cơ quan với trọng lượng cơ thể được tính. Các mẫu thận và gan được lấy và được làm đông hoặc bảo quản trong formalin. Tiến hành các phân tích bằng kính hiển vi. Dữ liệu về sự biểu hiện Kim-1 được thể hiện trên Fig. 15, mà chứng minh rằng tất cả các phân tử ngoại trừ SEQ ID NO 4 có tín hiệu kim-1 trong nước tiểu thấp hơn so với SEQ ID NO 1, chứng minh sự an toàn ở thận được cải thiện so với phân tử gốc và không được liên hợp được được đặc trưng trước đó.

Ví dụ 6: Phân tích các thành phần liên kết phân tách được

Oligome đối nghĩa được đánh dấu FAM (ASO) với các thành phần liên kết ADN/PO khác nhau được đưa vào quá trình phân tách in vitro trong phân chiết S1 nucleaza (bảng dưới đây), thể đồng nhất gan hoặc thận hoặc huyết thanh.

Số	Seq (5'-3')	Thành phần liên kết phân tách được (B)	Thể liên hợp (C)
35	GCattggtatTCA	3PO-ADN (5'tca3')	FAM
36	GCattggtatTCA	2PO-ADN (5'ca3')	FAM
37	GCattggtatTCA	1PO-ADN (5'a3')	FAM
38	GCattggtatTCA	3PO-ADN (5'gac3')	FAM
39	GCattggtatTCA	không	FAM

Các chữ viết hoa là nucleosit LNA (như beta-D-oxy LNA), các chữ viết thường là nucleosit ADN. Các chỉ số dưới là liên kết giữa các nucleosit phosphothioat. Xytosin LNA tùy ý là 5-metyl xytosin. Gốc liên hợp FAM được thể hiện trên Fig. 6 và các phân tử được thể hiện trên Fig. 7.

ASO được đánh dấu FAM 100 μ M với các thành phần liên kết ADN/PO khác nhau được đưa vào phân tách in vitro bằng S1 nucleaza trong dung dịch đệm nucleaza (60 U cho mỗi 100 μ L) trong 20 và 120 phút (A). Ngừng hoạt tính enzym bằng cách bổ sung EDTA vào dung dịch đệm. Sau đó, các dung dịch được đưa vào phân tích AIE HPLC trên Dionex Ultimate 3000 bằng cách sử dụng cột Dionex DNAPac p-100 và gradien nằm trong khoảng từ 10mM đến 1M natri perclorat ở độ pH = 7,5. Hàm lượng

oligonucleotit được phân tách và không được phân tách được xác định dựa trên tiêu chuẩn bằng cách sử dụng cả máy dò huỳnh quang ở 615nm và máy dò uv ở 260nm.

SEQ ID NO	Thành phần liên kết trình tự	% phân tách sau 20 phút S1	% phân tách sau 120 phút S1
39	--	2	5
37	a	29,1	100
36	ca	40,8	100
35	tca	74,2	100
38	gac	22,9	không xác định

Kết luận: Các thành phần liên kết PO (hoặc vùng B như được đề cập trong bản mô tả) làm phân tách thể liên hợp (hoặc nhóm C), và cả chiều dài và/hoặc chế phẩm trình tự của thành phần liên kết có thể được sử dụng để điều biến tính nhạy đối với sự phân tách phân giải nucleotit của vùng B. Trình tự của các thành phần liên kết ADN/PO có thể điều biến tốc độ phân tách như được quan sát sau 20 phút trong phần chiết Nucleaza S1. Do đó, việc chọn lọc trình tự cho vùng B (ví dụ, cho thành phần liên kết ADN/PO) có thể cũng được sử dụng để điều biến mức độ phân tách trong huyết thanh và trong các tế bào của mô đích.

Các thể đồng nhất gan và thận và huyết thanh được làm tăng với hợp chất SEQ ID NO 35 đến nồng độ là 200µg/g mô. Các mẫu gan và thận được gom từ chuột nhắt NMRI được đồng nhất trong dung dịch đệm đồng nhất hóa (0,5% Igepal CA-630, 25mM Tris pH 8,0, 100mM NaCl, pH 8,0 (được điều chỉnh với 1N NaOH)). Các thể đồng nhất được ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C và sau đó các thể đồng nhất này được chiết bằng phenol - clorofom. Hàm lượng oligo được phân tách và không được phân tách oligo trong phần chiết từ gan và thận và từ huyết thanh được xác định dựa vào tiêu chuẩn bằng cách sử dụng phương pháp HPLC nêu trên:

Seq ID	Trình tự thành phần liên kết	% được phân tách sau 24 giờ trong thể đồng nhất gan	% được phân tách sau 24 giờ trong thể đồng nhất thận	% được phân tách sau 24 giờ trong huyết thanh
35	tca	83	95	0

Kết luận: Các thành phần liên kết PO (hoặc vùng B như được đề cập trong bản mô tả) dẫn đến việc thể liên hợp (hoặc nhóm C) được phân tách, trong thể đồng nhất gan hoặc thận, nhưng không trong huyết thanh. Tính nhạy với sự phân tách trong các thử nghiệm được thể hiện trong ví dụ 6 có thể được sử dụng để xác định liệu rằng thành phần liên kết là phân tách sinh học được hay không bền về mặt sinh lý. Lưu ý rằng sự phân tách trong các thử nghiệm nêu trên được dùng để chỉ sự phân tách của thành phần liên kết phân tách được, oligome hoặc vùng A nên duy trì sự nguyên vẹn chức năng.

Ví dụ 7: Sự giảm ARN thông tin PCSK9 với thể liên hợp cholesterol in vivo

PCSK9 - Hợp chất đặc hiệu ở chuột nhắt

Số	Seq (5'-3') (A)	Thành phần liên kết phân tách được (B)	Thể liên hợp (C)
40	GTctgtggaaGCG	không	không
41	GTctgtggaaGCG	không	Cholesterol
42	GTctgtggaaGCG	2PO-ADN (5'ca3')	Cholesterol
43	GTctgtggaaGCG	2PO-ADN (5'ct3')	Cholesterol

Chuột nhắt NMRI được tiêm nước muối liều đơn hoặc 10mg/kg oligonucleotit đối nghĩa LNA không được liên hợp (SEQ ID 40) hoặc lượng đẳng mol của oligonucleotit đối nghĩa LNA được liên hợp với Cholesterol với các thành phần liên kết khác và bị giết vào ngày 1-10 theo Bảng 5.

ARN được phân lập từ gan và thận và được đưa vào qPCR với đoạn mồi đặc hiệu PCSK9 và thí nghiệm để phân tích về sự giảm ARN thông tin PCSK9. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 14.

Kết luận: Cholesterol được liên hợp với oligonucleotit đối nghĩa LNA PCSK9 với thành phần liên kết gồm có 2 ADN với mạch chính phosphodiester (SEQ ID NO 42 và SEQ ID NO 43) thể hiện sự giảm PCSK9 ở gan được tăng cường (Fig. 14) so với hợp chất không được liên hợp (SEQ ID NO 40), cũng như như so với thể liên hợp cholesterol với thành phần liên kết ổn định (SEQ ID NO 41).

Vật liệu và phương pháp:

Thiết kế thử nghiệm:

Phần	Nhóm số	Id động vật số	Số động vật	Giống / giới tính/thức ăn động vật	Mức độ liều lượng hợp chất mỗi ngày	Nồng độ ở thể tích liều lượng 10 ml/kg	Đường dùng	Ngày định liều	Trọng lượng cơ thể ngày	Ngày giết
A	1	1-3	3	NMRI/♀/Chow	Nước muối	-	trong tĩnh mạch	0	0, 1	1
	2	4-6	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 40 10mg/kg	1 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 1	1
	3	7-9	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 41 đẳng mol 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 1	1
	5	13-15	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 42 đẳng mol 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 1	1
	6	16-18	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 43 đẳng mol 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 1	1
B	7	19-21	3	NMRI/♀/Chow	Nước muối	-	trong tĩnh mạch	0	0, 3	3
	8	22-24	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 40 10mg/kg	1 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 3	3
	9	25-27	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 41 đẳng mol 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 3	3
	11	31-33	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 42	1,27 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 3	3

Phần	Nhóm số	Id động vật số	Số động vật	Giống / giới tính/thức ăn động vật	Mức độ liều lượng hợp chất mỗi ngày	Nồng độ ở thể tích liều lượng 10 ml/kg	Đường dùng	Ngày định liều	Trọng lượng cơ thể ngày	Ngày giết
					đăng mol 12,7mg/kg					
	12	34-36	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 43 đăng mol 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 3	3
C	13	37-39	3	NMRI/♀/Chow	Nước muối	-	trong tĩnh mạch	0	0, 7	7
	14	40-42	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 40 10mg/kg	1 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 7	7
	15	43-45	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 41 đăng mol 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 7	7
	17	49-51	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 42 đăng mol 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 7	7
	18	52-54	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 43 đăng mol 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 7	7
D	19	55-57	3	NMRI/♀/Chow	Nước muối	-	trong tĩnh mạch	0	0, 7, 10	10
	20	58-60	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 40 10mg/kg	1 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 7, 10	10

Phần	Nhóm số	Id động vật số	Số động vật	Giống / giới tính/thức ăn động vật	Mức độ liều lượng hợp chất mỗi ngày	Nồng độ ở thể tích liều lượng 10 ml/kg	Đường dùng	Ngày định liều	Trọng lượng cơ thể ngày	Ngày giết
	21	61-63	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 41 đăng mol 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 7, 10	10
	24	70-72	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 42 đăng mol 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	trong tĩnh mạch	0	0, 7, 10	10
A	25	73-75	3	NMRI/♀/Chow	Nước muối	-	trong tĩnh mạch	0	0, 1	1

Liều dùng: Các con cái NMRI, khoảng 20g lúc mới sinh, được định liều 10ml trong mỗi kg BW (theo trọng lượng cơ thể ngày 0) trong tĩnh mạch của hợp chất được phối trộn trong nước muối hoặc một mình nước muối theo bảng trên.

Lấy mẫu mô gan và thận. Các con vật được gây mê với 70% CO₂-30% O₂ và được giết bằng cách làm trật khớp cổ theo Bảng 4. Một nửa thùy gan lớn và một thận được cắt nhỏ và nhấn chìm trong RNAlate.

Tổng ARN được chiết từ tối đa 10mg mô được đồng nhất bằng cách nghiền hạt với sự có mặt của dung dịch đệm mô phân lập ARN MagNA Pure LC (Roche cat.no 03 604 721 001) bằng cách sử dụng bộ kit thể tích lớn ARN tế bào MagNa Pure 96 (Roche cat no. 5467535001), theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Quá trình tổng hợp mạch thứ nhất được tiến hành bằng cách sử dụng chất phản ứng transcriptaza đảo từ Ambion theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Đối với mỗi mẫu 0,5µg tổng ARN được điều chỉnh đến (10,8µl) với RNaza không có H₂O và được trộn với 2µl decame ngẫu nhiên (50µM) và 4µl hỗn hợp dNTP (2,5mM mỗi dNTP) và gia nhiệt đến nhiệt độ 70°C trong 3 phút mà sau đó các mẫu được làm lạnh nhanh trên đá. 2µl 10x dung dịch đệm RT, 1µl MMLV Transcriptaza đảo (100 U/µl) và 0,25µl chất ức chế RNaza (10U/µl) được bổ sung vào mỗi mẫu, sau đó là ủ ở nhiệt độ 42°C trong 60 phút, bất hoạt nhiệt enzym ở nhiệt độ 95°C trong 10 phút và sau đó mẫu được làm lạnh đến nhiệt độ 4°C. Các mẫu ADN bổ trợ được pha loãng theo tỷ

lệ 1:5 và đưa vào RT-QPCR bằng cách sử dụng Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems Cat #4364103) và thử nghiệm biểu hiện gen Taqman (mPCSK9, Mn00463738_m1 và mActin #4352341E) theo phương pháp của nhà sản xuất và được xử lý trong công cụ Applied Biosystems RT-qPCR (7500/7900 hoặc ViiA7) theo cách nhanh.

Ví dụ 8: Nghiên cứu động vật linh trưởng không phải người; tiêm nhiều lần dưới da

Mục đích của nghiên cứu động vật linh trưởng không phải người là để đánh giá tính hiệu quả và độ an toàn của hợp chất kháng PCSK9 trong chu trình dùng lặp lại, khi hợp chất được sử dụng bằng cách tiêm dưới da (s.c.). Hợp chất được sử dụng trong thử nghiệm này là SEQ ID NO 2, 3, 18, và 19, được điều chế trong nước muối vô trùng (0,9%) ở nồng độ ban đầu là 0,625 và 2,5mg/ml.

Khỉ cái cynomolgus ít nhất 24 tháng tuổi được sử dụng, và được cho tiếp cận tự do với nước máy và 180g chế độ ăn mở rộng OWM(E) SQC SHORT (Dietex France, chênh lệch tiêu chuẩn S, Saint Gratien, France) được phân phối hằng ngày cho mỗi con. Ngoài ra, trái cây hoặc rau được cung cấp cho mỗi con vật này hằng ngày. Các con vật được làm thích nghi với các điều kiện nghiên cứu trong thời gian ít nhất 14 ngày trước khi bắt đầu giai đoạn điều trị. Trong giai đoạn này, các nghiên cứu trước điều trị được tiến hành. Các con vật được định liều dưới da một lần một tuần trong bốn tuần ở liều là 0,5mg/kg (SEQ ID NO 2, 3, 18, và 19) hoặc 1,5mg/kg/mũi tiêm (SEQ ID NO 18 và 19), với tổng cộng bốn mũi tiêm trong khoảng bốn tuần. Thể tích liều lượng là 0,4 mL/kg/mũi tiêm. Sáu con vật được sử dụng trong mỗi nhóm. Sau liều thứ tư và liều cuối cùng, các con vật được quan sát trong một tuần mà sau đó một nửa các con vật được giết để nghiên cứu sự điều hòa phiên mã apoB gan, các thông số lipid, tiền sử gan và thận, và sự phân phối mô gan và thận. Ngày 1 tương ứng với ngày thứ nhất của giai đoạn điều trị. Các quan sát lâm sàng và trọng lượng cơ thể và sự hấp thụ thức ăn (trong mỗi nhóm) được ghi lại trước và trong nghiên cứu.

Máu và mô được lấy mẫu và phân tích ở các thời điểm sau:

Ngày nghiên cứu	Thông số
-10	L, Apo-B, OA
-5	LSB, L, Apo-B, OA
-1	RCP, L, Apo-B, PK, OA
1	Định liều

8 liều lượng sơ bộ	LSB, L, Apo-B, PK, OA
8	Định liều
15 liều lượng sơ bộ	LSB, L, Apo-B, PK, OA
15	Định liều
22 liều lượng sơ bộ	LSB, L, Apo-B, PK, OA
22	Định liều
29	RCP, PK, OA + mổ tử thi phần chính
36 (các con vật phục hồi)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
43 (các con vật phục hồi)	RCP, PK, Apo-B, PK, OA
50 (các con vật phục hồi)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
57 (các con vật phục hồi)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
64 (các con vật phục hồi)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
71 (các con vật phục hồi)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
78 (các con vật phục hồi)	RCP, L, Apo-B, PK, OA + mổ tử thi phục hồi

RCP: bệnh học lâm sàng thường ngày, LSB: độ an toàn sinh hóa gan, PK: dược động học, OA: các phân tích khác, L: lipit

Máu (khoảng 1,0mL) được đưa vào các ống lithi heparin (bằng cách sử dụng máy phân tích sinh hóa máu ADVIA 1650) phân tích natri, kali, clorua, canxi, phospho vô cơ, glucoza, HDL-C, LDL-C, ure, creatinin, tổng bilirubin (TBIL), tổng cholesterol, triglyxerit, phosphataza kiềm (ALP), alanin aminotransferaza (ALAT), aspartat aminotransferaza (ASAT), creatin kinaza, gamma-glutamyl transferaza (GGT), lactat dehydrogenaza, tổng protein, albumin, tỷ lệ albumin/globulin.

Phân tích máu: Các mẫu máu để phân tích ApoB được gom chỉ từ Nhóm có 1 đến 16 con vật (tức là các con vật được điều trị bằng hợp chất kháng ApoB) vào Ngày -8, -1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43 và 50. Máu tĩnh mạch (khoảng 2mL) được gom từ tĩnh mạch thích hợp trong từng con vật vào ống tách huyết thanh (Serum Separating Tube - SST) và cho phép đông cục trong ít nhất 60 ± 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Máu được ly tâm ở tốc độ 10000 m/s^2 trong 10 phút trong điều kiện làm lạnh (thiết lập để duy trì nhiệt độ $+4^\circ\text{C}$). Huyết thanh được truyền vào 3 ống riêng rẽ và bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi phân tích protein ApoB bằng ELISA.

Phân tích khác: WO 2010142805 đề xuất các phương pháp dùng cho các phân tích sau: qPCR, phân tích ARN thông tin ApoB. Các phân tích khác bao gồm, phân tích

Lp(a) huyết thanh với ELISA (Mercodia No. 10-1106-01), phân tích oligonucleotit mô và huyết thanh (hàm lượng thuốc), chiết các mẫu, mẫu tiêu chuẩn và mẫu QC, xác định hàm lượng oligonucleotit bằng ELISA.

Dược lý được dự định đối với oligonucleotit kháng PCSK9 là sự giảm cholesterol LDL bằng cách giảm protein PCSK9 trong hệ tuần hoàn (“PCSK9 huyết thanh”). Các phân tử được liên hợp GalNAc chứng minh tính hiệu quả tăng cường so với các phân tử không được liên hợp khi nghiên cứu cả cholesterol PCSK9 và LDL huyết thanh (Fig. 16 và Fig. 17). Fig. 16 minh họa rằng bốn mũi tiêm hằng tuần 0,5 mg/kg/mũi tiêm của SEQ ID NO 2 không được liên hợp chỉ có các tác dụng tối thiểu lên cholesterol PCSK9 và LDL huyết thanh, trong khi đó thể liên hợp GalNAc của cùng một gapme LNA (SEQ ID 18) có tác dụng làm giảm hiệu nghiệm ở cả cholesterol PCSK9 và LDL huyết thanh. Cùng một mối tương quan được ghi lại khi so sánh dữ liệu đối với các lần tiêm của SEQ ID NO 3 và SEQ ID NO 19 (Fig. 17): chỉ các tác dụng nhỏ của phân tử không được liên hợp và sự giảm điều hòa hiệu nghiệm của cholesterol PCSK9 và LDL huyết thanh bằng thể liên hợp GalNAc tương ứng (SEQ ID NO 19). Nên lưu ý rằng các tác dụng của SEQ ID 18 và 19 lên cholesterol PCSK9 và LDL huyết thanh là liều phụ thuộc và với thời gian tác động dài, với cholesterol PCSK9 và LDL huyết thanh thấp hơn so với mức độ đường cơ sở trung bình trong ít nhất bảy tuần sau khi tiêm lần cuối cùng (lần tiêm cuối cùng vào ngày 22, dữ liệu minh họa giai đoạn hồi phục đến ngày 71).

Hàm lượng oligonucleotit gan và thận được phân tích một tuần sau lần tiêm cuối cùng, tức là ngày 29 của nghiên cứu. Hàm lượng oligonucleotit được phân tích bằng cách sử dụng ELISA lai (chủ yếu như được mô tả trong Lindholm et al, Mol Ther. 2012 Feb;20(2):376-81), bằng cách sử dụng SEQ ID NO 2 để chuẩn bị đường cong tiêu chuẩn cho các mẫu từ các con vật được điều trị bằng SEQ ID NO 2 và SEQ ID NO 18, sau khi đã được kiểm chứng là không có thay đổi về kết quả nếu SEQ ID NO 18 (được liên hợp) được sử dụng để chuẩn bị đường cong tiêu chuẩn. Theo cách giống như vậy, SEQ ID NO 3 được sử dụng để chuẩn bị đường cong tiêu chuẩn đối với SEQ ID NO 3 và SEQ ID NO 19 sau khi kiểm chứng rằng không có sự chênh lệch về kết quả nếu SEQ ID NO 19 được sử dụng để chuẩn bị đường cong tiêu chuẩn để phân tích ELISA các mẫu này.

Hàm lượng oligonucleotit trong mô một tuần sau lần tiêm cuối cùng			
	Gan	Thận	Tỷ lệ gan/thận

	(µg oligonucleotit/g mô ứót)		(µg oligonucleotit/ g mô ứót)		
	Trung bình	Chênh lệch tiêu chuẩn	Trung bình	Chênh lệch tiêu chuẩn	
SEQ ID NO 2, 4x0,5 mg/kg	0,260	0,14	30,3	4,8	0,008
SEQ ID NO 18, 4x0,5 mg/kg	3,57	0,61	11,5	2,5	0,310
SEQ ID NO 18, 4x1,5 mg/kg	18,8	1,7	26,8	6,6	0,701
SEQ ID NO 3, 4x0,5 mg/kg	0,149	0,059	38,2	0,72	0,004
SEQ ID NO 19, 4x0,5 mg/kg	2,72	0,69	16,3	1,5	0,167
SEQ ID NO 19, 4x1,5 mg/kg	12,2	3,44	41,2	6,5	0,296

Như được minh họa trong bảng trên đây, sự liên hợp của SEQ ID NO 2 và SEQ ID NO 3 khiến cho tỷ lệ gan/thận đối với các phân tử được liên hợp (SEQ ID NO 18 và SEQ ID NO 19) cao hơn so với tỷ lệ gan/thận đối với các phân tử không được liên hợp tương ứng một tuần sau lần tiêm cuối cùng khi các con vật được tiêm dưới da một lần/tuần trong bốn tuần. Được nêu là các dấu hiệu về sự gây độc ống đã được thể hiện với phân tử kháng PCSK9 không ược liên hợp khác (như SEQ ID NO 1, như được minh họa trên Fig. 15), và được nêu là gan là cơ quan đích để điều trị kháng PCSK9, sự thay đổi với tỷ lệ gan/thận cao hơn được mong đợi là làm làm tăng độ an toàn với SEQ ID NO 18 và 19 được liên hợp so với SEQ ID NO 2 và 3 không được liên hợp.

Như được minh họa trên Fig. 16 và Fig. 18, SEQ ID NO 18 và 19 được định liều ở mức độ thích hợp dược lý. Profin hóa học lâm sàng của các con vật giống nhau trong giai đoạn điều trị và pha phục hồi thể hiện là không có sự tăng thích hợp về mặt lâm sàng ở các thông số an toàn ở gan hoặc thận.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất bao gồm oligome đối nghĩa có chiều dài từ 16 đến 22 nucleotit liên kề, trong đó trình tự của oligome đối nghĩa chứa trình tự liên kề có chiều dài 16 nucleotit có mức hỗ trợ bằng 100% đối với trình tự của SEQ ID NO: 31, trong đó oligome đối nghĩa là gapme chứa ít nhất một đơn vị LNA, và trong đó oligome đối nghĩa nhắm đích ARN thông tin mã hóa PCSK9.
2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó LNA là oxy-LNA, thio-LNA, amino-5 LNA, 5'-methyl-LNA, ENA, cET, cMOE hoặc sự kết hợp của chúng.
3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó LNA là chất đồng phân lập thể trong cấu hình beta-D hoặc cấu hình alpha-L.
4. Hợp chất theo điểm 1, trong đó oligome đối nghĩa chứa ít nhất một đơn vị cET.
5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó oligome đối nghĩa chứa 2, 3, 4, 5, 6 hoặc 7 đơn vị LNA.
6. Hợp chất theo điểm 5, trong đó từng đơn vị LNA trong oligome đối nghĩa là chất đồng phân lập thể trong cấu hình giống nhau.
7. Hợp chất theo điểm 5, trong đó từng đơn vị LNA trong oligome đối nghĩa là đơn vị beta-D-oxy LNA hoặc từng đơn vị LNA trong oligome đối nghĩa là đơn vị alpha-L-oxy-LNA.
8. Hợp chất theo điểm 1, trong đó trình tự của oligome đối nghĩa chứa ít nhất một liên kết phosphothioat, phosphodithioat, hoặc boranophosphat giữa nucleosit.
9. Hợp chất theo điểm 8, trong đó tất cả các liên kết giữa nucleosit là phosphothioat.
10. Hợp chất theo điểm 8, trong đó một hoặc nhiều liên kết giữa nucleosit chứa tâm không đối xứng trong cấu hình riêng R và/hoặc cấu hình riêng S.

11. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất và oligome của SEQ ID NO:31 có thể tạo thành chuỗi kép có độ ổn định nhiệt tăng liên quan đến chuỗi kép tương ứng chứa oligome đối nghĩa tương ứng không chứa LNA.

12. Thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa chứa:

(i) oligome đối nghĩa có 16 đến 22 nucleotit liên kề, trong đó trình tự của oligome đối nghĩa chứa trình tự liên kề có chiều dài 16 nucleotit có mức hỗ trợ bằng 100% với trình tự của SEQ ID NO: 31, và trong đó oligome đối nghĩa là gapme chứa ít nhất một đơn vị LNA, và

(ii) ít nhất một gốc không có nucleotit hoặc không có polynucleotit được liên kết cộng hóa trị với oligome đối nghĩa nêu trên trực tiếp hoặc thông qua tác nhân liên kết được định vị giữa trình tự oligome liên kề và gốc không có nucleotit hoặc không có polynucleotit,

trong đó thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa nhắm đích ARN thông tin mã hóa PCSK9.

13. Thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 12, trong đó gốc không có nucleotit hoặc không có polynucleotit là gốc nhắm đích gan được gắn vào đầu 5' hoặc vào đầu 3' của oligome đối nghĩa.

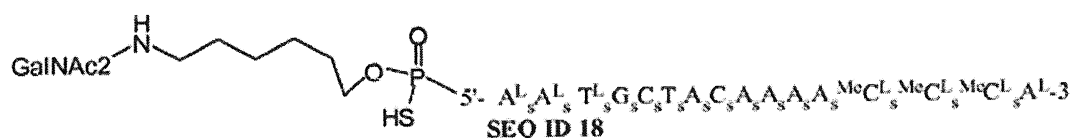
14. Thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 13, trong đó gốc nhắm đích gan được liên kết với oligome đối nghĩa thông qua tác nhân liên kết.

15. Thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 13, trong đó gốc nhắm đích gan chứa gốc liên hợp cacbon hydrat chứa cacbon hydrat được chọn từ nhóm bao gồm galactosa, lactosa, N-acetylgalactosamin (GalNAc), mannoza, mannoza-6-phosphat, và sự kết hợp của chúng.

16. Thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 15, trong đó gốc liên hợp cacbon hydrat không phải là polyme cacbon hydrat mạch thẳng.

17. Thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 15, trong đó gốc liên hợp cacbon hydrat là nhóm cacbon hydrat chứa 1, 2, 3, hoặc 4 gốc cacbon hydrat.

18. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 17, trong đó gốc cacbon hydrat giống hệt nhau hoặc không giống hệt nhau.
19. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 15, trong đó gốc liên hợp cacbon hydrat chứa ít nhất một thụ thể asialoglycoprotein nhắm đích gốc thể liên hợp.
20. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 19, trong đó thụ thể asialoglycoprotein nhắm đích gốc thể liên hợp chứa nhóm GalNAc hóa trị một, hóa trị hai, hóa trị ba, hoặc hóa trị bốn.
21. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 20, trong đó mỗi GalNAc trong nhóm GalNAc được gắn vào nhóm điểm nhánh thông qua đoạn đệm.
22. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 21, trong đó nhóm điểm nhánh chứa di-lysin.
23. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 21, trong đó đoạn đệm chứa đoạn đệm PEG.
24. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 23, trong đó tác nhân liên kết chứa nhóm amino alkyl có từ 6 đến 12 nguyên tử cacbon hoặc tác nhân liên kết phosphat nucleotit có thể phân tách sinh học chứa từ 1 đến 6 nucleotit.
25. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 20, trong đó nhóm GalNAc hóa trị ba chứa Conj 1, Conj 2, Conj 1a, hoặc Conj 2a.
26. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 12, trong đó gốc không có nucleotit hoặc không có polynucleotit được liên kết cộng hóa trị với oligome đối nghĩa thông qua liên kết cộng hóa trị.
27. Thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa của SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO:19





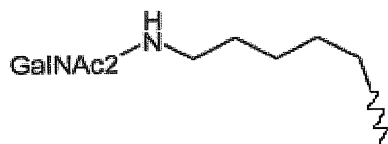
trong đó:

ký tự viết trên dòng ^L dùng để chỉ đơn vị beta-D-oxy LNA,

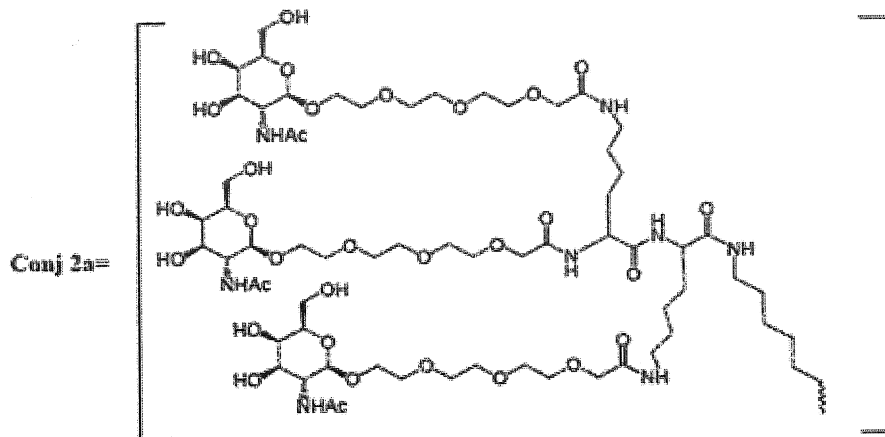
MeC dùng để chỉ đơn vị 5-methylxytosin,

ký tự viết dưới dòng _s dùng để chỉ liên kết phosphothioat giữa nucleosit,

và trong đó:



là thụ thể asialoglycoprotein Conj 2a nhắm đích gốc thể liên hợp



và trong đó thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa nhắm đích ARN thông tin mã hóa PCSK9.

28. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 và chất pha loãng, chất mang, muối, hoặc tá dược được dụng.

29. Dược phẩm chứa thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm 12 và chất pha loãng, chất mang, muối, hoặc tá dược được dụng.

30. Phương pháp in vitro làm giảm mức biểu hiện và/hoặc hoạt tính của PCSK9 trong tế bào bao gồm việc sử dụng một lượng hữu hiệu của hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các

điểm từ 1 đến 11, thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 27, hoặc được phẩm theo điểm 28 vào tế bào.

31. Phương pháp sản xuất hợp chất chứa oligome đối nghĩa có chiều dài bằng từ 16 đến 26 nucleotit liên kề, phương pháp này bao gồm việc tổng hợp hóa học hợp chất bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp oligonucleotit pha rắn liên tiếp, trong đó trình tự của oligome đối nghĩa chứa trình tự liên kề có chiều dài 16 nucleotit có mức hỗ trợ bằng 100% đối với trình tự của SEQ ID NO: 31, trong đó oligome đối nghĩa là gapme chứa ít nhất một đơn vị LNA, và trong đó oligome đối nghĩa nhắm đích ARN thông tin mã hóa PCSK9.

32. Phương pháp sản xuất thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa bao gồm việc gắn cộng hóa trị ít nhất một gốc không có nucleotit hoặc không có polynucleotit cộng hóa trị vào oligome đối nghĩa có chiều dài từ 16 đến 26 nucleotit liên kề trực tiếp hoặc thông qua tác nhân liên kết được định vị giữa trình tự oligome đối nghĩa và gốc không có nucleotit hoặc không có polynucleotit, trong đó trình tự của oligome đối nghĩa chứa trình tự liên kề có chiều dài 16 nucleotit có mức hỗ trợ bằng 100% đối với trình tự của SEQ ID NO: 31, trong đó oligome đối nghĩa là gapme chứa ít nhất một đơn vị LNA, và trong đó thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa nhắm đích ARN thông tin mã hóa PCSK9.

33. Phương pháp theo điểm 32, trong đó việc gắn cộng hóa trị ít nhất một gốc không có nucleotit hoặc không có polynucleotit vào oligome đối nghĩa bao gồm bước:

(i) tổng hợp hóa học oligome đối nghĩa; và,

(ii) bổ sung ít nhất một gốc không có nucleotit hoặc không có polynucleotit vào thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa bằng phương pháp tổng hợp hóa học hoặc liên hợp.

34. Phương pháp theo điểm 33, trong đó việc bổ sung ít nhất một gốc không có nucleotit hoặc không có polynucleotit vào thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa oligonucleotit bằng phương pháp tổng hợp hóa học hoặc liên hợp bao gồm bước:

(i) đưa ít nhất một gốc không có nucleotit hoặc không có polynucleotit vào thể liên hợp đối nghĩa bằng phương pháp tổng hợp hóa học hoặc liên hợp;

(ii) đưa ít nhất một tác nhân liên kết vào thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa bằng phương pháp tổng hợp hóa học hoặc liên hợp;

(iii) đưa ít nhất một điểm nhánh vào thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa bằng phương pháp tổng hợp hóa học hoặc liên hợp;

(iv) đưa ít nhất một đoạn đệm vào thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa bằng phương pháp tổng hợp hóa học hoặc liên hợp; hoặc,

(v) sự kết hợp của chúng.

35. Phương pháp theo điểm 34, trong đó:

(i) ít nhất một tác nhân liên kết được đặt giữa oligome đối nghĩa và điểm nhánh;

(ii) ít nhất một điểm nhánh được đặt giữa tác nhân liên kết và ít nhất một gốc không có nucleotit hoặc không có polynucleotit;

(iii) ít nhất một, hai, hoặc ba gốc không phải nucleotit hoặc không phải polynucleotit được gắn vào điểm nhánh.

(iv) ít nhất một đoạn đệm PEG được đặt giữa gốc không phải nucleotit hoặc không phải polynucleotit và điểm nhánh; hoặc,

(v) sự kết hợp bất kỳ của chúng.

36. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó oligome đối nghĩa là sản phẩm trung gian trong quá trình tổng hợp của thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa chứa oligome đối nghĩa.

37. Phương pháp theo điểm 32, trong đó oligome đối nghĩa là sản phẩm trung gian trong quá trình tổng hợp của thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa chứa oligome đối nghĩa.

38. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó trình tự của oligome đối nghĩa chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO: 26.

39. Thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 27, trong đó trình tự của oligome đối nghĩa chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO: 26.
40. Dược phẩm theo điểm 28, trong đó trình tự của oligome đối nghĩa chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO: 26.
41. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 30 đến 35, trong đó trình tự của oligome đối nghĩa chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO: 26.
42. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó trình tự của oligome đối nghĩa chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 3.
43. Thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 27, trong đó trình tự của oligome đối nghĩa chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 3.
44. Dược phẩm theo điểm 28, trong đó trình tự của oligome đối nghĩa chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 3.
45. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 30 đến 35, trong đó trình tự của oligome đối nghĩa chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 3.
46. Thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 27, trong đó thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa bao gồm SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 19.
47. Dược phẩm theo điểm 28, trong đó thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa bao gồm SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 19.
48. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 30 đến 35, trong đó thẻ liên hợp oligonucleotit đối nghĩa bao gồm SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 19.

Fig. 1

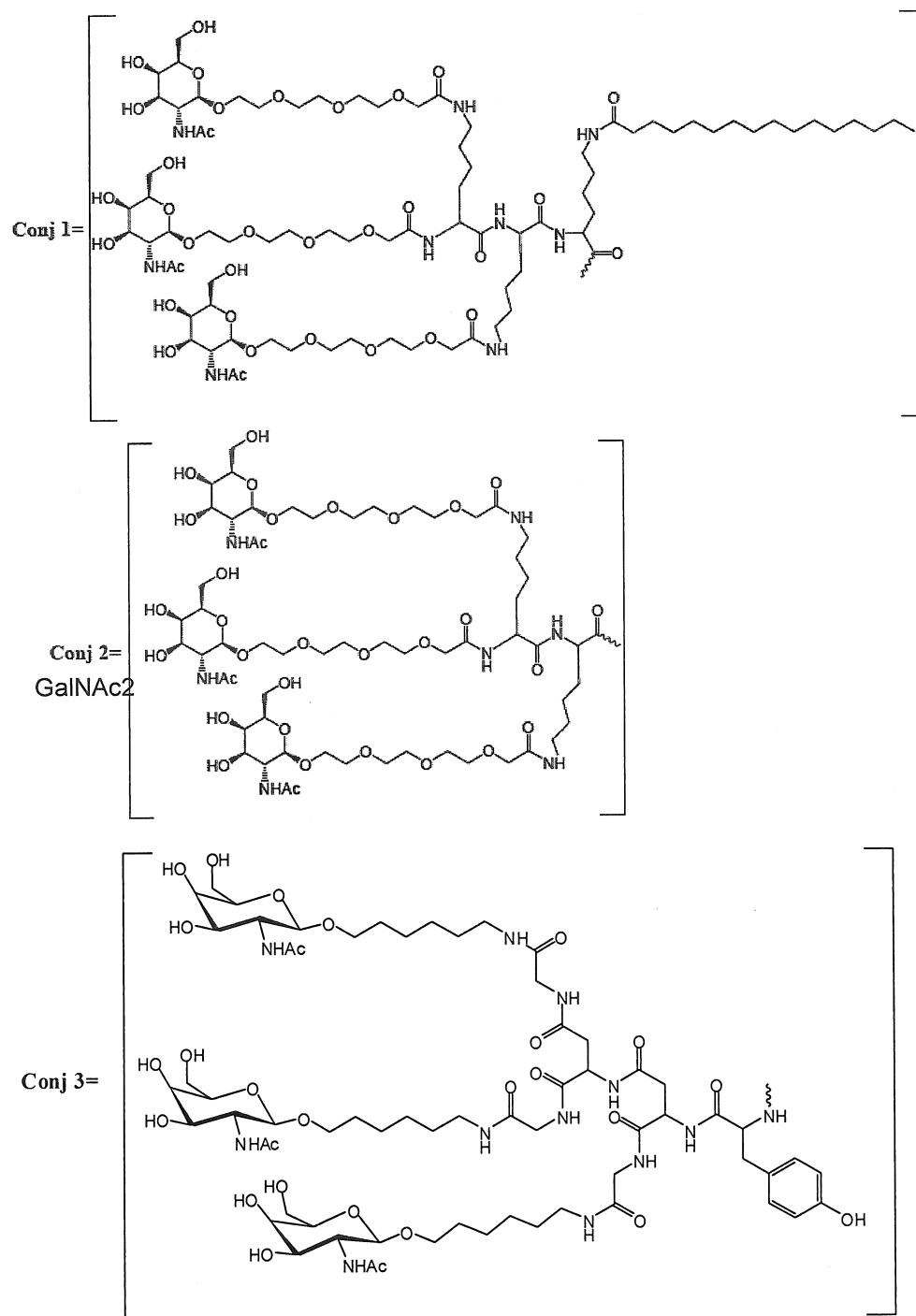


Fig.1 (tiếp tục)

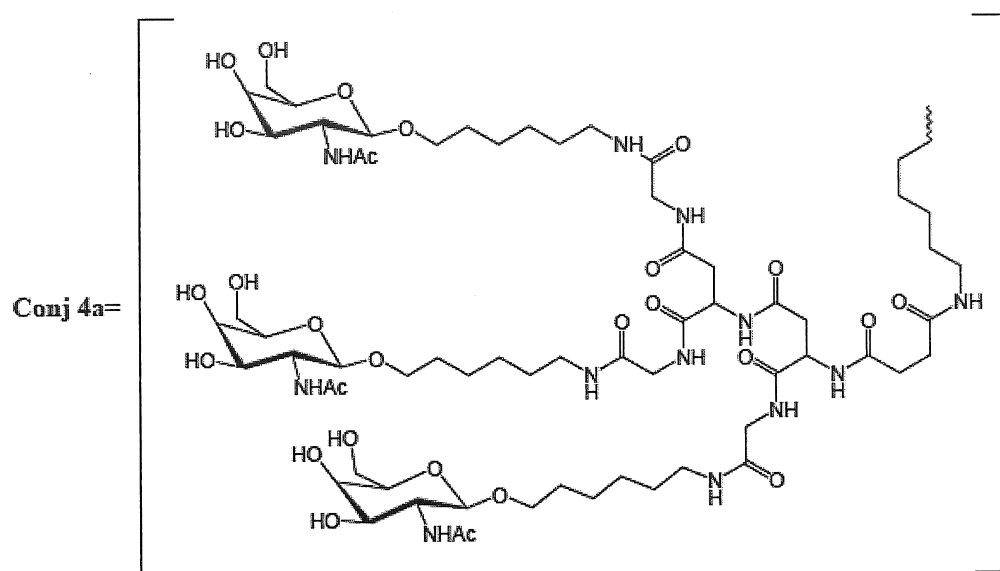
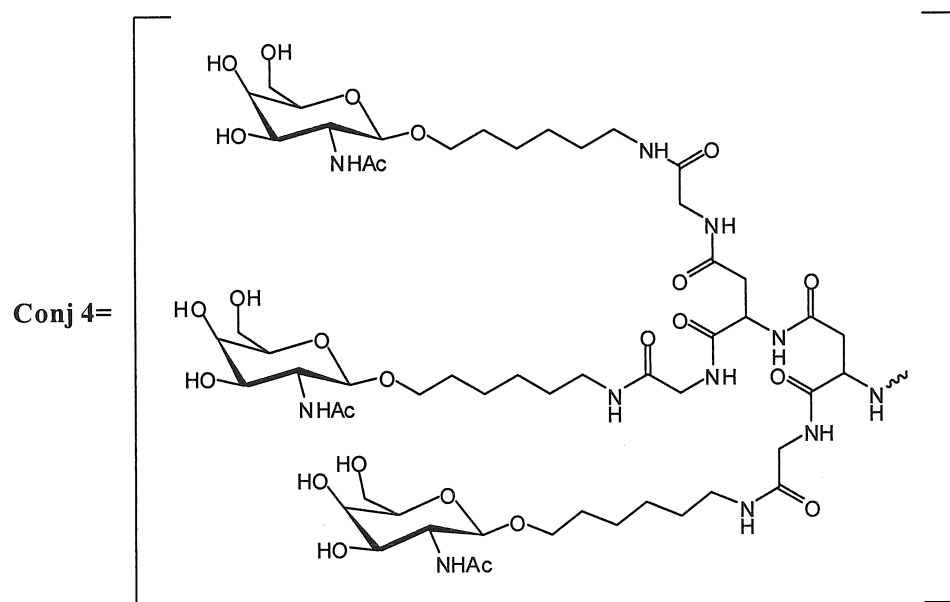


Fig. 1 (tiếp tục)

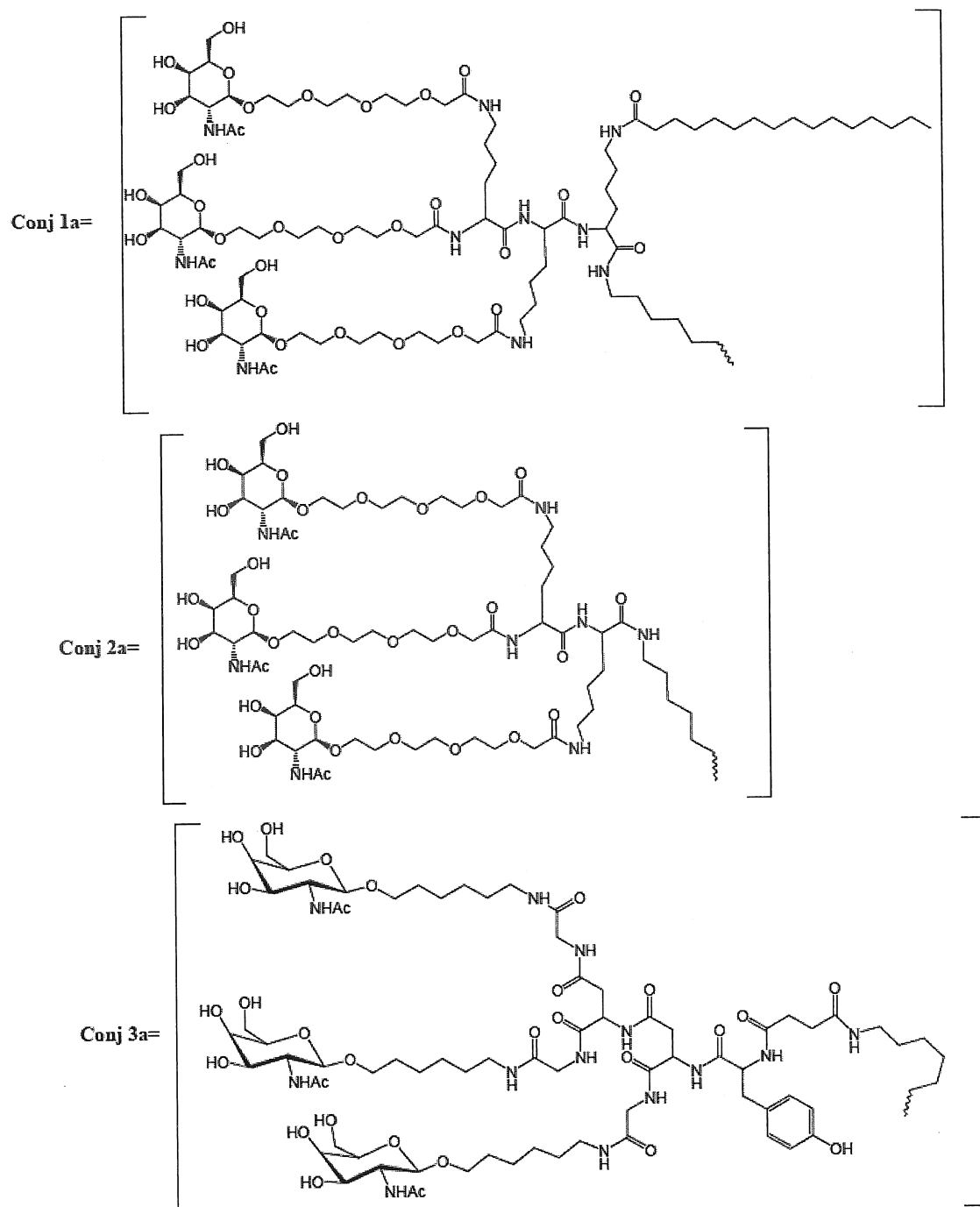


Fig. 2

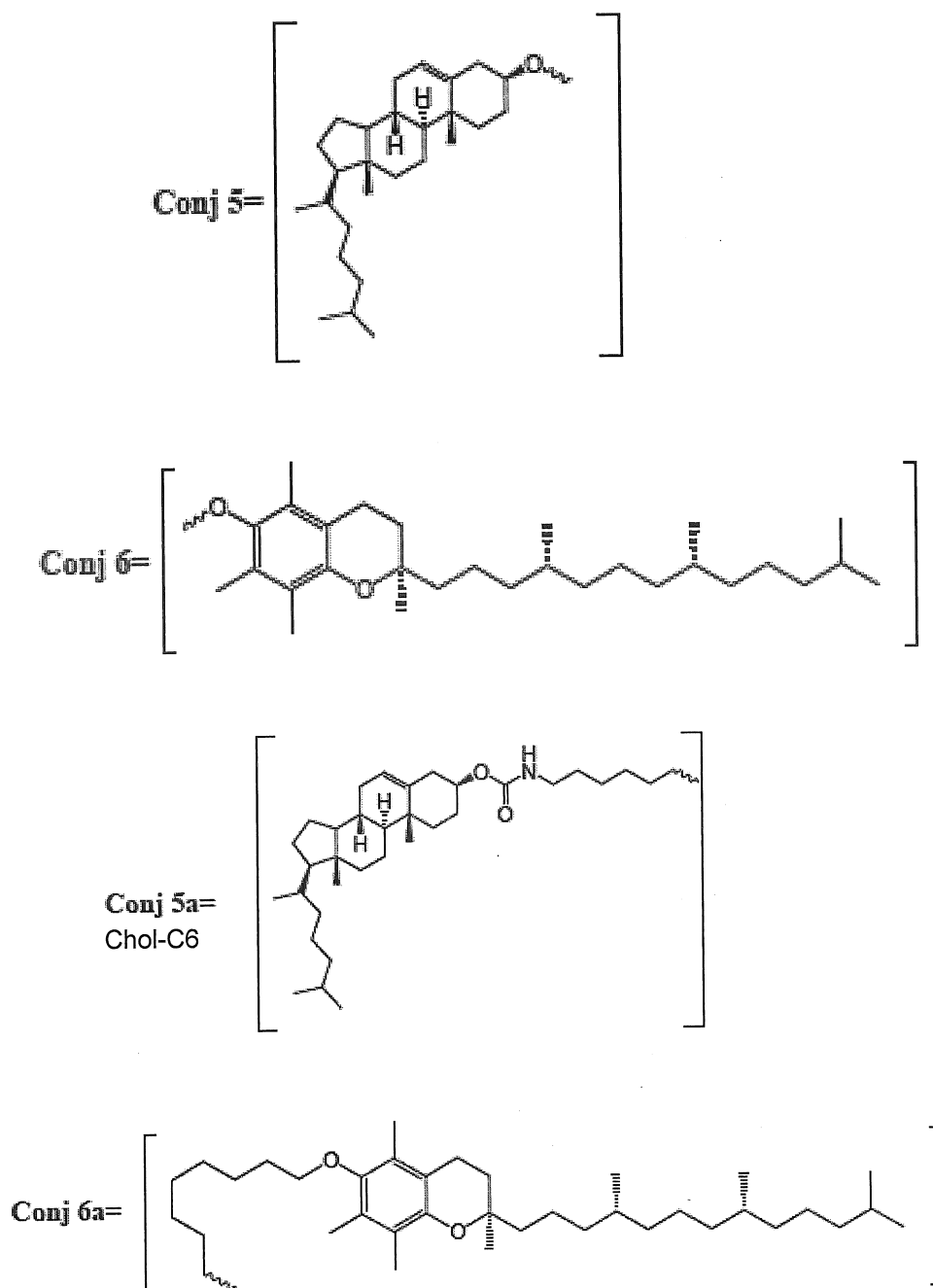


Fig. 3

5'-T_s^LG_s^LMeC_s^LT_sA_sC_sA_sA_sA_sC_sMeC_s^LMeC_s^LA_s^L-3'
SEQ ID 1

5'-A_s^LA_s^LT_s^LG_sC_sT_sA_sC_sA_sA_sA_sMeC_s^LMeC_s^LMeC_s^LA_s^L-3'
SEQ ID 2

5'-A_s^LA_s^LT_s^LG_sC_sT_sA_sC_sA_sA_sA_sC_sMeC_s^LMeC_s^LA_s^L-3'
SEQ ID 3

5'-G_s^LMeC_s^LT_sG_sT_sG_sT_sG_sA_sG_sC_sT_sT_sG_s^LG_s^L-3'
SEQ ID 4

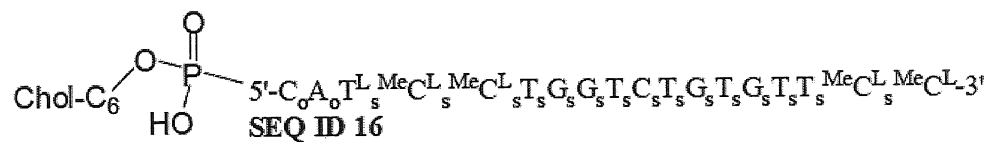
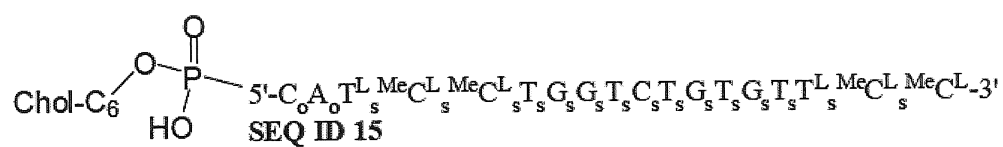
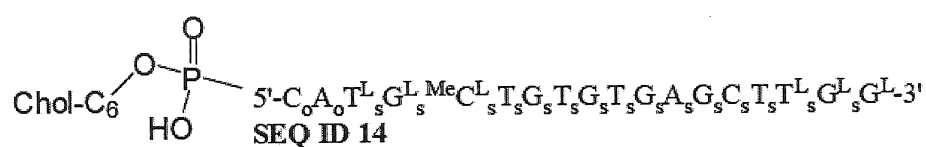
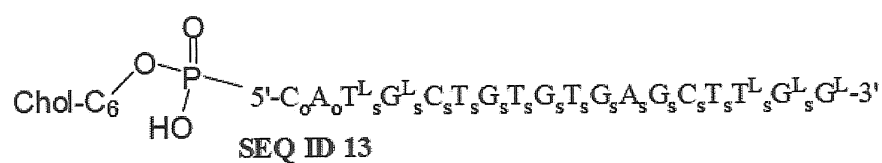
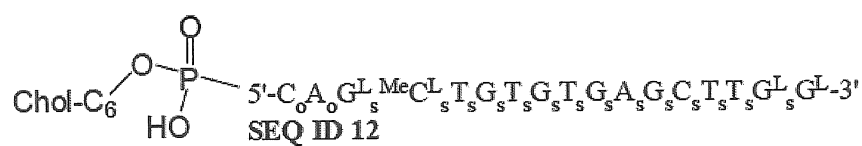
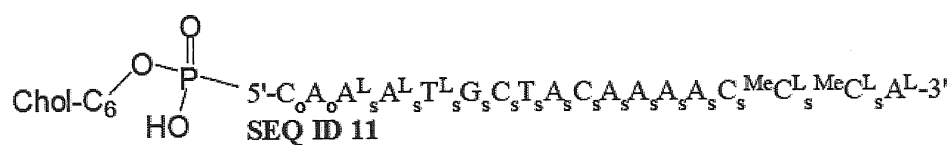
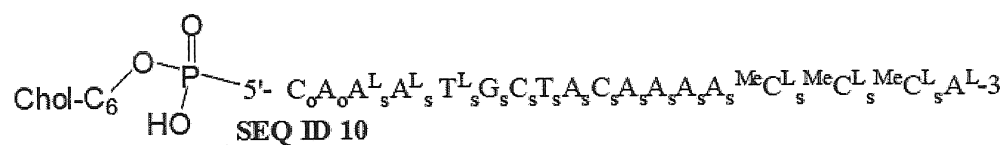
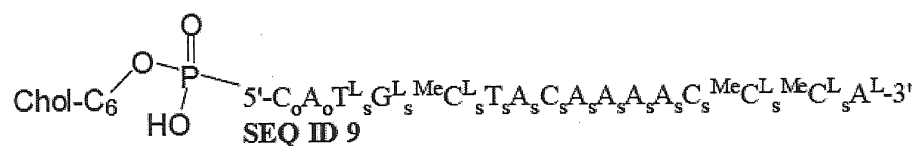
5'-T_s^LG_s^LC_sT_sG_sT_sG_sT_sG_sA_sG_sC_sT_sT_s^LG_s^LG_s^L-3'
SEQ ID 5

5'-T_s^LG_s^LMeC_s^LT_sG_sT_sG_sT_sG_sA_sG_sC_sT_sT_s^LG_s^LG_s^L-3'
SEQ ID 6

5'-T_s^LMeC_s^LMeC_s^LT_sG_sG_sT_sC_sT_sG_sT_sG_sT_sT_s^LMeC_s^LMeC_s^L-3'
SEQ ID 7

5'-T_s^LMeC_s^LMeC_s^LT_sG_sG_sT_sC_sT_sG_sT_sG_sT_sT_sMeC_s^LMeC_s^L-3'
SEQ ID 8

Fig. 4



GalNAc2-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-P(=O)(HS)-5'-T_s^L-G_s^L-MeC_s^L-T_sA_sC_sA_sA_sA_sA_sC_sMeC_s^LMeC_s^LA^L-3'

SEQ ID 17

GalNAc2-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-P(=O)(HS)-5'-A^L_sA^L_sT_s^LG_sC_sT_sA_sC_sA_sA_sA_sMeC_s^LMeC_s^LMeC_s^LA^L-3'

SEQ ID 18

GalNAc2-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-P(=O)(HS)-5'-A^L_sA^L_sT_s^LG_sC_sT_sA_sC_sA_sA_sA_sMeC_s^LMeC_s^LA^L-3'

SEQ ID 19

GalNAc2-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-P(=O)(HS)-5'-G_s^LMeC_s^LT_sG_sT_sG_sT_sG_sA_sG_sC_sT_sT_sG_s^LG^L-3'

SEQ ID 20

GalNAc2-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-P(=O)(HS)-5'-T_s^LG_s^LC_sT_sG_sT_sG_sT_sG_sA_sG_sC_sT_sT_sG_s^LG^L-3'

SEQ ID 21

GalNAc2-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-P(=O)(HS)-5'-T_s^LG_s^LMeC_s^LT_sG_sT_sG_sT_sG_sA_sG_sC_sT_sT_sG_s^LG^L-3'

SEQ ID 22

GalNAc2-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-P(=O)(HS)-5'-T_s^LMeC_s^LMeC_s^LT_sG_sG_sT_sC_sT_sG_sT_sG_sT_sT_sMeC_s^LMeC_s^L-3'

SEQ ID 23

GalNAc2-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-P(=O)(HS)-5'-T_s^LMeC_s^LMeC_s^LT_sG_sG_sT_sC_sT_sG_sT_sG_sT_sT_sMeC_s^LMeC_s^L-3'

SEQ ID 24

Fig. 5A

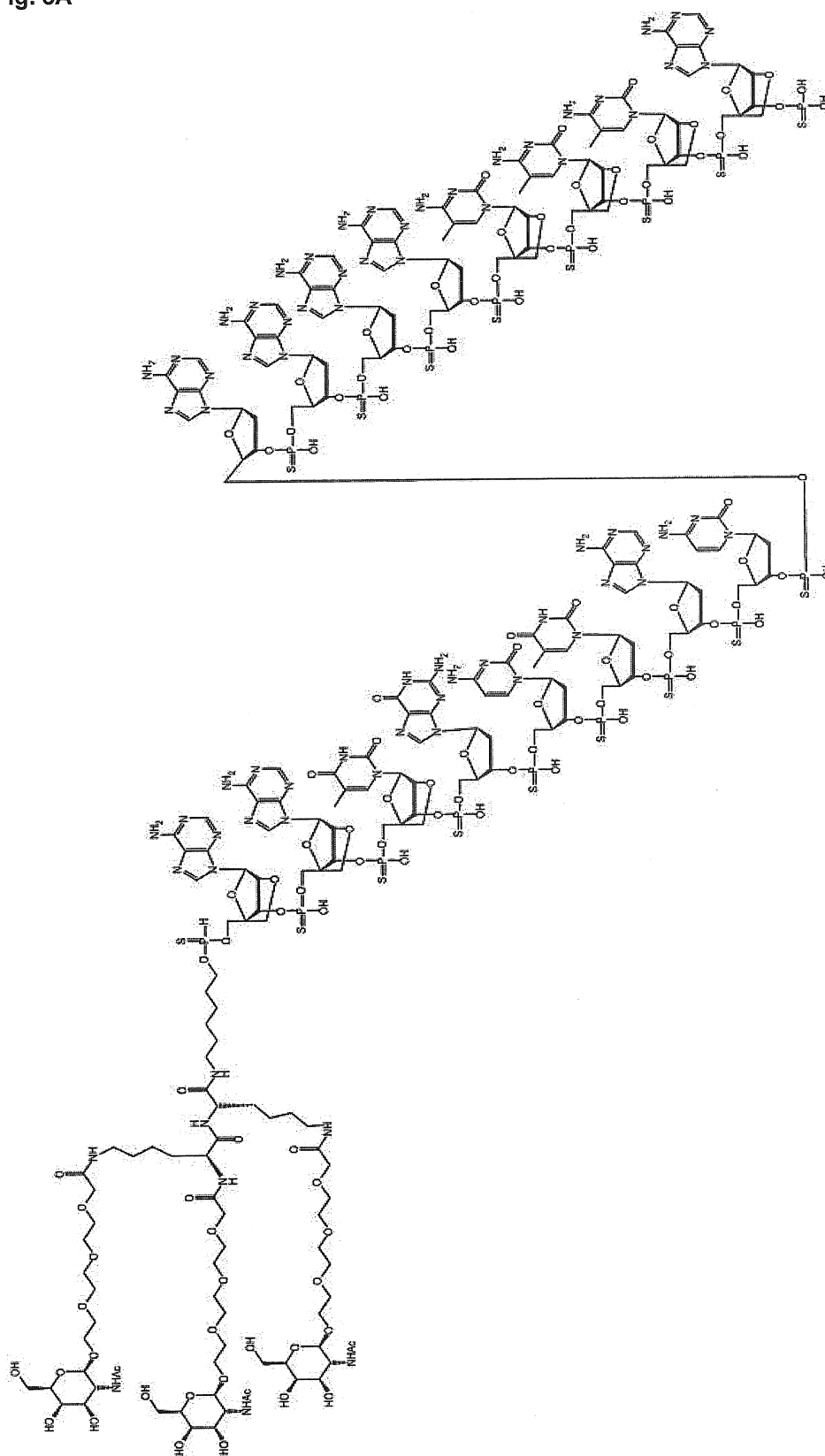


Fig. 5B

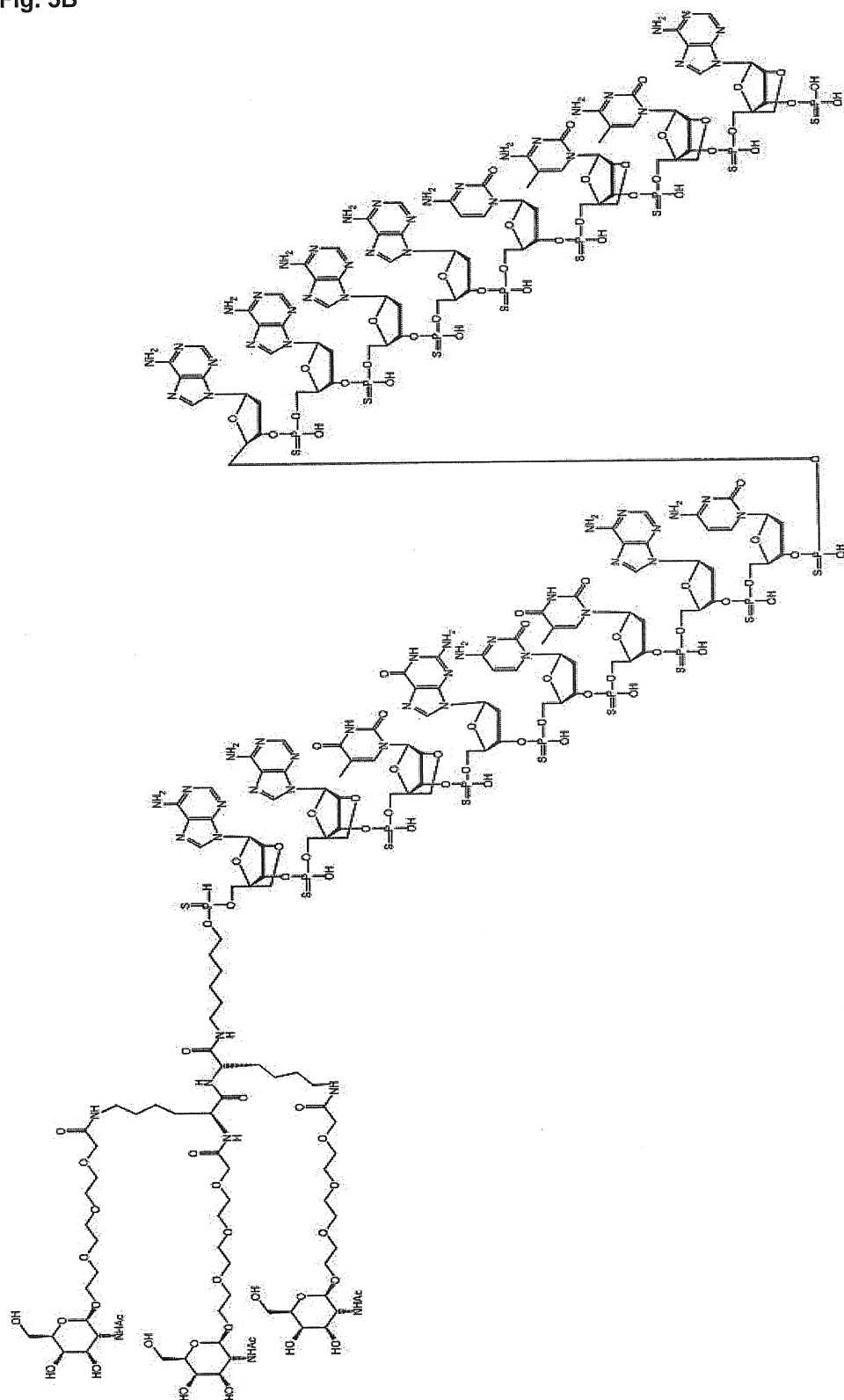


Fig. 6

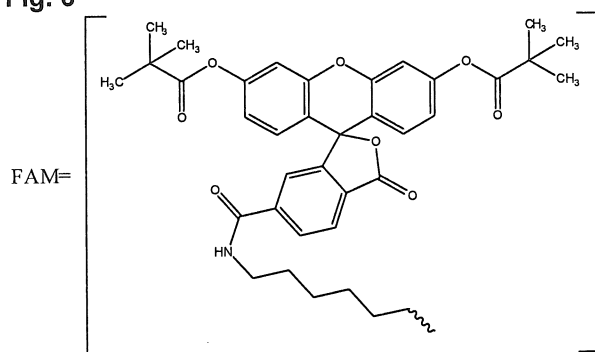


Fig. 7

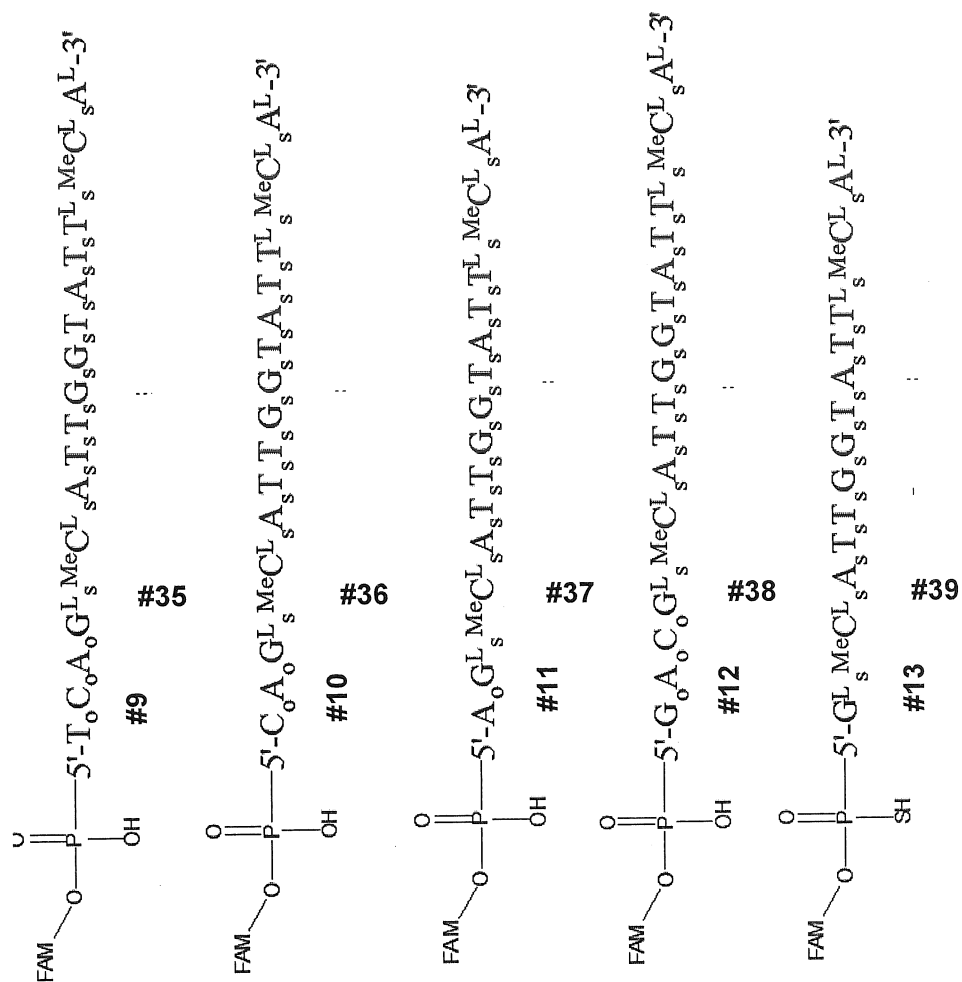


Fig. 8

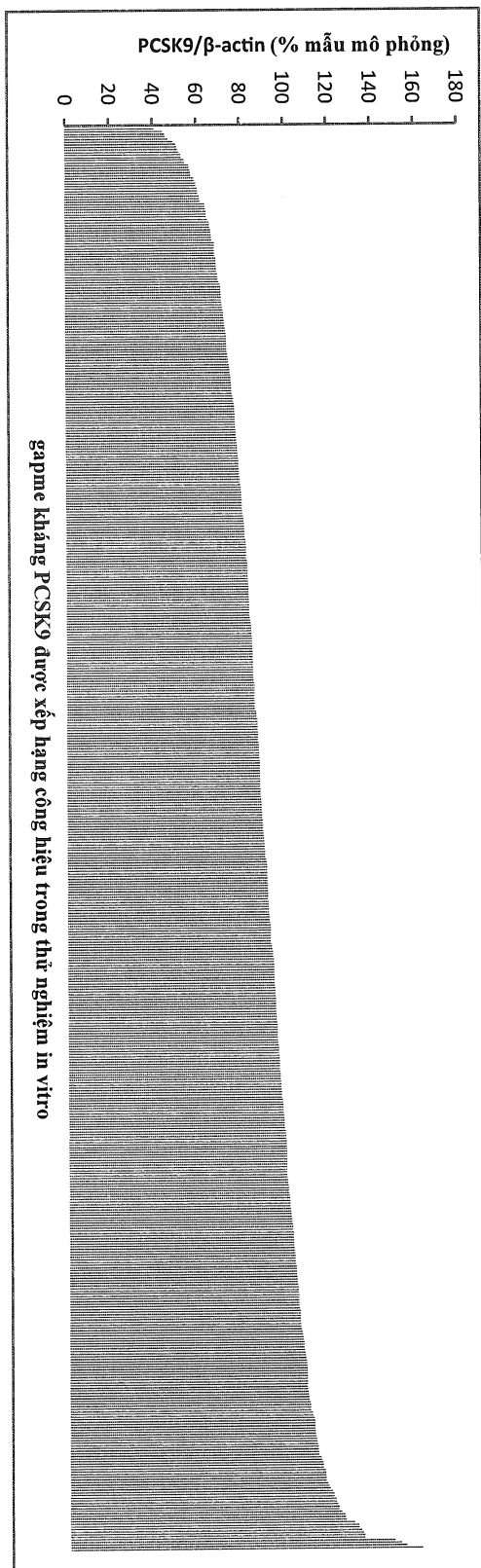


Fig. 9

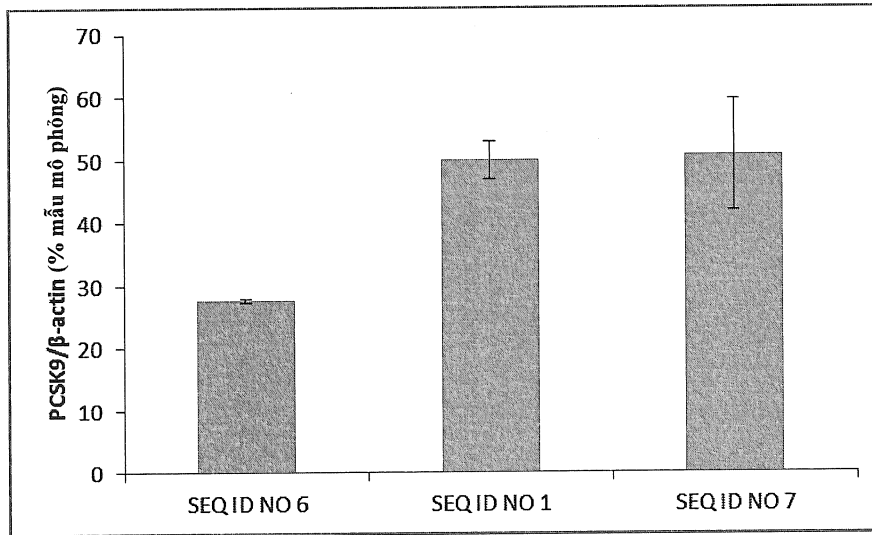
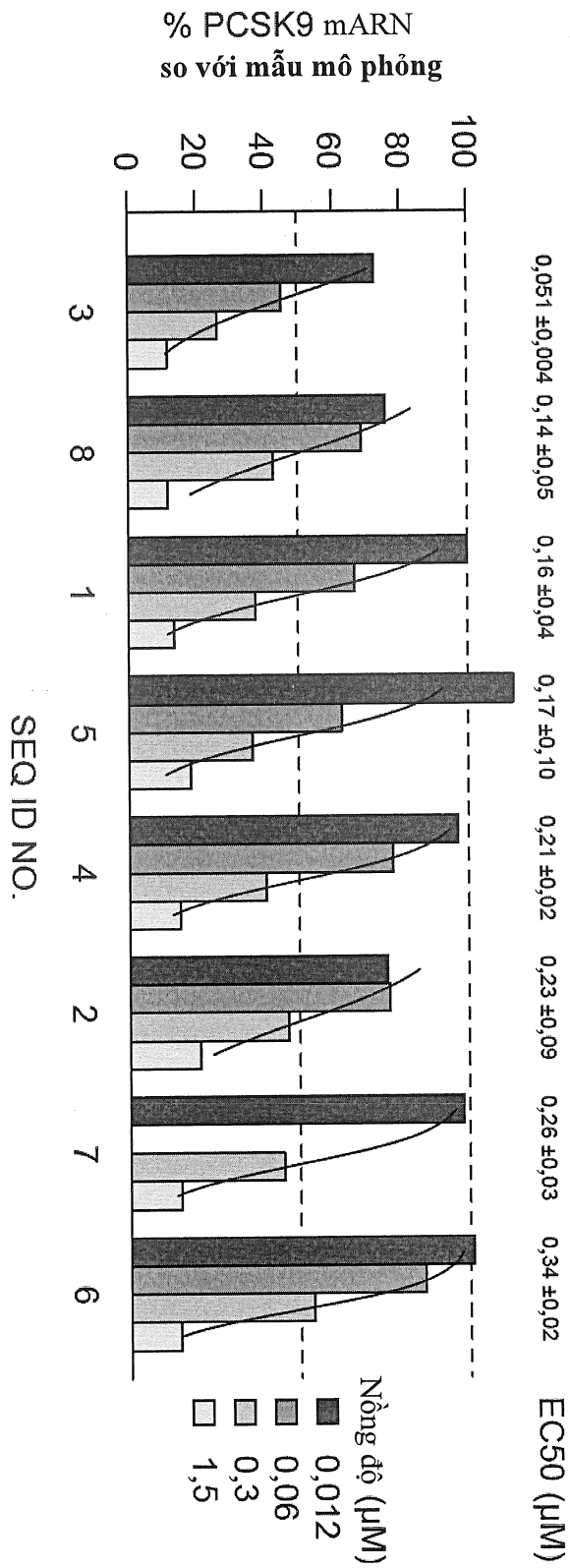
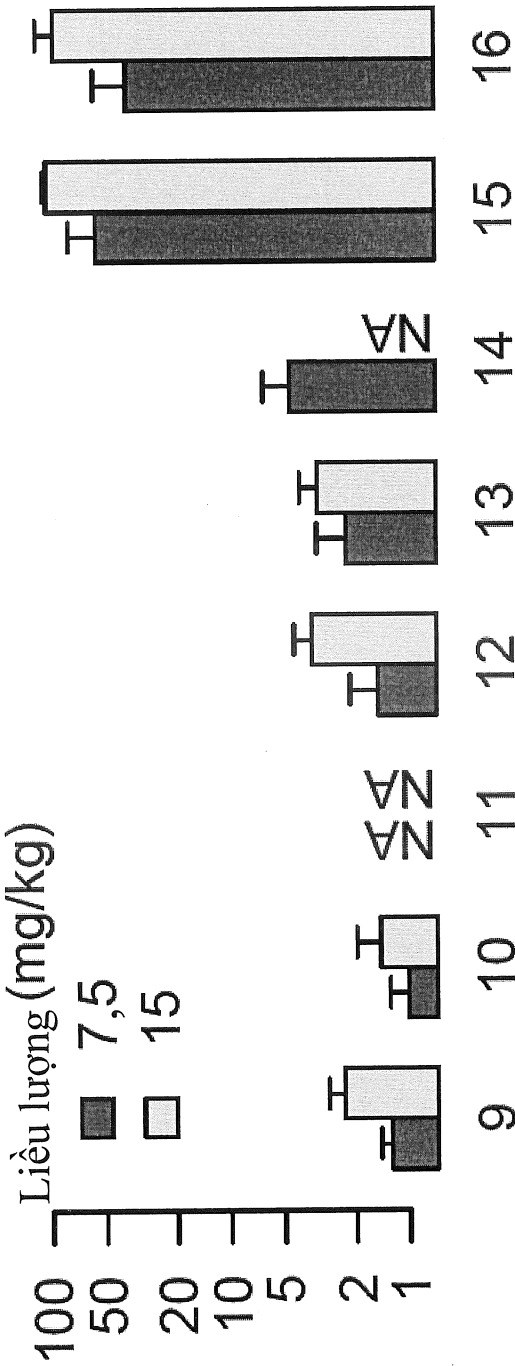


Fig. 10



ALT (đã được xử lý/ dung dịch nước muối)

Fig. 11



SEQ ID NO.

Fig. 12

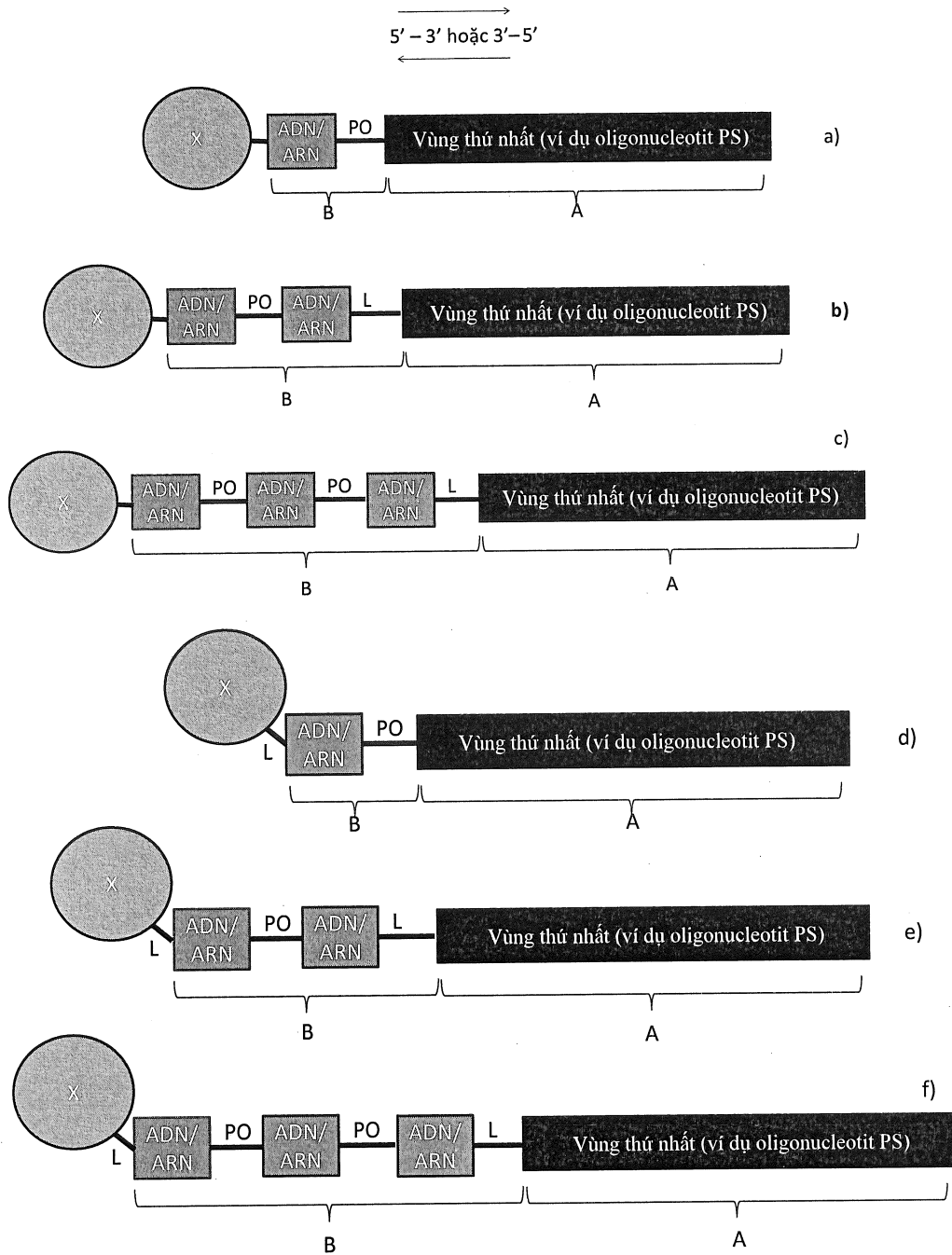


Fig. 13

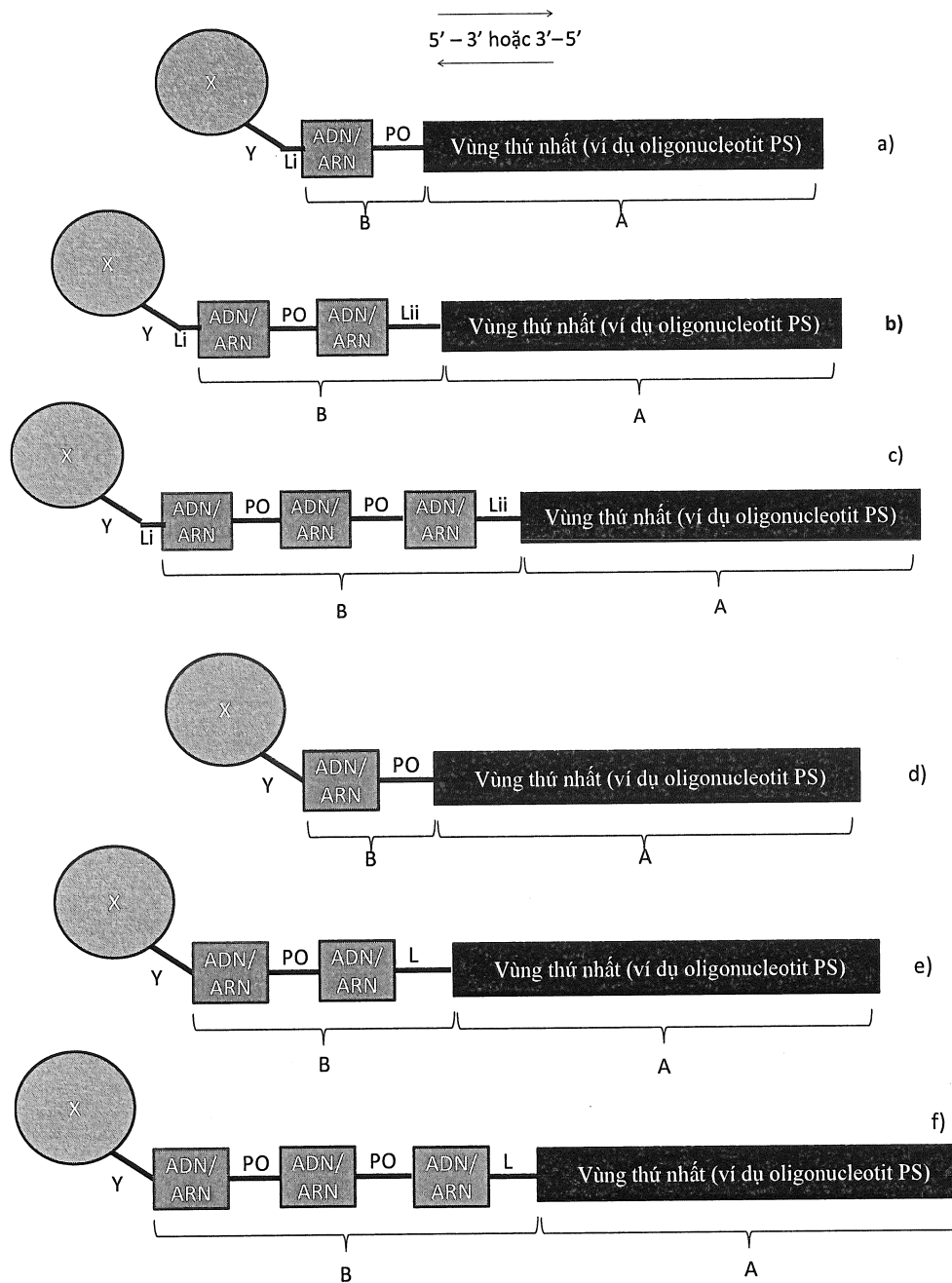
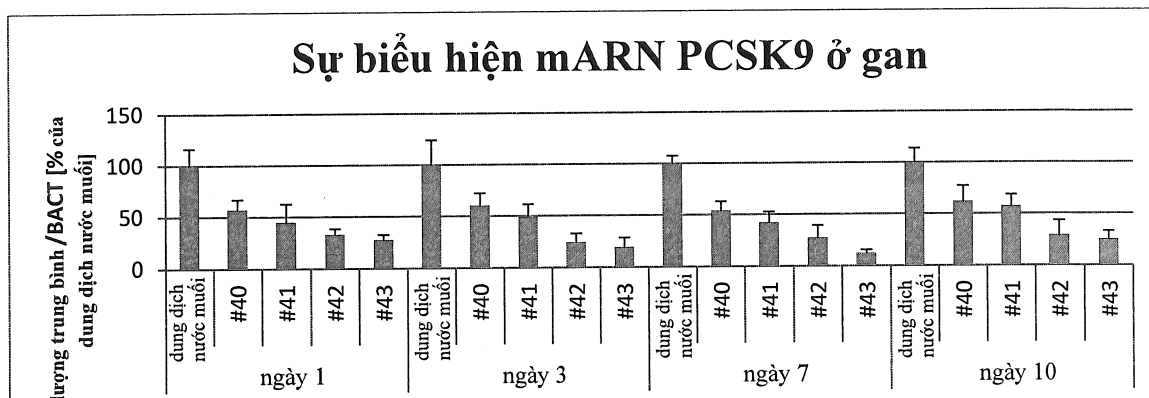


Fig 14

A



B

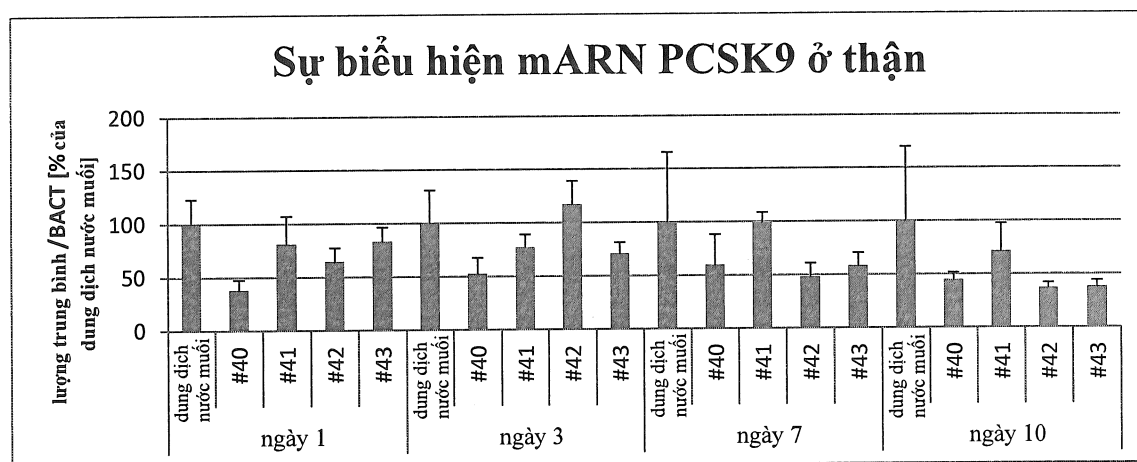


Fig. 15

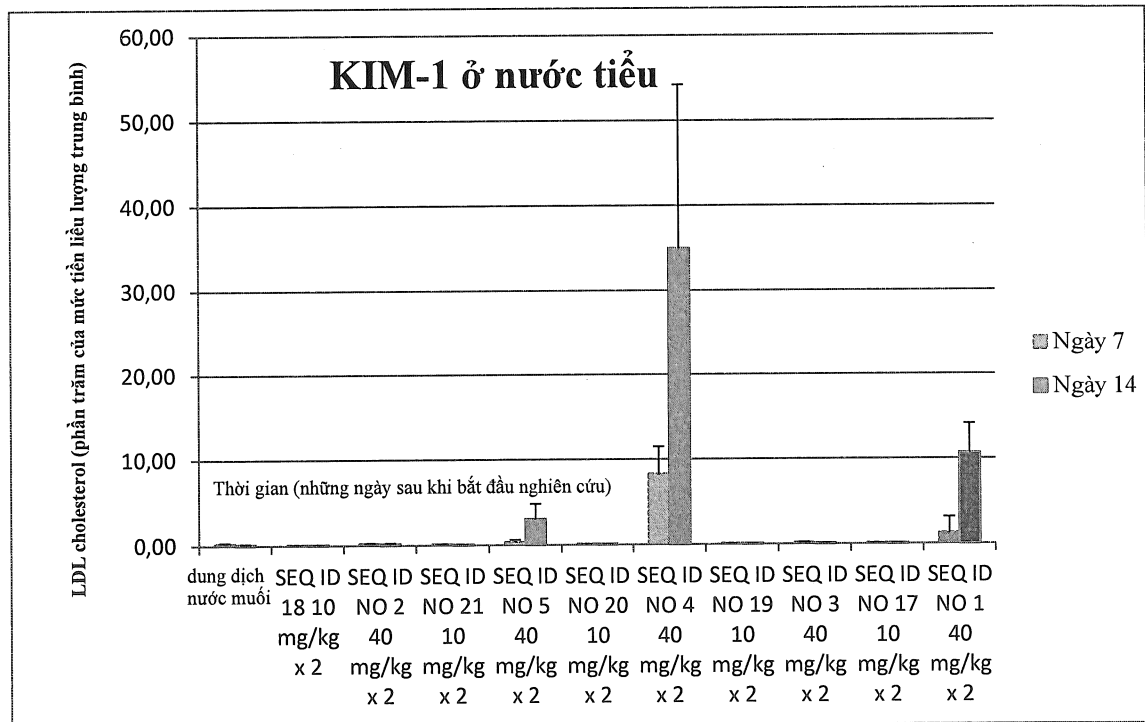


Fig. 16

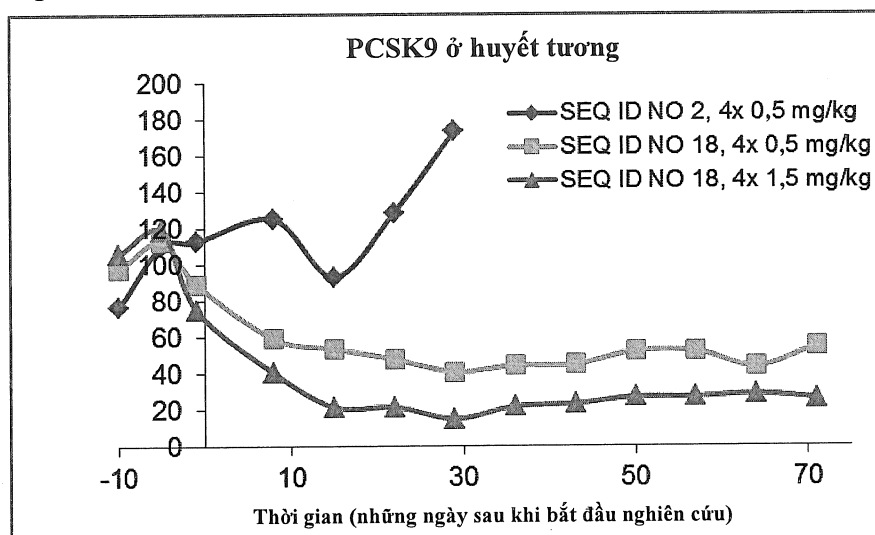


Fig. 16 (tiếp tục)

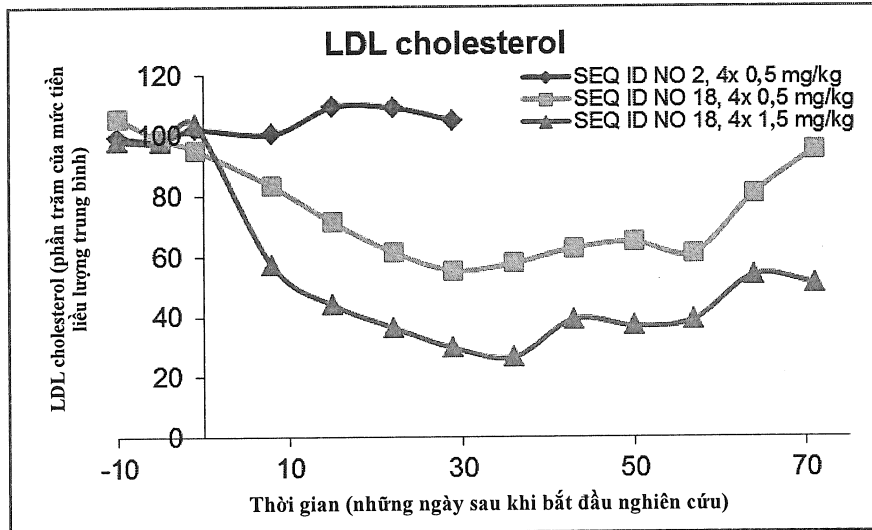
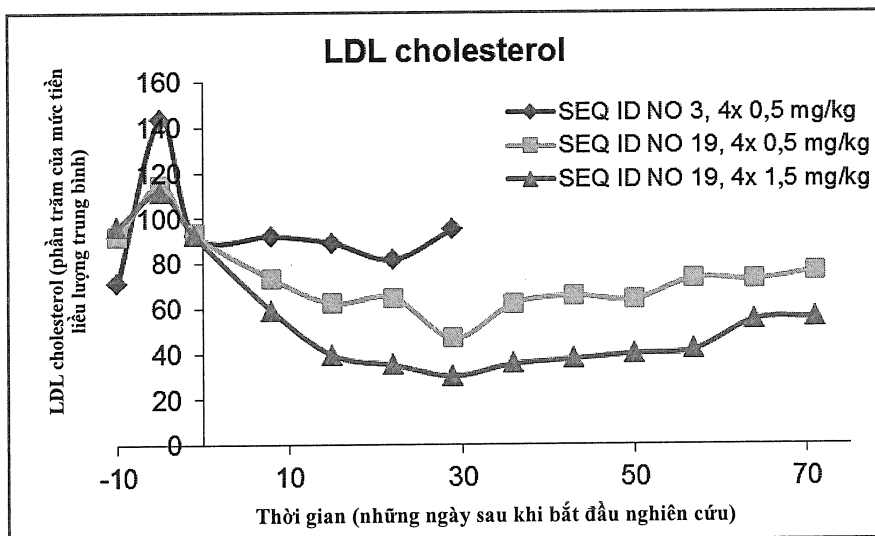
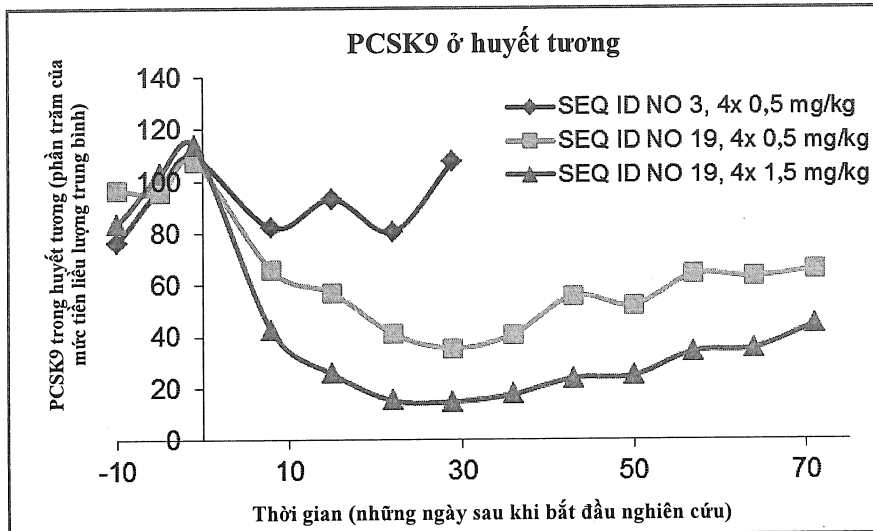


Fig. 17



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ROCHE INNOVATION CENTER COPENHAGEN A/S

<120> Hợp chất bao gồm oligome đối nghĩa, thể liên hợp oligonucleotit đối nghĩa, dược phẩm chứa hợp chất này, phương pháp in vitro làm giảm mức biểu hiện và/hoặc hoạt tính của proprotein convertaza subtilisin/kexin typ 9 (PCSK9), và phương pháp sản xuất hợp chất và thể liên hợp này

<130> 1141WO

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> ADN

<213> NHÂN TẠO

<220>

<223> LNA gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(14)

<223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(14)

<223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 1

tgctacaaaa ccca

14

<210> 2

<211> 16

<212> ADN

<213> NHÂN TẠO

<220>

<223> LNA gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(16)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(16)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 2
 aatgctacaa aaccca

16

<210> 3
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 3
 aatgctacaa aaccca

16

<210> 4
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)

<223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> LNA nucleosit

<400> 4

gctgtgtgag cttgg

15

<210> 5

<211> 16

<212> ADN

<213> NHÂN TẠO

<220>

<223> LNA gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> LNA nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(16)

<223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> LNA nucleosit

<400> 5

tgctgtgtga gcttgg

16

<210> 6

<211> 16

<212> ADN

<213> NHÂN TẠO

<220>

<223> LNA gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(16)

<223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA nucleosit

<400> 6
 tgctgtgtga gcttgg

16

<210> 7
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 7
 tcctgggtctg tgttcc

16

<210> 8
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> LNA gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 8
 tcctggtctg tggtcc

16

<210> 9
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Các liên kết giữa phosphodiester nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(16)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 9
 catgctacaa aaccca

16

<210> 10
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Các liên kết giữa phosphodiester nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> LNA nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(18)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-methyl C

<400> 10
 caaatgctac aaaaccca

18

<210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Các liên kết giữa phosphodiester nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> LNA nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(18)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 11
 caaatgctac aaaaccca

18

<210> 12
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Các liên kết giữa phosphodiester nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(17)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> LNA nucleosit

<400> 12
 cagctgtgtg agcttgg

17

<210> 13
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Các liên kết giữa phosphodiester nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> LNA nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(18)
 <223> LNA nucleosit

<400> 13
 catgctgtgt gagcttgg

18

<210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Các liên kết giữa phosphodiester nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(18)
 <223> LNA nucleosit

<400> 14
 catgctgtgt gagcttgg

18

<210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Các liên kết giữa phosphodiester nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(18)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 15
 catcctggtc tgtgttcc

18

<210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Các liên kết giữa phosphodiester nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(18)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-methyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-methyl C

<400> 16
 catcctgggc tgtgttcc

18

<210> 17
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(14)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-methyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 17
 tgctacaaaa ccca

14

<210> 18
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(16)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 18
 aatgctacaa aaccca

16

<210> 19
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a

<220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 19
 aatgctacaa aaccca

16

<210> 20
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> LNA nucleosit

<400> 20
 gctgtgtgag cttgg

15

<210> 21
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>

<223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> GalNAc Conj2a

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> LNA nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(16)

<223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> LNA nucleosit

<400> 21

tgctgtgtga gcttgg

16

<210> 22

<211> 16

<212> ADN

<213> NHÂN TẠO

<220>

<223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> GalNAc Conj2a

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(16)

<223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> LNA nucleosit

<400> 22

tgctgtgtga gcttgg

16

<210> 23
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(16)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 23
 tcctgggtctg tgttcc

16

<210> 24
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> GalNAc Conj2a

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(3)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 24
 tcctggtctg tgttcc

16

<210> 25
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> motif trình tự nucleobazo

<400> 25
 tgctacaaaa ccca

14

<210> 26
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> motif trình tự nucleobazo

<400> 26
 aatgctacaa aaccca

16

<210> 27
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> motif trình tự nucleobazo

<400> 27
 gctgtgtgag cttgg

15

<210> 28
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> NHÂN TẠO

<220>
 <223> motif trình tự nucleobazo

<400> 28

tgctgtgtga gcttgg	16
<210> 29	
<211> 16	
<212> ADN	
<213> NHÂN TẠO	
<220>	
<223> motif trình tự nucleobazo	
<400> 29	
tcctggtctg tgttcc	16
<210> 30	
<211> 14	
<212> ARN	
<213> Homo sapiens	
<400> 30	
uggguuuugu agca	14
<210> 31	
<211> 16	
<212> ARN	
<213> Homo sapiens	
<400> 31	
uggguuuugu agcauu	16
<210> 32	
<211> 15	
<212> ARN	
<213> Homo sapiens	
<400> 32	
ccaagcucac acagc	15
<210> 33	
<211> 16	
<212> ARN	
<213> Homo sapiens	
<400> 33	
ccaagcucac acagca	16
<210> 34	
<211> 16	
<212> ARN	
<213> Homo sapiens	
<400> 34	

ggaacacaga ccagga

16

<210> 35

<211> 16

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Các liên kết giữa phosphodiester nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Thẻ tiếp hợp FAM

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(16)

<223> Các liên kết giữa phosphothioate nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> LNA nucleosit, LNA C là 5-methyl C

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> LNA nucleosit, LNA C là 5-methyl C

<400> 35

tcagcattgg tattca

16

<210> 36

<211> 15

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Các liên kết giữa phosphodiester nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)
 <223> Thẻ tiếp hợp FAM

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(15)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(15)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 36
 cagcattgggt attca

15

<210> 37
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Các liên kết giữa phosphodiester nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Thẻ tiếp hợp FAM

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(14)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 37

agcattggta ttca

14

<210> 38

<211> 16

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Các liên kết giữa phosphodiester nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Thẻ tiếp hợp FAM

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(16)

<223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> LNA nucleosit, LNA C là 5-methyl C

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(16)

<223> LNA nucleosit, LNA C là 5-methyl C

<400> 38

gacgcattgg tattca

16

<210> 39

<211> 13

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Thẻ tiếp hợp FAM

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 39
 gcattggtat tca

13

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

<220>
 <223> LNA gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> LNA nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(13)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 40
 gtctgtggaa gcg

13

<210> 41
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)

<223> Cholesterol-C6

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(13)

<223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> LNA nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(13)

<223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 41

gtctgtggaa gcg

13

<210> 42

<211> 15

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Cholesterol-C6

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Các liên kết giữa phosphodiester nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> LNA nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(15)

<223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(15)

<223> LNA nucleosit, LNA C là 5-metyl C

<400> 42

cagtctgtgg aagcg

15

<210> 43
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> LNA thẻ tiếp hợp gapme oligonucleotit đối nghĩa

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Cholesterol-C6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Các liên kết giữa phosphodiester nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> LNA nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(15)
 <223> Các liên kết giữa phosphothioat nucleosit

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(15)
 <223> LNA nucleosit, LNA C là 5-methyl C

<400> 43
 ctgtctgtgg aagcg

15

<210> 44
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> motif trình tự nucleobazo

<400> 44
 gtctgtggaa gcg

13

<210> 45
 <211> 13
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

<400> 45
cgcuuccaca gac

13

<210> 46
<211> 3731
<212> ADN
<213> homo sapiens

<400> 46
gtccgatggg gctctggtgg cgtgatctgc gcgcccagg cgtcaagcac ccacacccta 60
gaaggtttcc gcagcgacgt cgaggcgctc atggttgacg gcgggcgccg ccgttcagtt 120
cagggctctga gcctggagga gtgagccagg cagtgagact ggctcgggcg ggccgggacg 180
cgtcgttgca gcagcggctc ccagctccca gccaggattc cgcgcgcccc ttcacgcgcc 240
ctgctcctga acttcagctc ctgcacagtc ctccccaccg caaggctcaa ggcgcgcgccg 300
gcgtggaccg cgcacggcct ctaggtctcc tcgccaggac agcaacctct cccctggccc 360
tcatgggcac cgtcagctcc aggcggctct ggtggccgct gccactgctg ctgctgctgc 420
tgctgctcct ggggtcccgcg ggcgcccgtg cgcaggagga cgaggacggc gactacgagg 480
agctggtgct agccttgctg tccgaggagg acggcctggc cgaagcaccc gagcacggaa 540
ccacagccac cttccaccgc tgcgccaagg atccgtggag gttgcctggc acctacgtgg 600
tggtgctgaa ggaggagacc cacctctcgc agtcagagcg cactgcccgc cgctgcagg 660
cccaggctgc ccgcccggga tacctacca agatcctgca tgtcttccat ggccttcttc 720
ctggcttcct ggtgaagatg agtggcgacc tgctggagct ggccttgaag ttgccccatg 780
tcgactacat cgaggaggac tcctctgtct ttgccagag catcccgtgg aacctggagc 840
ggattacccc tccacggtac cgggcggatg aataccagcc ccccgacgga ggcagcctgg 900
tggaggtgta tctcctagac accagcatac agagtgaaca ccgggaaatc gagggcaggg 960
tcatggtcac cgacttcgag aatgtgcccg aggaggacgg gaccgccttc cacagacagg 1020
ccagcaagtg tgacagtcac ggcacccacc tggcaggggt ggtcagcggc cgggatgccg 1080
gcgtggccaa ggggtgccagc atgcgcagcc tgcgcgtgct caactgccaa gggaagggca 1140
cggtagcgcg caccctcata ggctggagt ttattcggaa aagccagctg gtccagcctg 1200
tggggccact ggtggtgctg ctgcccctgg cgggtgggta cagccgcgtc ctcaacgccg 1260
cctgccagcg cctggcgagg gctggggctg tgctggtcac cgctgccggc aacttcgggg 1320
acgatgcctg cctctactcc ccagcctcag ctcccaggt catcacagtt ggggccacca 1380
atgcccaaga ccagccggtg accctgggga ctttggggac caactttggc cgctgtgtgg 1440

acctctttgc	cccaggggag	gacatcattg	gtgcctccag	cgactgcagc	acctgctttg	1500
tgtcacagag	tgggacatca	caggctgctg	cccacgtggc	tggcattgca	gcatgatgc	1560
tgtctgccga	gccggagctc	accctggccg	agttgaggca	gagactgatc	cacttctctg	1620
ccaaagatgt	catcaatgag	gcctggttcc	ctgaggacca	gcgggtactg	acccccaacc	1680
tgggtggccgc	cctgcccccc	agcaccatg	gggcaggttg	gcagctgttt	tgcaggactg	1740
tatggtcagc	acactcgggg	cctacacgga	tggccacagc	cgtcgcccgc	tgcgccccag	1800
atgaggagct	gctgagctgc	tccagtttct	ccaggagtgg	gaagcggcgg	ggcgagcgca	1860
tggaggccca	agggggcaag	ctggctctgc	gggccacaaa	cgcttttggg	ggtgaggggtg	1920
tctacgccat	tgccagggtgc	tgctgctac	cccaggccaa	ctgcagcgtc	cacacagctc	1980
caccagctga	ggccagcatg	gggaccctg	tccactgcca	ccaacagggc	cacgtcctca	2040
caggctgcag	ctcccactgg	gaggtggagg	accttggcac	ccacaagccg	cctgtgctga	2100
ggccacgagg	tcagcccaac	cagtgcgtgg	gccacaggga	ggccagcatc	cacgcttcct	2160
gctgccatgc	cccaggctctg	gaatgcaaag	tcaaggagca	tggaatcccg	gcccctcagg	2220
agcaggtgac	cgtggcctgc	gaggagggct	ggaccctgac	tggctgcagt	gcccctccctg	2280
ggacctccca	cgtcctgggg	gcctacgccg	tagacaacac	gtgtgtagtc	aggagccggg	2340
acgtcagcac	tacaggcagc	accagcgaag	gggccgtgac	agccgttgcc	atctgctgcc	2400
ggagccggca	cctgggcgag	gcctcccagg	agctccagt	acagcccat	cccaggatgg	2460
gtgtctgggg	aggggtcaagg	gctggggctg	agctttaaaa	tggttccgac	ttgtccctct	2520
ctcagccctc	catggcctgg	cacgagggga	tggggatgct	tccgcctttc	cggggctgct	2580
ggcctggccc	ttgagtgggg	cagcctcctt	gcctggaact	cactcactct	gggtgcctcc	2640
tccccagggtg	gaggtgccag	gaagctccct	ccctcactgt	ggggcatttc	accattcaaa	2700
caggtcgagc	tgtgctcggg	tgctgccagc	tgctcccaat	gtgccgatgt	ccgtgggcag	2760
aatgactttt	attgagctct	tgttccgtgc	caggcattca	atcctcaggt	ctccaccaag	2820
gaggcaggat	tcttcccatg	gataggggag	ggggcggtag	gggctgcagg	gacaaacatc	2880
gttgggggggt	gagtgtgaaa	ggtgctgatg	gccctcatct	ccagctaact	gtggagaagc	2940
ccctggggggc	tccctgatta	atggaggctt	agctttctgg	atggcatcta	gccagaggct	3000
ggagacaggt	gcgcccctgg	tggtcacagg	ctgtgccttg	gtttcctgag	ccacctttac	3060
tctgctctat	gccaggctgt	gctagcaaca	cccaaagggtg	gcctgcgggg	agccatcacc	3120

taggactgac tcggcagtgt gcagtgggtgc atgcactgtc tcagccaacc cgctccacta	3180
cccggcaggg tacacattcg caccctact tcacagagga agaaacctgg aaccagaggg	3240
ggcgtgcctg ccaagctcac acagcaggaa ctgagccaga aacgcagatt gggctggctc	3300
tgaagccaag cctcttctta cttcacccgg ctgggctcct catttttacg ggtaacagtg	3360
aggctgggaa ggggaacaca gaccaggaag ctcggtgagt gatggcagaa cgatgcctgc	3420
aggcatggaa ctttttccgt tatcacccag gcctgattca ctggcctggc ggagatgctt	3480
ctaaggcatg gtcgggggag agggccaaca actgtccctc cttgagcacc agccccaccc	3540
aagcaagcag acatttatct tttgggtctg tcctctctgt tgccttttta cagccaactt	3600
ttctagacct gttttgcttt tgtaacttga agatatttat tctgggtttt gtagcatttt	3660
tattaatatg gtgacttttt aaaataaaaa caaacaacg ttgtcctaac aaaaaaaaaa	3720
aaaaaaaaa a	3731