



(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)



1-0036439

(51)⁷ C12N 15/09; A61K 31/712; C12N
15/113; A61P 21/00; A61K 31/711;
A61K 31/7125

(13) B

(21) 1-2016-03643

(22) 11/03/2015

(86) PCT/JP2015/057180 11/03/2015

(87) WO2015/137409 17/09/2015

(30) 2014-048897 12/03/2014 JP

(45) 25/07/2023 424

(43) 26/12/2016 345A

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

14, Kisshoin Nishinosho Monguchicho, Minami-ku, Kyoto-shi, Kyoto 601-8550,
Japan

2. NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY (JP)

1-1, Ogawahigashi-cho 4-chome, Kodaira-shi, Tokyo, 187-8551, Japan

(72) WAKAYAMA Tatsushi (JP); SEO Haruna (JP); SATOU Youhei (JP); TAKEDA
Shin'ichi (JP); NAGATA Tetsuya (JP).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

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

(57) Sáng chế đề cập đến oligome đối nghĩa có khả năng gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa oligome đối nghĩa này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến oligome đối nghĩa gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người và được phẩm chứa oligome này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

DMD được biết là gây ra bởi sự đột biến trong gen dystrophin. Gen dystrophin nằm trên nhiễm sắc thể X và là gen rất lớn bao gồm 2,2 triệu cặp nucleotit của ADN. ADN được phiên mã thành các tiền thân mARN, và các intron được loại bỏ bằng sự cắt bỏ để tổng hợp mARN với khoảng 11.058 bazơ, trong đó 79 exon được kết hợp cùng nhau. mARN được dịch mã thành 3.685 axit amin để tạo thành protein dystrophin. Protein dystrophin liên quan đến sự duy trì sự ổn định màng trong các tế bào cơ và cần để giúp các tế bào cơ ít bị phá hủy. Gen dystrophin ở bệnh nhân mắc DMD có đột biến và do đó, protein dystrophin, là protein chức năng ở tế bào cơ hiếm khi được biểu hiện. Do đó, cấu trúc của các tế bào cơ không thể được duy trì trong cơ thể của bệnh nhân mắc DMD, dẫn đến sự tràn lượng lớn của các ion canxi vào các tế bào cơ. Hậu quả là, đáp ứng dạng viêm xảy ra để thúc đẩy sự xơ hóa khiến các tế bào cơ chỉ có thể được

tạo ra với trở ngại.

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

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

Sự bỏ qua exon có thể được cảm ứng bằng cách liên kết các axit nucleic đối nghĩa hướng đích là vị trí cắt nối đầu 5' hoặc 3' hoặc cả hai vị trí, hoặc vị trí các exon

bên trong. Exon sẽ chỉ được bao gồm trong mARN khi cả hai vị trí cắt nối của nó được nhận diện bởi phức spliceosome. Do vậy, sự bỏ qua exon có thể được cảm ứng bằng cách hướng đích các vị trí cắt nối với các axit amin đối nghĩa. Ngoài ra, sự liên kết của protein SR với vùng trình tự tăng cường cắt nối trong exon (Exonic Splicing Enhancer - ESE) được xem là cần thiết cho exon để được nhận diện bởi cơ chế cắt nối. Do đó, sự bỏ qua exon có thể được giảm đi bằng cách hướng đích ESE.

Vì sự đột biến của gen dystrophin có thể thay đổi phụ thuộc vào bệnh nhân mắc DMD, các axit nucleic đối nghĩa cần được thiết kế dựa trên vị trí hoặc loại đột biến gen tương ứng. Trước đây, các axit nucleic đối nghĩa gây ra sự bỏ qua exon cho 79 exon được tạo ra bởi Steve Wilton, et al., University of Western Australia (tài liệu phi sáng chế 3), và các axit nucleic đối nghĩa gây ra sự trượt exon đối với 39 exon được tạo ra bởi Annemieke Aartsma-Rus, et al., Netherlands (tài liệu phi sáng chế 4).

Đã thấy rằng có khoảng 13% trong số các bệnh nhân mắc DMD có thể được điều trị bằng cách bỏ qua exon 51 (sau đây được đề cập là "exon 51"). Trong những năm gần đây, nhiều tổ chức nghiên cứu đã báo cáo về các thử nghiệm trong đó exon 51 trong gen dystrophin được hướng đích để bỏ qua exon (Patent Documents từ 1 đến 6; các tài liệu phi sáng chế từ 5 đến 6). Tuy nhiên, kỹ thuật để bỏ qua exon 51 với hiệu quả cao chưa được xây dựng.

Tài liệu tình trạng kỹ thuật đã biết

Tài liệu sáng chế:

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

Tài liệu sáng chế 2: Công bố đơn quốc tế WO 2002/024906

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

Tài liệu sáng chế 4: Công bố đơn quốc tế WO 2010/050801

Tài liệu sáng chế 5: US 2010/0168212

Tài liệu phi sáng chế 1: Monaco A. P. et al., Genomics 1988; 2: p. 90-95

Tài liệu phi sáng chế 2: Matsuo M., Brain Dev 1996; 18: p. 167-172

Tài liệu phi sáng chế 3: Wilton S. D., et al., Molecular Therapy 2007; 15: p. 1288-96

Tài liệu phi sáng chế 4: Annemieke Aartsma-Rus et al., (2002) Neuromuscular Disorders 12: S71-S77

Tài liệu phi sáng chế 5: Aoki Y., et al., Molecular therapy 2010; 18: p.1995-2005

Tài liệu phi sáng chế 6: Nakano S., et al., Pediatr Int. 2011; 53: 524-429

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Trong các trường hợp nêu trên đây, các oligome đối nghĩa gây ra sự bỏ qua exon 51 ở gen dystrophin với hiệu quả cao và các dược phẩm điều trị chứng loạn dưỡng cơ chứa oligome của nó đang được mong đợi.

Từ kết quả của các nghiên cứu chi tiết và nội dung kỹ thuật của các tài liệu trên đây và cấu trúc của gen dystrophin, các tác giả sáng chế đã thấy rằng sự bỏ qua exon 51 có thể được gây ra với hiệu quả cao bằng cách dùng oligome đối nghĩa có các trình tự nucleotit được biểu diễn bởi SEQ ID NO:1 và 2. Dựa trên phát hiện này, các tác giả sáng chế đã hoàn thiện sáng chế.

Đó là, sáng chế là như sau.

[1] Oligome đối nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (d) dưới đây:

(a) oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2;

(b) oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit có sự xóa, thay thế, chèn và/hoặc thêm từ 1 đến 5 nucleotit trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2, và có hoạt tính gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người;

(c) oligome đối nghĩa có trình tự nucleotit có ít nhất 80% độ đồng nhất với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 và có hoạt tính gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen

dystrophin của người; và

(d) oligome đối nghĩa lai được trong các điều kiện nghiêm ngặt với oligonucleotit chứa trình tự nucleotit bổ sung với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 và có hoạt tính gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người.

[2] Oligome đối nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm (e) đến (h) dưới:

(e) oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2;

(f) oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit có sự xóa, thay thế, chèn và/hoặc thêm từ 1 đến 3 nucleotit trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2, và có hoạt tính gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người;

(g) oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit có ít nhất 80% độ đồng nhất với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 và có hoạt tính gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người; và

(h) oligome đối nghĩa lai được trong các điều kiện nghiêm ngặt với oligonucleotit chứa trình tự nucleotit bổ sung với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 và có hoạt tính gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người.

[3] Oligome đối nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm (i) và (j) dưới đây:

(i) oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2; và

(j) oligome đối nghĩa có trình tự nucleotit có ít nhất 90% độ đồng nhất với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 và có hoạt tính gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người.

[4] Oligome đối nghĩa theo một trong số các mục từ [1] đến [3] trên đây, là oligonucleotit.

[5] Oligome đối nghĩa theo mục [4] trên đây, trong đó gốc đường và/hoặc vùng liên

kết với phosphat của ít nhất một nucleotit tạo thành oligonucleotit được cải biến.

[6] Oligome đối nghĩa theo mục [4] hoặc [5] trên đây, trong đó gốc đường của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit là đường riboza trong đó nhóm 2'-OH được thay bằng nhóm bất kỳ trong số các nhóm bao gồm OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br và I (trong đó R là alkyl hoặc aryl và R' là alkylen).

[7] Oligome đối nghĩa theo mục bất kỳ trong số các mục từ [4] đến [6] trên đây, trong đó vùng liên kết với phosphat của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit là nhóm bất kỳ trong số các nhóm bao gồm liên kết phosphorothioat, liên kết phosphorodithioat, liên kết alkylphosphonat, liên kết phosphoramidat và liên kết boranophosphat.

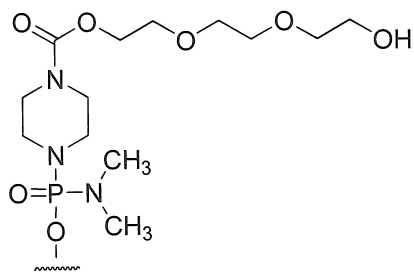
[8] Oligome đối nghĩa theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3] trên đây, là oligome morpholino.

[9] Oligome đối nghĩa theo mục [8] trên đây, trong đó gốc vòng morpholin, vùng liên kết với phosphat, đầu 3' và/hoặc đầu 5' của ít nhất một morpholino cấu thành oligome morpholino được cải biến.

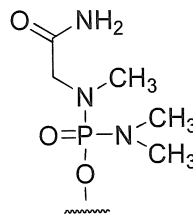
[10] Oligome đối nghĩa theo mục [9] hoặc [10] trên đây, trong đó vùng liên kết với phosphat của ít nhất một morpholino cấu thành oligome morpholino là bất kỳ vùng liên kết được chọn từ liên kết phosphorodiamidat, liên kết phosphorothioat, liên kết phosphorodithioat, liên kết alkylphosphonat, liên kết phosphoramidat và liên kết boranophosphat.

[11] Oligome đối nghĩa theo mục [10] trên đây, là oligome phosphorodiamidat morpholino.

[12] Oligome đối nghĩa theo mục bất kỳ trong số các mục từ [9] đến [11] trên đây, trong đó đầu 5' là một trong số các công thức hóa học từ (1) đến (3) dưới đây:



(1)



(2)



(3)

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

[14] Dược phẩm theo mục [13] trên đây, chứa chất mang dược dụng.

[15] Phương pháp điều trị chứng loạn dưỡng cơ, bao gồm bước cho bệnh nhân mắc chứng loạn dưỡng cơ dùng oligome đối nghĩa theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [12] trên đây hoặc dược phẩm theo mục [13] hoặc [14] trên đây.

[16] Phương pháp điều trị theo mục [15] trên đây, trong đó bệnh nhân mắc chứng loạn dưỡng cơ là bệnh nhân có sự xóa các nucleotit trong các exon số 29-50, 50, 45-50, 48-50, 49-50, 52, 52-63, 13-50, 19-50, 43-50 hoặc 47-50.

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

[18] Sử dụng oligome đối nghĩa theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [12] trên đây trong sản xuất dược phẩm để điều trị chứng loạn dưỡng cơ.

[19] Oligome đối nghĩa theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [12] trên đây, để dùng trong điều trị chứng loạn dưỡng cơ.

[20] Oligome đối nghĩa theo [19] trên đây, trong đó bệnh nhân mắc chứng loạn dưỡng cơ trong điều trị này là bệnh nhân có sự xóa các nucleotit trong các exon 29-50, 50, 45-50, 48-50, 49-50, 52, 52-63, 13-50, 19-50, 43-50 hoặc 47-50.

[21] Oligome đối nghĩa theo [19] hoặc [20] trên đây, trong đó bệnh nhân là người.

Hiệu quả của sáng chế

Oligome đối nghĩa theo sáng chế có thể gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người với hiệu quả cao. Tương tự, các triệu chứng của chứng loạn dưỡng cơ Duchenne có thể được làm giảm một cách có hiệu quả bằng cách dùng được phẩm theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig. 1 thể hiện hiệu quả của sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người ở dòng tế bào tế bào sarcoma cơ vân (dòng tế bào RD).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết. Các phương án được mô tả dưới đây nhằm để được thể hiện bằng cách ví dụ chỉ để mô tả sáng chế mà không giới hạn sáng chế ở các phương án này. Sáng chế có thể được thực hành theo nhiều cách khác nhau, mà không chệch khỏi bản chất của sáng chế.

1. Oligome đối nghĩa

Sáng chế đề xuất oligome đối nghĩa (sau đây được đề cập là “oligome đối nghĩa theo sáng chế”) gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người với hiệu quả cao.

Exon 51 trong gen dystrophin của người

Trong sáng chế, thuật ngữ “gen” nhằm có nghĩa là gen thuộc bộ gen và cũng bao gồm cADN, tiền mARN và mARN. Tốt hơn là, gen là tiền mARN, đó là pre-mARN.

Trong hệ gen người, gen dystrophin của người nằm ở locus Xp21.2. Gen

dystrophin của người có kích thước là 2,2 triệu cặp nucleotit và là gen lớn nhất trong số các gen người đã biết. Tuy nhiên, các vùng mã hóa của gen dystrophin của người chỉ là 14kb, phân bố thành 79 exon trong suốt gen dystrophin của người (Roberts, RG, et al., Genomics, 16: 536-538 (1993)). Pre-mARN, là đoạn phiên mã của gen dystrophin của người, trải qua việc cắt nối để tạo thành mARN cuối là 14 kb. Trình tự nucleotit của gen dystrophin kiểu đại của người là đã được biết đến (số tiếp cận ngân hàng gen là NM_004006).

Trình tự nucleotit của exon 51 trong gen dystrophin kiểu đại của người được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

Oligome đối nghĩa

Oligome đối nghĩa theo sáng chế được thiết kế để gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người, nhờ đó cải biến protein được mã hóa bởi loại gen dystrophin của DMD thành loại protein dystrophin của BMD. Do đó, exon 51 trong gen dystrophin là đích của sự bỏ qua exon bởi oligome đối nghĩa bao gồm cả dạng đại và dạng đột biến.

Oligome đối nghĩa theo sáng chế cụ thể là oligome đối nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (d) dưới đây.

- (a) oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2;
- (b) oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit có sự xóa, thay thế, chèn và/hoặc thêm từ 1 đến 5 nucleotit trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2, và có hoạt tính gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người;
- (c) oligome đối nghĩa có trình tự nucleotit có ít nhất 80% độ đồng nhất với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người; và

(d) oligome đối nghĩa lai được trong các điều kiện nghiêm ngặt với oligonucleotit chứa trình tự nucleotit bổ sung với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người.

Các oligome đối nghĩa từ (b) đến (d) là các thể đột biến của oligome đối nghĩa của (a) cụ thể và được định hướng để tương ứng với các đột biến của gen dystrophin của bệnh nhân, ví dụ dạng đa hình.

Theo phương án khác, oligome đối nghĩa theo sáng chế cụ thể là oligome đối nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm (k) đến (n) dưới đây.

(k) Oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit được thể hiện bởi bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 6 đến 33;

(l) Oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit có sự xóa, thay thế, chèn và/hoặc thêm từ 1 đến 5 các nucleotit trong trình tự nucleotit được thể hiện bởi một trong số các SEQ ID NOS: 6 đến 33, và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người;

(m) Oligome đối nghĩa có trình tự nucleotit có ít nhất 80% độ đồng nhất với trình tự nucleotit của bất kỳ một trong số các SEQ ID NOS: 6 đến 33 và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người; và

(n) Oligome đối nghĩa lai được trong các điều kiện nghiêm ngặt với oligonucleotit chứa trình tự nucleotit bổ sung với trình tự nucleotit được thể hiện bởi bất kỳ một trong số các SEQ ID NOS: 6 đến 33 và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người.

Các oligome đối nghĩa từ (l) đến (n) là các thể đột biến của oligome đối nghĩa của (k) cụ thể và được định hướng để tương ứng với các đột biến của gen dystrophin của bệnh nhân, ví dụ dạng đa hình.

Tương tự, oligome đối nghĩa theo sáng chế là oligome đối nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm (o) đến (r) dưới đây.

(o) Oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit được thể hiện bởi một trong số các SEQ ID NO: 6 đến 33;

(p) Oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit có sự xóa, thay thế, chèn và/hoặc thêm từ 1 đến 3 các nucleotit trong trình tự nucleotit được thể hiện bởi một trong số các SEQ ID NO: 6 đến 33, và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người;

(q) Oligome đối nghĩa có trình tự nucleotit có ít nhất 80% độ đồng nhất với trình tự nucleotit của bất kỳ một trong số các SEQ ID NOS: 6 đến 33 và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người; và

(r) Oligome đối nghĩa mà lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với oligonucleotit chứa trình tự nucleotit bổ sung với trình tự nucleotit được thể hiện bởi bất kỳ một trong số các SEQ ID NOS: 6 đến 33 và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người.

Ngoài ra, oligome đối nghĩa theo sáng chế là oligome đối nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm (i) và (j) dưới đây:

(i) Oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit của bất kỳ một trong số các SEQ ID NOS: 6 đến 33; hoặc

(j) Oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit có ít nhất 90% độ đồng nhất với trình tự nucleotit của bất kỳ một trong số các SEQ ID NOS: 6 đến 33 và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "oligome đối nghĩa mà lai được trong các điều kiện nghiêm ngặt" đề cập đến, ví dụ, oligome đối nghĩa thu được

bằng cách lai khuẩn lạc, lai vết tan, lai Southern hoặc kỹ thuật lai tương tự, sử dụng làm đoạn dò, toàn bộ hoặc một phần oligonucleotit chứa trình tự nucleotit bổ sung với trình tự nucleotit của, *ví dụ*, SEQ ID NO: 1. Phương pháp lai có thể được sử dụng bao gồm các phương pháp được mô tả trong, *ví dụ*, "Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001," "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997," v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” có thể là bất kỳ trong số các điều kiện nghiêm ngặt thấp, các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải hoặc các điều kiện nghiêm ngặt cao. Thuật ngữ “điều kiện nghiêm ngặt thấp” là, *ví dụ*, 5x SSC, 5x dung dịch của Denhardt, 0,5% SDS, 50% formamit ở 32°C. Thuật ngữ “điều kiện nghiêm ngặt vừa phải” là, *ví dụ*, 5x SSC, 5x dung dịch của Denhardt, 0,5% SDS, 50% formamit at 42°C, hoặc 5x SSC, 1% SDS, 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 50% formamit at 42°C. Thuật ngữ “điều kiện nghiêm ngặt cao” là, *ví dụ*, (1) 5x SSC, 5x dung dịch của Denhardt, 0,5% SDS, 50% formamit ở 50°C, (2) 0,2x SSC, 0,1% SDS ở 60°C, (3) 0,2x SSC, 0,1% SDS ở 62°C, (4) 0,2x SSC, 0,1% SDS ở 65°C, hoặc (5) 0,1x SSC, 0,1% SDS ở 65°C, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Trong các điều kiện này, oligome đối nghĩa với độ tương đồng cao hơn được mong đợi là thu được một cách hiệu quả ở các nhiệt độ cao hơn, mặc dù nhiều yếu tố liên quan đến sự nghiêm ngặt để lai bao gồm nhiệt độ, đoạn dò concentration, nồng độ đoạn dò, độ mạnh ion, thời gian, nồng độ muối và các yếu tố khác, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể lựa chọn một cách xấp xỉ các yếu tố này để đạt được sự nghiêm ngặt tương tự.

Khi các kit có bán trên thị trường được sử dụng để lai, *ví dụ*, an Alkphos Direct Labelling và Detection System (GE Healthcare) có thể được sử dụng. Trong trường

hợp này, theo phương pháp kèm theo, sau khi nuôi cấy đoạn dò được đánh dấu qua đêm, màng được rửa với đệm rửa sơ bộ chứa 0,1% (khối lượng/thể tích) SDS ở 55°C, do đó phát hiện oligome đối nghĩa được lai. Theo cách khác, khi đoạn dò được đánh dấu bằng digoxigenin (DIG) sử dụng thuốc thử có bán trên thị trường (ví dụ, PCR Labelling Mix (Roche Diagnostics), v.v.) trong sản xuất đoạn dò dựa trên toàn bộ hoặc một phần trình tự bổ sung với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 3, việc lai có thể được phát hiện với kit phát hiện axit nucleic DIG (Roche Diagnostics).

Ngoài oligome đối nghĩa được mô tả trên đây, oligome đối nghĩa khác có thể được lai bao gồm các oligome đối nghĩa có 90% hoặc cao hơn, 91% hoặc cao hơn, 92% hoặc cao hơn, 93% hoặc cao hơn, 94% hoặc cao hơn, 95% hoặc cao hơn, 96% hoặc cao hơn, 97% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, 99% hoặc cao hơn, 99,1% hoặc cao hơn, 99,2% hoặc cao hơn, 99,3% hoặc cao hơn, 99,4% hoặc cao hơn, 99,5% hoặc cao hơn, 99,6% hoặc cao hơn, 99,7% hoặc cao hơn, 99,8% hoặc cao hơn, và 99,9% hoặc cao hơn độ đồng nhất với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2, như được tính toán bởi phần mềm tìm kiếm sự đồng nhất như FASTA và BLAST sử dụng các thông số mặc định.

Độ đồng nhất giữa các trình tự nucleotit có thể được xác định sử dụng FASTA (Science 227 (4693): 1435-1441, (1985)) hoặc thuật toán BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) by Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873, 1993). Các chương trình tên là blastn, blastx, tblastn và tblastx dựa trên thuật toán BLAST đã được phát triển (Altschul SF, et al: J. Mol. Biol. 215: 403, 1990). Khi trình tự nucleotit được đọc trình tự sử dụng blastn, các thông số là, ví dụ, điểm số=100 và độ dài chuỗi ký tự=12. Khi BLAST và Gapped BLAST được sử dụng, các thông số mặc định trong mỗi chương trình có thể được sử dụng.

Thuật ngữ "gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người" nhằm có nghĩa rằng bằng cách liên kết của oligome đối nghĩa theo sáng chế với vị trí tương ứng với exon 51 của phiên mã (ví dụ, pre-mARN) của gen dystrophin của người, ví dụ, trình tự nucleotit tương ứng với đầu 5' của exon 53 được cắt nối ở trình tự nucleotit tương ứng với đầu 3' của exon 50 ở bệnh nhân mắc DMD có sự xóa exon 52 khi đoạn phiên mã trải qua quá trình cắt nối, do đó dẫn đến sự tạo thành mARN trưởng thành không có sự dịch chuyển khung codon.

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

Việc liệu sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người được gây ra hay không có thể được xác nhận bằng cách đưa oligome đối nghĩa theo sáng chế vào tế bào biểu hiện dystrophin (ví dụ, các tế bào sarcoma cơ vân của người), phóng đại vùng xung quanh exon 51 của mARN của gen dystrophin của người từ ARN tổng của tế bào biểu hiện dystrophin bằng PCR theo thời gian thực và thực hiện PCR lồng hoặc phân tích trình tự trên sản phẩm được phóng đại của PCR.

Hiệu quả bỏ qua có thể được xác định như sau. mARN cho gen dystrophin của người được thu từ các tế bào thử nghiệm; trong mARN, mức polynucleotit "A" của sợi trong đó exon 51 được bỏ qua và mức polynucleotit "B" của sợi trong đó exon 51 không được bỏ qua được đo. Sử dụng các giá trị đo "A" và "B", hiệu quả được tính toán theo phương trình sau:

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

Tốt hơn là, oligome đối nghĩa theo sáng chế gây ra sự bỏ qua exon 51 với hiệu quả là 10% hoặc cao hơn, 20% hoặc cao hơn, 30% hoặc cao hơn, 40% hoặc cao hơn, 50% hoặc cao hơn, 60% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, và 90% hoặc cao hơn.

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

Oligome đối nghĩa theo sáng chế bao gồm, ví dụ, oligonucleotit, oligome morpholino hoặc peptit axit nucleic (Peptide Nucleic Acid - PNA), có độ dài là từ 16 đến 35 nucleotit. Độ dài tốt hơn là từ 19 đến 32, từ 20 đến 31, 21 hoặc 30 nucleotit và các oligome morpholino được ưu tiên.

Các oligonucleotit được mô tả trên đây (sau đây được đề cập là "oligonucleotit theo sáng chế") là oligome đối nghĩa theo sáng chế chứa các nucleotit làm các đơn vị cấu trúc. Các nucleotit này có thể là bất kỳ trong số các ribonucleotit, deoxyribonucleotit và các nucleotit cải biến.

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

Trong sáng chế, bazơ nitơ bao gồm, ví dụ, adenin, guanin, hypoxanthin, xytosin, thymin, uraxil, và các bazơ cải biến của nó. Ví dụ về các bazơ cải biến này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, pseudouraxil, 3-methyluraxil, dihydrouraxil, 5-alkylxytosin (ví dụ, 5-methylxytosin), 5-alkyluraxil (ví dụ, 5-ethyluraxil), 5-halouraxil (5-bromouraxil), 6-azapyrimidin, 6-alkylpyrimidin (6-methyluraxil), 2-thiouraxil, 4-thiouraxil, 4-acetylcytosin, 5-(carboxyhydroxymethyl) uraxil, 5'-

carboxymethylaminometyl-2-thiouraxil, 5-carboxymethylaminometyluraxil, 1-methyladenin, 1-methylhypoxanthin, 2,2-dimethylguanin, 3-methylxytoxin, 2-methyladenin, 2-methylguanin, N6-methyladenin, 7-methylguanin, 5-metoxymethylaminometyl-2-thiouraxil, 5-methylaminometyluraxil, 5-methylcarbonylmethyluraxil, 5-methylxyuraxil, 5-methyl-2-thiouraxil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenin, axit uraxil-5-oxaxetic, 2-thiocytosin, purin, 2,6-diaminopurin, 2-aminopurin, isoguanin, indol, imidazol, xanthin, v.v..

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

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

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

Trong sáng chế này, alkyl tốt hơn là alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon. Các ví dụ cụ thể bao gồm methyl, etyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, isobutyl, *sec*-butyl, *tert*-butyl, *n*-pentyl, isopentyl, neopentyl, *tert*-pentyl, *n*-hexyl và isohexyl. Alkyl có thể tùy ý được thế. Ví dụ về các phần tử thế này là halogen, alkoxy, xyano và nitro. Alkyl có thể được thế bằng từ 1 đến 3 phần tử thế.

Trong sáng chế này, xycloalkyl tốt hơn là xycloalkyl có 5 đến 12 nguyên tử cacbon. Các ví dụ cụ thể bao gồm xyclopentyl, xyclohexyl, xycloheptyl, xyclooctyl, xyclodexyl và xyclododexyl.

Trong sáng chế này, halogen bao gồm flo, clo, brom và iot.

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

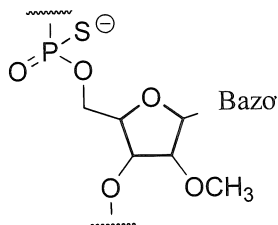
Trong sáng chế này, aryl tốt hơn là aryl có 6 đến 10 nguyên tử cacbon. Các ví dụ cụ thể bao gồm phenyl, α -naphtnaphtyl và β -naphtnaphtyl. Trong số các nhóm khác, ưu tiên là phenyl. Aryl có thể tùy ý được thế. Ví dụ về các phần tử thế này là alkyl, halogen, alkoxy, xyano và nitro. Aryl có thể được thế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

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

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

Tốt hơn là, oligonucleotit theo sáng chế là oligome đối nghĩa theo sáng chế chứa đơn vị cấu trúc được thể hiện bởi công thức chung dưới đây trong đó nhóm -OH

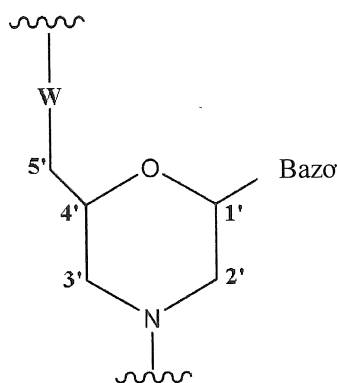
ở vị trí 2' của riboza được thế bằng metoxy và vùng liên kết với phosphat là liên kết phosphorothioat:



trong đó bazơ thể hiện bazơ nitơ.

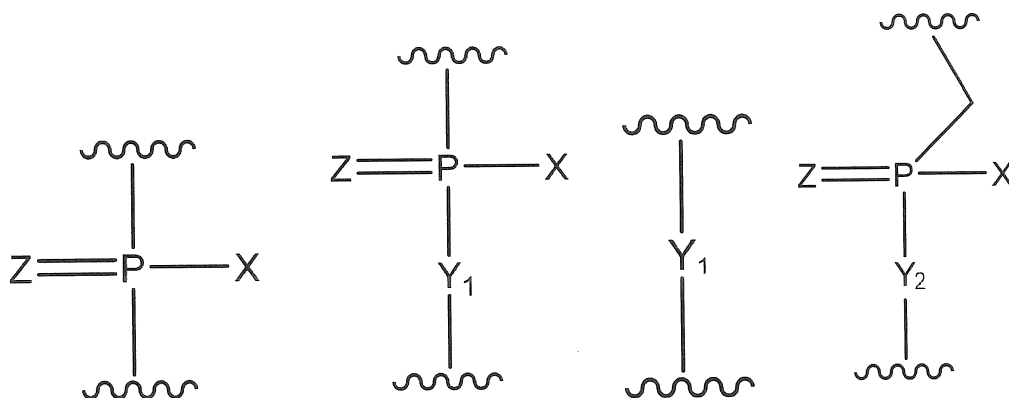
Oligonucleotit theo sáng chế có thể dễ dàng được tổng hợp sử dụng các dụng cụ tổng hợp tự động (ví dụ, AKTA oligopilot cộng 10/100 (GE Healthcare)). Theo cách khác, sự tổng hợp cũng có thể được giao cho tổ chức là bên thứ ba (ví dụ, Promega Inc., Takara Co., hoặc Japan Bio Service Co.), v.v..

Oligome morpholino theo sáng chế là oligome đối nghĩa theo sáng chế chứa đơn vị cấu trúc thể hiện bởi công thức chung dưới đây:



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

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



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

R^1 là H hoặc alkyl ;

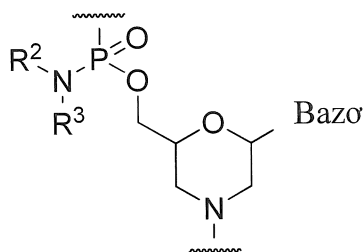
R^2 và R^3 , có thể giống nhau hoặc khác nhau, mỗi gốc là H, alkyl, xycloalkyl hoặc aryl;

Y_1 là O, S, CH_2 hoặc NR^1 ;

Y_2 là O, S hoặc NR^1 ;

Z là O hoặc S.

Tốt hơn là, oligome morpholino là oligome chứa đơn vị cấu trúc thể hiện bởi công thức chung dưới đây (phosphorodiamidat oligome morpholino (sau đây được đề cập là "PMO")).



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

Oligome morpholino theo sáng chế bao gồm oligome có toàn bộ hoặc một phần

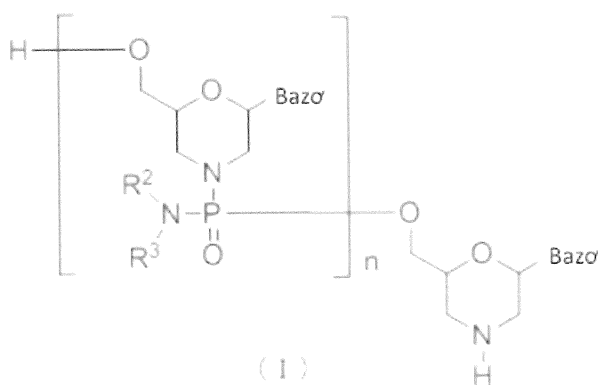
bazơ nitơ được cải biến, các gốc vòng morpholin, các vùng liên kết phosphat, đầu 3' và/hoặc đầu 5' tạo thành oligome morpholino.

Sự cải biến vùng liên kết với phosphat bao gồm, ví dụ, sự cải biến bằng cách thay thế bằng liên kết phosphorodiamidat, liên kết phosphorothioat, liên kết phosphorodithioat, liên kết alkylphosphonat, liên kết phosphoramidat và liên kết boranophosphat (Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (cũng xem, ví dụ, các công bố đơn trong nước của Nhật Bản của các đơn PCT số 2006/129594 và 2006/038608).

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

Phương pháp sản xuất PMO

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



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

n là số nguyên từ 1 đến 99, tốt hơn là số nguyên xác định từ 24 đến 34, 27 đến 31 hoặc 28 đến 30, tốt hơn là 29.

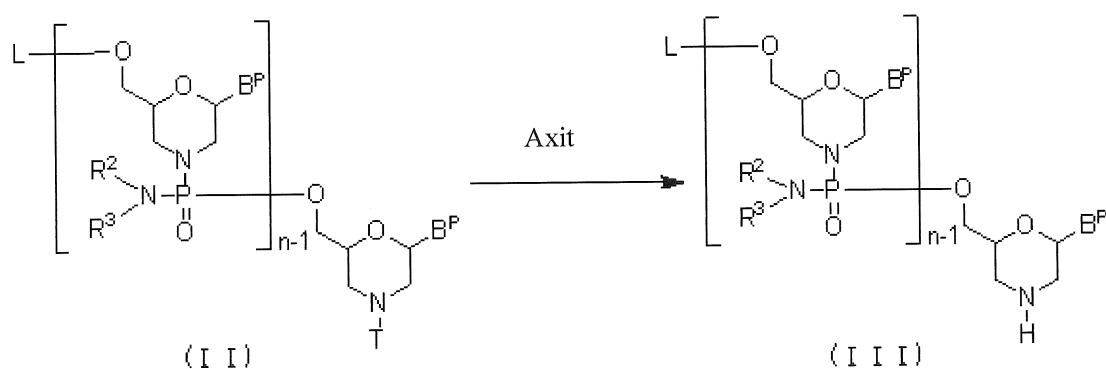
PMO (I) có thể được sản xuất theo phương pháp đã biết, ví dụ, có thể được sản xuất bằng cách thực hiện các quy trình theo các bước sau đây.

Các hợp chất và các chất phản ứng được sử dụng trong các bước dưới đây không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là chúng thường được sử dụng để tạo thành PMO.

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

(1) Bước A:

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

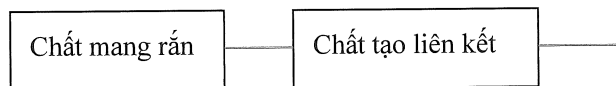


trong đó n , $\mathbb{R}^2$ và $\mathbb{R}^3$ có ý nghĩa như được xác định trên đây;

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

T là trityl, monometoxytrityl hoặc dimetoxytrityl; và,

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



(IV)

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

Nhóm bảo vệ amino như vậy không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó được sử dụng làm nhóm bảo vệ cho các axit nucleic. Các ví dụ cụ thể bao gồm benzoyl, 4-metoxycarbonyl, acetyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, phenylacetyl, phenoxyacetyl, 4-tert-butylphenoxyacetyl, 4-isopropylphenoxyacetyl và (dimethylamino)metylen. Các ví dụ cụ thể về nhóm bảo vệ cho nhóm hydroxy bao gồm 2-cyanoethyl, 4-nitrophenyl, phenylsulfonyl, methylsulfonyl và trimethylsilyl, và phenyl, có thể được thể bằng 1 đến 5 nhóm thu điện tử ở các vị trí thay thế tùy ý, diphenylcarbamoyl, dimethylcarbamoyl, diethylcarbamoyl, methylphenylcarbamoyl, 1-pyrrolidinylcarbamoyl, morpholinocarbamoyl, 4-(tert-butylcarboxy)benzyl, 4-[(dimethylamino)carboxy]benzyl và 4-(phenylcarboxy)benzyl, (cũng xem, ví dụ, WO 2009/064471).

"Chất mang rắn" không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là chất mang có thể sử dụng cho phản ứng pha rắn của các axit nucleic. Mong muốn đối với chất mang rắn là có các đặc tính sau đây: Ví dụ, (i) nó hòa tan một cách hạn chế trong các chất phản ứng mà có thể được sử dụng để tổng hợp các chất dẫn xuất morpholino axit nucleic (ví dụ, diclometan, axetonitril, tetrazol, N-metylimidazol, pyridin, anhydrit

axetic, lutidin, axit trifloaxetic); (ii) nó ổn định về mặt hóa học đối với các chất phản ứng có thể sử dụng để tổng hợp các chất dẫn xuất morpholino axit nucleic; (iii) nó có thể bị biến đổi về mặt hóa học; (iv) nó có thể được mang điện bởi các chất dẫn xuất morpholino axit nucleic; (v) nó có độ mạnh đủ để chịu được áp suất cao qua các xử lý; và (vi) có khoảng đường kính hạt và sự phân bố đồng nhất. Cụ thể là, polystyren có thể phòng được (ví dụ, nhựa aminometyl polystyren 1% tạo liên kết chéo với divinylbenzen (200-400 lỗ) (2,4-3,0 mmol/g) (sản xuất bởi Tokyo Chemical Industry), nhựa polystyren được aminometyl-HCl [divinylbenzen 1%, 100-200 lỗ] (sản xuất bởi Peptide Institute, Inc.)), polystyren không phòng được (ví dụ, Primer Support (sản xuất bởi GE Healthcare)), polystyren được gắn PEG (ví dụ, nhựa NH₂-PEG (sản xuất bởi Watanabe Chemical Co.), nhựa TentaGel), thủy tinh có lỗ được kiểm soát (Controlled Pore Glass- CPG) (sản xuất bởi, ví dụ, CPG), oxalyl-CPG (cũng xem, ví dụ, Alul et al., Nucleic Acids Research, Vol. 19, 1527 (1991)), chất phụ trợ tạo dẫn xuất với aminopolyetylen glycol TentaGel (ví dụ, Wright et al., cf., Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993)), và copolyme của Poros-polystyren/divinylbenzen.

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

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

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

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

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

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

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

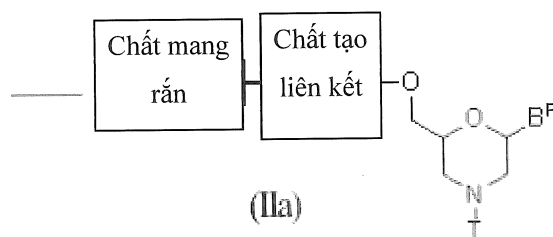
Thời gian phản ứng có thể thay đổi phụ thuộc vào loại axit sử dụng và nhiệt độ phản ứng, và thích hợp là trong khoảng từ 0,1 phút đến 24 giờ nói chung, và tốt hơn là trong khoảng từ 1 phút đến 5 giờ.

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

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

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

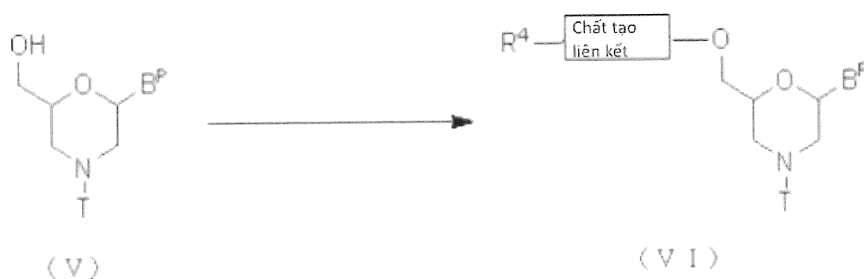
Trong hợp chất (II), hợp chất có công thức chung (IIa) dưới đây (sau đây gọi là hợp chất (IIa)), trong đó n là 1 và L là nhóm (IV), có thể được sản xuất theo quy trình sau đây.



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

Bước 1:

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

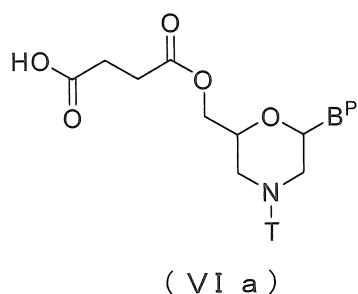


trong đó B^P, T và chất tạo liên kết có ý nghĩa như được xác định trên đây; và,

R⁴ là hydroxy, halogen, nhóm carboxyl hoặc amino.

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

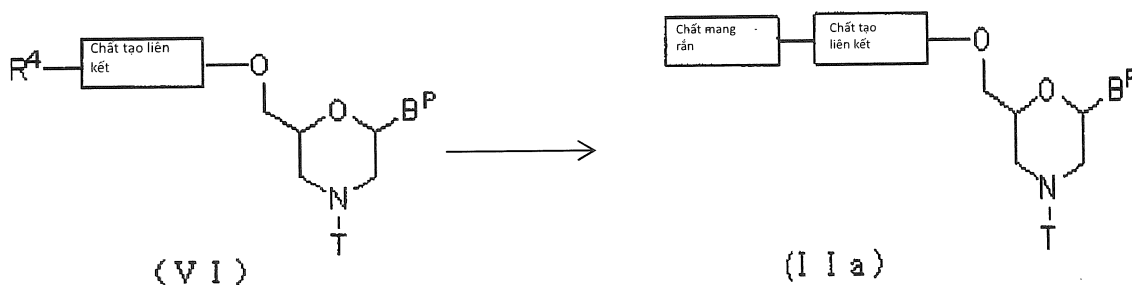
Cụ thể, hợp chất thể hiện bởi công thức chung (VIa) dưới đây có thể được sản xuất bằng cách thực hiện phương pháp đã biết để este hóa, sử dụng hợp chất (V) và anhydrit succinic.



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

Bước 2:

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

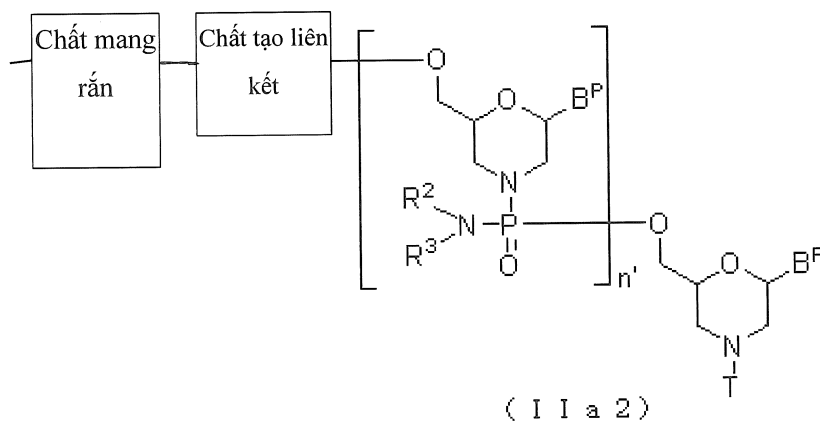


trong đó B^P, R⁴, T, chất tạo liên kết và chất mang rắn có ý nghĩa như được xác định trên đây.

Bước này có thể được thực hiện sử dụng hợp chất (VI) và chất mang rắn theo

quy trình đã biết làm phản ứng ngưng tụ.

Trong hợp chất (II), hợp chất thể hiện bởi công thức chung (IIa2) dưới đây trong đó n là từ 2 đến 99 (tốt hơn là số nguyên đã đưa ra là 25 đến 35, 28 đến 32, hoặc 29 đến 31, tốt hơn là 30) và L là nhóm thể hiện bởi công thức chung (IV) có thể được sản xuất bằng sử dụng hợp chất (IIa) làm vật liệu khởi đầu và lặp lại bước A và bước B của phương pháp sản xuất PMO được mô tả trong bản mô tả về số lần mong muốn.

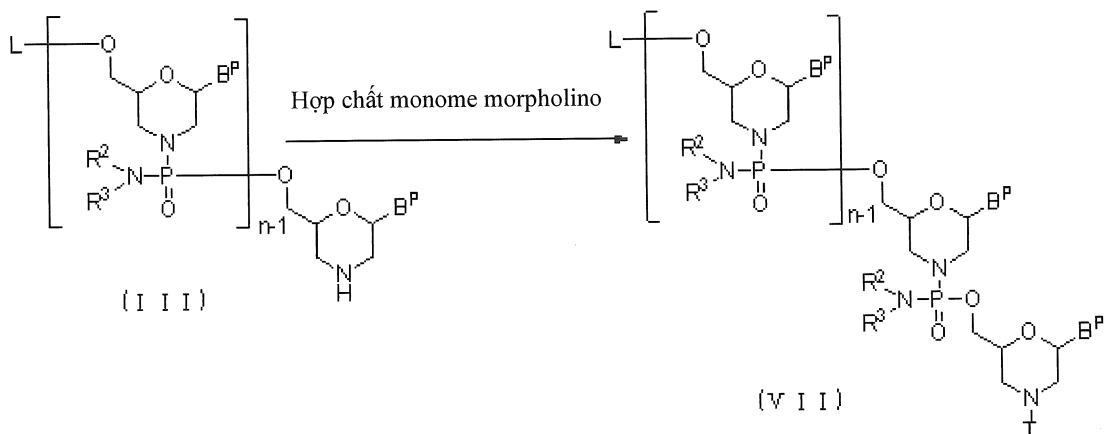


trong đó B^P , R^2 , R^3 , T, chất tạo liên kết và chất mang rắn có ý nghĩa như được xác định trên đây; và,

n' bằng từ 1 đến 98 (trong phương án cụ thể, n' là 1 đến 34, 1 đến 33, 1 đến 32, 1 đến 31, 1 đến 30, 1 đến 29, 1 đến 28, 1 đến 27, 1 đến 26, 1 đến 25, 1 đến 24).

(2) Bước B

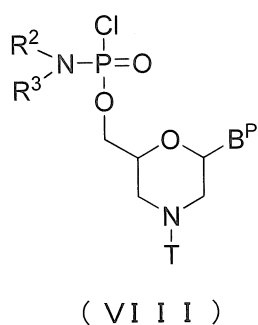
Hợp chất (III) được cho phản ứng với hợp chất monome morpholino với sự có mặt của bazơ để tạo thành hợp chất thể hiện bởi công thức chung (VII) dưới đây (sau đây được đề cập là hợp chất (VII)):



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

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

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



trong đó B^P, R², R³ và T có ý nghĩa như được xác định trên đây.

"Bazo" có thể được sử dụng trong bước này bao gồm, ví dụ, diisopropylamin, triethylamin và *N*-etylmorpholin. Lượng bazơ được sử dụng thích hợp là trong khoảng từ 1 mol đương lượng đến 1000 mol đương lượng dựa trên 1 mol của hợp chất (III), tốt hơn là, 10 mol đương lượng đến 100 mol đương lượng dựa trên 1 mol của hợp chất (III).

Hợp chất monome morpholino và bazơ có thể được sử dụng trong bước này cũng có thể được sử dụng làm chất pha loãng với dung môi thích hợp với nồng độ là

0,1% đến 30%. Dung môi không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó trợ với phản ứng, và bao gồm, ví dụ, N,N-dimetylimidazolidon, N-metylpiperidon, DMF, diclometan, axetonitril, tetrahydrofuran, hoặc hỗn hợp của nó.

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

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

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

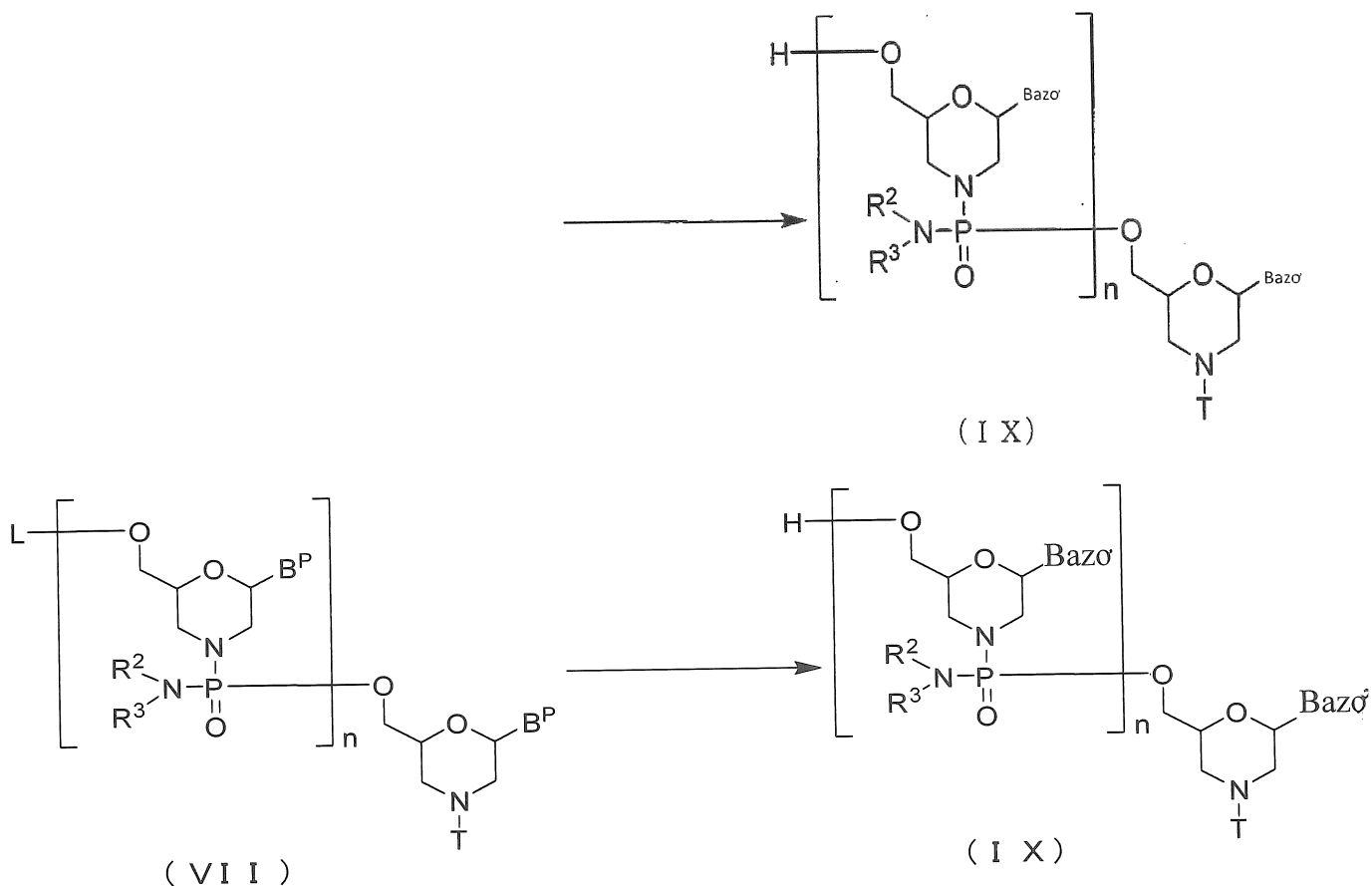
Nếu cần, bazơ như pyridin, lutidin, collidin, trietylamin, diisopropyletylamin, N-etylmorpholin, v.v. cũng có thể được sử dụng phối hợp với tác nhân axyl hóa. Lượng tác nhân axyl hóa thích hợp là trong khoảng từ 0,1 mol đương lượng đến 10000 mol đương lượng, và tốt hơn là trong khoảng từ 1 mol đương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

Nhiệt độ phản ứng trong phản ứng này tốt hơn là trong khoảng từ 10°C đến 50°C, tốt hơn nữa là, trong khoảng từ 10°C đến 50°C, tốt hơn nhiều nữa là, trong

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

(3) Bước C:

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



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

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

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

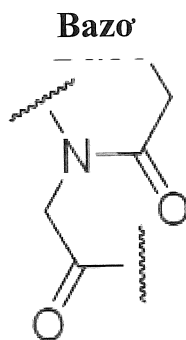
Nhiệt độ phản ứng thích hợp là trong khoảng từ 10°C đến 50°C, tốt hơn là, trong khoảng từ 20°C đến 40°C, và tốt hơn nữa là, trong khoảng từ 25°C đến 35°C. Thời gian phản ứng để khử bảo vệ có thể thay đổi phụ thuộc vào loại của hợp chất (IX), nhiệt độ phản ứng, v.v., và thích hợp là trong khoảng từ 0,1 phút đến 5 giờ, tốt hơn là 1 phút đến 1 giờ, và tốt hơn nữa là trong khoảng từ 1 phút đến 30 phút.

PMO (I) có thể thu được bằng cách cho hỗn hợp phản ứng thu được trong bước này vào các phương pháp tách và tinh sạch thông thường như chiết, cô đặc, trung hòa, lọc, tách bằng ly tâm, kết tinh lại, sắc ký cột pha đảo C₈ đến C₁₈, sắc ký cột trao đổi ion, sắc ký cột trao đổi anion, sắc ký cột lọc gel, sắc ký lỏng hiệu năng cao, tấm tách, siêu lọc, v.v., riêng rẽ hoặc ở dạng phối hợp của các phương pháp này. Do đó, PMO (I) mong muốn có thể được phân tách và tinh sạch (cũng xem, *ví dụ*, WO 1991/09033).

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

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

Peptit axit nucleic là oligome theo sáng chế có nhóm được thể hiện bằng công thức chung sau đây là đơn vị cấu trúc:

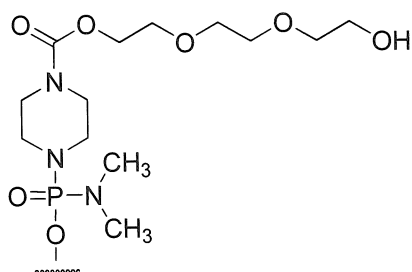


trong đó bazơ có ý nghĩa như được xác định trên đây.

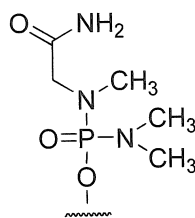
Các peptit axit nucleic có thể được sản xuất bằng cách tham khảo đến, *ví dụ*, các tài liệu sau đây.

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

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



(1)



(2)



(3)

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

2. Dược phẩm

Oligome theo sáng chế gây ra sự bỏ qua exon 51 với hiệu quả cao như được so sánh với các oligome đối nghĩa theo các giải pháp thuộc tình trạng kỹ thuật của sáng chế. Do đó, mong đợi rằng các điều kiện của chúng loạn dưỡng cơ có thể được giảm

nhẹ với hiệu quả cao bằng cách dùng dược phẩm chứa oligome theo sáng chế cho các bệnh nhân DMD, mà có đột biến biến đổi thành trong khung bởi sự bỏ qua exon 51, ví dụ, các bệnh nhân có sự xóa các exon 29-50, các bệnh nhân có sự xóa exon 50, các bệnh nhân có sự xóa các exon 45-50, các bệnh nhân có sự xóa các exon 48-50, các bệnh nhân có sự xóa các exon 49-50, các bệnh nhân có sự xóa các exon 52, các bệnh nhân có sự xóa các exon 52-63, các bệnh nhân có sự xóa các exon 13-50, các bệnh nhân có sự xóa các exon 19-50, các bệnh nhân có sự xóa các exon 43-50, hoặc các bệnh nhân có sự xóa các exon 47-50. Ví dụ, khi được phẩm chứa oligome theo sáng chế được sử dụng, các hiệu quả điều trị giống như vậy có thể đạt được thậm chí ở liều nhỏ hơn liều của các oligome theo giải pháp đã biết trong lĩnh vực. Do đó, các tác dụng phụ có thể được giảm nhẹ và điều này là có hiệu quả kinh tế.

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

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị chứng loạn dưỡng cơ, bao gồm việc dùng cho bệnh nhân mắc DMD oligome theo sáng chế.

Trong phương pháp điều trị này, oligome theo sáng chế có thể được dùng làm dược phẩm để điều trị chứng loạn dưỡng cơ.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất việc sử dụng oligome theo sáng chế trong sản xuất dược phẩm để điều trị chứng loạn dưỡng cơ và oligome theo sáng chế được áp dụng để điều trị chứng loạn dưỡng cơ.

Ví dụ về muối được dùng của oligome theo sáng chế chứa trong dược phẩm theo sáng chế là các muối kim loại kiềm như các muối của natri, kali và lithi; muối kim loại kiềm thổ như các muối của canxi và magie; muối kim loại như các muối của nhôm,

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

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

Trong việc dùng oligome theo sáng chế cho bệnh nhân mắc chứng loạn dưỡng cơ, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa chất mang để thúc đẩy sự cấp oligome đến các mô cơ. Chất mang này không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là được dùng,

và các ví dụ bao gồm các chất mang cation như cation liposome, cation polyme, v.v., hoặc các chất mang sử dụng vỏ virus. Các cation liposome là, ví dụ, các liposome chứa 2-O-(2-diethylaminoethyl)carbamoyl-1,3-O-diioleoylglycerol và các phospholipit làm các hợp phần chính (sau đây được đề cập là "liposome A"), Oligofectamine (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Invitrogen Corp.), Lipofectin (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Invitrogen Corp.), Lipofectamine (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Invitrogen Corp.), Lipofectamine 2000 (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Invitrogen Corp.), DMRIE-C (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Invitrogen Corp.), GeneSilencer (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Gene Therapy Systems), TransMessenger (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi QIAGEN, Inc.), TransIT TKO (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Mirus) và Nucleofector II (Lonza). Trong số các chất khác, liposome A là được ưu tiên. Ví dụ về các cation polyme là JetSI (nhãn hiệu đã đăng ký) (sản xuất bởi Qbiogene, Inc.) và Jet-PEI (nhãn hiệu đã đăng ký) (polyetylenimine, sản xuất bởi Qbiogene, Inc.). Ví dụ về các chất mang sử dụng vỏ virus là GenomeOne (nhãn hiệu đã đăng ký) (HVJ-E liposome, sản xuất bởi Ishihara Sangyo). Theo cách khác, các dụng cụ y tế được mô tả trong patent Nhật Bản số 2924179 và các chất mang cation được mô tả trong Công bố lại đơn nội địa Nhật Bản của các đơn PCT số 2006/129594 và 2008/096690 cũng có thể được sử dụng.

Để có thông tin chi tiết hơn, patent Mỹ số 4,235,871, patent Mỹ số 4,737,323, WO96/14057, "New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990) pages 33-104", v.v. có thể được tham khảo.

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

mang/oligome đối nghĩa theo sáng chế) có thể thay đổi phụ thuộc vào đặc tính của oligome, loại chất mang, v.v., và thích hợp là trong khoảng từ 0,1 đến 100, tốt hơn là trong khoảng từ 0,1 đến 10.

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

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

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành, ví dụ, dạng lỏng và dạng bào chế đông khô của nó. Dạng bào chế đông khô có thể được tạo ra bằng cách làm

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

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

Mong muốn là không chế liều dùng được phẩm theo sáng chế, bằng cách xem xét các yếu tố sau: loại và dạng liều dùng của oligome theo sáng chế bao gồm; các tình trạng của bệnh nhân bao gồm tuổi, thể trọng, v.v.; đường dùng; và các đặc tính và mức độ của bệnh. Liều dùng hàng ngày được tính toán là lượng oligome đối nghĩa theo sáng chế thường trong khoảng từ 0,1 mg đến 10 g/người, và tốt hơn là 1 mg đến 1 g/người. Khoảng trị số này đôi khi có thể thay đổi phụ thuộc vào loại bệnh đích, đường dùng và phân tử đích. Do đó, liều dùng nhỏ hơn khoảng này có thể đủ trong một số trường hợp và ngược lại, liều dùng cao hơn khoảng này đôi khi có thể được yêu cầu. Được phẩm có thể được dùng từ một đến vài lần một ngày hoặc ở các khoảng cách từ một ngày đến vài ngày.

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

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ tham khảo 1

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

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

Trong môi trường agon, 3,44 g N-{1-[(2R, 6S)-6-(hydroxymetyl)-4-

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

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

Sau khi 4,0 g axit 4-{[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-4-tritylmorpholin-2-yl]metoxy}-4-oxobutanoic được hòa tan trong 200 mL pyridin (đã được tách nước), 0,73 g 4-DMAP và 11,5 g 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydroclorua được thêm vào dung dịch. Sau đó, 25,0 g chất hỗ trợ Primer nhựa amino polystyren 200 (sản xuất bởi GE Healthcare Japan Co., Ltd., 17-5214-97) và 8,5 mL triethylamin được thêm vào hỗn hợp, sau đó lắc ở nhiệt độ phòng trong 4 ngày. Sau khi hoàn thành phản ứng, nhựa được lấy ra bằng cách lọc. Nhựa thu được được rửa nối tiếp bằng pyridin, metanol và diclometan theo thứ tự đã nêu, và được làm khô trong áp suất giảm. Thêm vào nhựa thu được 200 mL tetrahydrofuran (dạng tách nước), 15 mL anhydrit axetic và 15 mL 2,6-lutidine, và hỗn hợp được lắc ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Nhựa được lấy ra bằng cách lọc, được rửa nối tiếp bằng pyridin, metanol và diclometan theo thứ tự đã nêu và được làm khô trong áp suất giảm để tạo thành 26,7 g sản phẩm.

Lượng tải của sản phẩm được xác định từ lượng mong của trityl trên g nhựa bằng cách đo độ hấp thụ UV ở 409 nm sử dụng phương pháp đã biết. Lượng tải của

nhựa là 192,2 $\mu\text{mol/g}$.

Các điều kiện đo UV

Thiết bị: U-2910 (Hitachi, Ltd.)

Dung môi: axit metansulfonic

Bước sóng: 265 nm

ϵ giá trị: 45000

Theo mô tả trong các ví dụ 1, 2 và ví dụ tham khảo 1 dưới đây, PMO thể hiện bởi PMO số 1-3 trong bảng 1 được tổng hợp. PMO được tổng hợp được hòa tan trong nước để tiêm (sản xuất bởi Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.).

Bảng 1

PMO số.	Chú ý	SEQ ID NO:
1	Đầu 5': nhóm (3)	1
2	Đầu 5': nhóm (3)	2
3	Trình tự tương ứng với SEQ ID NO; 588 trong tài liệu sáng chế 3, Đầu 5': nhóm (3)	4

Ví dụ 1

PMO số 1

0,2g axit 4- $\{[(2S,6R)-6-(4\text{-benzamid-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-4\text{-tritylmorpholin-2-yl}]methoxy\}$ 4-oxobutanoic được tải bằng nhựa aminopolystyren (ví dụ tham khảo 1) (26 μmol) được nạp vào cột bằng đầu lọc. Sau đó, chu trình tổng hợp được thể hiện dưới đây được bắt đầu sử dụng máy tổng hợp axit nucleic (AKTA

Oligopilot 10 plus). Hợp chất monome morpholino mong muốn được thêm vào trong mỗi chu trình bắt cặp để tạo thành trình tự nucleotit của hợp chất ở đề mục (xem bảng 2 dưới đây).

Bảng 2

Bước	Chất phản ứng	Thể tích (mL)	Thời gian (phút)
1	Dung dịch khử bảo vệ	18-32	1,8-3,2
2	Dung dịch trung hòa và rửa	30	1,5
3	Dung dịch bắt cặp B	5	0,5
4	Dung dịch bắt cặp A	1,3	0,25
5	Phản ứng bắt cặp bằng các chất phản ứng được thêm vào ở bước 3 và 4		120-300
6	axetonitril	20	1,0
7	Dung dịch khai mào	9	2,0
8	axetonitril	30	2,0

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

tích/thể tích) anhydrit axetic và 30% (thể tích/thể tích) 2,6-lutidine trong axetonitril.

Nhựa aminopolystyren được tải với PMO được tổng hợp trên đây được thu hồi từ bình phản ứng và được làm khô ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 2 giờ trong áp suất giảm. PMO được làm khô được tải lên nhựa aminopolystyren resin được nạp vào trong bình phản ứng, và 5 mL nước amoniac 28% -etanol (1/4) được thêm vào. Hỗn hợp được khuấy ở 55°C trong 15 giờ. Nhựa aminopolystyren được tách bằng cách lọc và được rửa bằng 1 mL nước-etanol (1/4). Dịch lọc thu được được cô đặc trong áp suất giảm. Phần cặn thu được được hòa tan trong 10 mL hỗn hợp dung môi của axit axetic 20 mM – đệm triethylamin (đệm TEAA) và 10ml axetonitril (4/1) và được lọc qua màng lọc. Dịch lọc thu được được tinh sạch bằng HPLC pha đảo. Các điều kiện sử dụng là như được thể hiện trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

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

CV: thể tích cột

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

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

Bảng 4

Cột	Nguồn 15Q (GE Healthcare, $\phi 10 \times 108$ mm, 1 CV=8,5 mL)
Tốc độ dòng	8,5 mL/phút
Nhiệt độ cột	Nhiệt độ phòng
Dung dịch A	Dung dịch nước natri hydroxit 10 mM
Dung dịch B	Dung dịch nước natri hydroxit 10 mM, dung dịch nước natri clorua 1M
Gradient	(B) đậm đặc 1 $\rightarrow$ 50% / 40CV

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

Bảng 5

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

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

ESI-TOF-MS Clcd.: 10021.46

Phát hiện: 10021.91

Ví dụ 2

PMO số 2

Hợp chất ở đề mục được tạo ra theo quy trình của ví dụ 1.

ESI-TOF-MS Clcd.: 9916.71

Tìm thấy: 9916.43

Ví dụ so sánh 1

PMO số 3

Hợp chất ở đề mục được tạo ra theo quy trình của ví dụ 1.

ESI-TOF-MS Clcd.: 9949.46

Tìm thấy: 9949.41

Ví dụ thử nghiệm 1

Thử nghiệm In vitro

Các thử nghiệm được thực hiện sử dụng các oligome đối nghĩa PMO số 1 và 2 theo sáng chế và oligome đối nghĩa PMO số 3. Các trình tự của các oligome đối nghĩa khác nhau được nêu trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6

Trình tự nucleotit	PMO số
CGGTAAGTTCTGTCCTCAAGGAAGATGGCA	1
CTCATACCTTCTGCTTCAAGGAAGATGGCA	2
CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	3

Sử dụng kit Amaxa Cell Line Nucleofector L trên Nucleofector II (Lonza), 0,3, 1, 3, 10 μ M các oligome PMO số 1 và 2 theo sáng chế và oligome đối nghĩa PMO số 3 được chuyển nhiễm bằng $3,5 \times 10^5$ tế bào RD (dòng tế bào sarcoma cơ vân người). Chương trình T-030 được sử dụng.

Sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được nuôi cấy trong ba ngày trong 2 mL môi trường thiết yếu tối thiểu của Eagle (Eagle's Minimal Essential Medium - EMEM) (sản xuất bởi Sigma, sau đây gọi là như vậy) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (fetal calf serum -FCS) (sản xuất bởi Invitrogen) trong điều kiện 37°C và CO₂ 5%. Các tế bào được rửa bằng PBS (sản xuất bởi Nissui, sau đây gọi là như vậy) và 500 μ l của ISOGEN II (sản xuất bởi Nippon Gene) được thêm vào các tế bào. Sau khi các tế bào được để ở nhiệt độ phòng trong vài phút để dung giải các tế bào, sản phẩm dung giải được thu lại vào trong ống Eppendorf. ARN tổng được chiết theo phương pháp đi kèm ISOGEN. Nồng độ ARN tổng được chiết được xác định sử dụng NanoDrop ND-1000 (sản xuất bởi LMS).

PCR theo thời gian thực một bước được thực hiện với 400 ng ARN tổng đã chiết sử dụng kit PCT thời gian thực một bước Qiagen (sản xuất bởi Qiagen). Dung dịch phản ứng được chuẩn bị theo phương pháp đi kèm với kit. PTC-100 (sản xuất bởi MJ Research) được sử dụng làm chu trình nhiệt. Chương trình PCR thời gian thực sử dụng là như sau.

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

95°C, 15 phút: biến tính nhiệt

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

72°C, 10 phút: kéo dài lần cuối

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

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

Mỗi ngược: 5'- GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA-3' (SEQ ID NO: 6)

Sản phẩm phản ứng, 1 µL của PCR thời gian thực trên đây được phân tích sử dụng thiết bị Bioanalyzer (sản xuất bởi Agilent Technologies, Inc.). Polynucleotit mức “A” của sợi có sự bỏ qua exon 51 và polynucleotit mức “B” của sợi không có sự bỏ qua exon 51 được đo. Dựa trên các giá trị đo “A” và “B” này, hiệu quả bỏ qua được xác định bằng phương trình dưới đây:

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

Các kết quả thử nghiệm

Các kết quả được thể hiện trên FIG. 1. Thử nghiệm này cho thấy rằng, các oligome đối nghĩa theo sáng chế có thể gây qua sự bỏ qua exon 51 với hiệu quả cao hơn đáng kể so với oligome đối nghĩa PMO số 3.

Ví dụ 3

PMO số 4-6

Hợp chất ở đề mục được tạo ra theo quy trình của ví dụ 1. Trình tự của các oligome đối nghĩa khác nhau được nêu dưới đây.

Bảng 7

PMO số.	Trình tự	ESI-TOF-MS		Chú ý	SEQ ID NO
		MW	Phát hiện		
4	AACATCAAGGAAGATGGCATT	7007.96	7007.97	Đầu 5': nhóm (3)	7
5	TCCAACATCAAGGAAGATGGC	6968.97	6968.42	Đầu 5': nhóm (3)	8
6	ACCTCCAACATCAAGGAAGAT	6912.91	6912.85	Đầu 5': nhóm (3)	9

Ví dụ 4

2'-O-metoxy-phosphorothioat được thể hiện bởi SEQ ID NO: 9 đến 33

Các oligome đối nghĩa khác nhau của đề mục được sản xuất bởi nguồn bên ngoài từ Japan Bio Service Co. Trình tự của các oligome đối nghĩa khác nhau được nêu trong bảng 8.

Bảng 8

Trình tự số	Trình tự	ESI-TOF-MS	
		MW	Phát hiện
10	GAGU AACAGUCUGAGUAGGAG	7453	7452.876
11	UGUGUACCAGAGU AACAGUC	7310	7313.793
12	AACCACAGGUUGUGUACCAG	7309	7311.199
13	UUUCCUUAGUAACCACAGGUU	7209	7211.436
14	GAGAUGGCAGUUUCCUUAGUA	7328	7331.388
15	UUCUAGUUUGGAGAUGGCAGU	7345	7347.440

16	AAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG	7329	7329.982
17	AACAUCAAGGAAGAUGGCAUU	7381	7381.059
18	AGGUACCUCCAACAUCAAGGA	7316	7318.395
19	CUGCCAGAGCAGGUACCUCCA	7284	7286.932
20	CGGUUGAAAUCUGCCAGAGCA	7349	7351.895
21	UGUCCAAGCCCGGUUGAAAUC	7286	7286.00
22	CGGUAAGUUCUGUCCAAGCCC	7262	7262.929
23	GAAAGCCAGUCGGUAAGUUCU	7350	7351.869
24	AUCAAGCAGAGAAAGCCAGUC	7379	7378.383
25	UUAUAACUUGAUCAAGCAGAG	7319	7320.149
26	CUCUGUGAUUUUAUAACUUGA	7211	7212.295
27	CACCAUCACCCUCUGUGAUUU	7144	7145.555
28	CAAGGUCACCCACCAUCACCC	7187	7187.709
29	UUGAUAUCCUCAAGGUCACCC	7207	7210.071
30	GAUCAUCUCGUUGAUAUCCUC	7185	71882.39
31	UCUGCUUGAUGAUCAUCUCGU	7202	7203.926
32	GGCAUUUCUAGUUUGGAGAUG	7346	7346.562
33	CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	7375	7375.678
34	CCUCCAACAUCAAGGAAGAUG	7317	7318.343

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Các kết quả thử nghiệm trong các ví dụ thử nghiệm chứng minh rằng các oligome theo sáng chế gây ra sự bỏ qua exon 51 với hiệu quả cao một cách rõ rệt trong các tế bào RD. Do đó, các oligome theo sáng chế là cực kỳ hữu dụng để điều trị DMD.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Oligome đối nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm (a) đến (c) dưới đây, hoặc muối hoặc hydrat được dụng của nó:

(a) oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2;

(b) oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit có sự xóa, thay thế, chèn và/hoặc thêm từ 1 đến 5 nucleotit trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2, và có hoạt tính gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người; và

(c) oligome đối nghĩa có trình tự nucleotit có ít nhất 80% độ đồng nhất với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 và có hoạt tính gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người.

2. Oligome đối nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm (e) đến (g) dưới đây, hoặc muối hoặc hydrat được dụng của nó:

(e) oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2;

(f) oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit có sự xóa, thay thế, chèn và/hoặc thêm từ 1 đến 3 nucleotit trong trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2, và có hoạt tính gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người; và

(g) oligome đối nghĩa chứa trình tự nucleotit có ít nhất 80% độ đồng nhất với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 và có hoạt tính gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen dystrophin của người;

3. Oligome đối nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm (j) dưới đây, hoặc muối hoặc hydrat được dụng của nó:

(j) oligome đối nghĩa có trình tự nucleotit có ít nhất 90% độ đồng nhất với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc 2 và có hoạt tính gây ra sự bỏ qua exon 51 trong gen

dystrophin của người.

4

4. Oligome đối nghĩa gồm 20-31 bazơ chứa trình tự bazơ mà bổ sung 100% với exon 51 của pre-mARN dystrophin của người, trong đó trình tự bazơ này chứa 15 bazơ của CGGTAAGTTCTGTCCTCAAGGAAGATGGCA (SEQ ID NO: 1), và trong đó oligome đối nghĩa này gây ra sự bỏ qua exon 51, hoặc muối hoặc hydrat được dùng của nó.

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

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

7. Oligome đối nghĩa theo điểm 5 hoặc 6, hoặc muối hoặc hydrat được dùng của nó, trong đó gốc đường của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit là riboza trong đó nhóm 2'-OH được thay bằng nhóm bất kỳ trong số các nhóm bao gồm OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br và I (trong đó R là alkyl hoặc aryl và R' là alkylen).

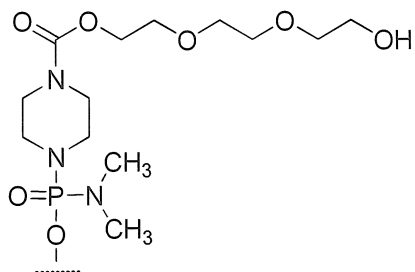
8. Oligome đối nghĩa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, hoặc muối hoặc hydrat được dùng của nó, trong đó vùng liên kết với phosphat của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit là nhóm bất kỳ trong số các nhóm bao gồm liên kết phosphorothioat, liên kết phosphorodithioat, liên kết alkylphosphonat, liên kết phosphoramidat và liên kết boranophosphat.

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

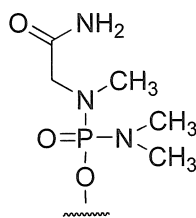
10. Oligome đối nghĩa theo điểm 9, trong đó oligome đối nghĩa này là oligome

phosphorodiamidat morpholino hoặc muối hoặc hydrat được dụng của nó.

11. Oligome đối nghĩa theo điểm 9 hoặc 10, hoặc muối hoặc hydrat được dụng của nó, trong đó đầu 5' là bất kỳ một trong số các công thức hóa học từ (1) đến (3) dưới đây:



(1)



(2)



(3)

12. Dược phẩm chứa oligome đối nghĩa làm thành phần hoạt tính, hoặc muối hoặc hydrat được dụng của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.

13. Dược phẩm theo điểm 12, trong đó dược phẩm này chứa chất mang được dụng.

Fig. 1

