(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) **1-0036529**

(51)[7] **C12N 15/113**

(13) **B**

(21) 1-2019-03697 (22) 01/05/2014
(62) 1-2015-04554
(86) PCT/US2014/036463 01/05/2014 (87) WO2014/179627 06/11/2014
(30) 61/818,442 01/05/2013 US; 61/823,826 15/05/2013 US; 61/843,887 08/07/2013 US; 61/871,673 29/08/2013 US; 61/880,790 20/09/2013 US; 61/976,991 08/04/2014 US; 61/986,867 30/04/2014 US
(45) 25/08/2023 425 (43) 25/09/2019 378A
(73) IONIS PHARMACEUTICALS, INC. (US)
2855 Gazelle Court, Carlsbad, CA 92010, United States of America
(72) PRAKASH, Thazha, P. (US); SETH, Punit, P. (US); SWAYZE, Eric, E. (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT CHỨA OLIGONUCLEOTIT CẢI BIẾN VÀ NHÓM TIẾP HỢP, VÀ CHẾ PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề xuất các hợp chất oligome với các nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, các hợp chất oligome được tiếp hợp với *N*-Axetylgalactosamin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất oligome với các nhóm tiếp hợp. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến các hợp chất oligome được tiếp hợp với *N*-Axetylgalactosamin. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa các hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nguyên lý cơ bản của công nghệ đối nghĩa gen là ở chỗ thành phần gen đối nghĩa lai với axit nucleic đích và điều biến lượng, hoạt tính, và/hoặc chức năng của axit nucleic đích. Ví dụ, trong một số trường hợp nhất định, các thành phần gen đối nghĩa làm thay đổi quá trình phiên mã hoặc dịch mã đích. Có thể điều biến biểu hiện như vậy, ví dụ, bằng cách làm thoái biến hoặc ức chế trên cơ sở chiếm đóng ARN thông tin đích. Ví dụ về việc điều biến chức năng đích của ARN bằng cách làm thoái biến là cách làm thoái biến trên cơ sở H Rnaza của ARN đích trên cơ sở lai với thành phần gen đối nghĩa kiểu ADN. Ví dụ khác về việc điều biến mức độ biểu hiện gen bằng cách làm thoái biến đích là làm nhiễu ARN (can thiệp ARN). Can thiệp ARN có nghĩa là làm câm gen gián tiếp nhờ gen đối nghĩa thông qua cơ chế sử dụng phức làm câm do ARN gây ra (RNA-induced silencing complex - RISC). Ví dụ khác nữa về việc điều biến chức năng đích của ARN là theo cơ chế chiếm đóng như được áp dụng tự nhiên bởi ARN cỡ micro. ARN cỡ micro là ARN nhỏ không mã hóa mà điều tiết quá trình biểu hiện của ARN mã hóa protein. Việc liên kết thành phần gen đối nghĩa với ARN cỡ micro ngăn ngừa ARN cỡ micro đó liên kết với đích ARN thông tin của nó, và do đó cản trở chức năng của ARN cỡ micro. ARN cỡ micro giả có thể làm gia tăng chức năng ARN cỡ micro tự nhiên. Một số thành phần gen đối nghĩa nhất định làm thay đổi mức độ cắt ghép tiền-ARN thông tin. Bất kể cơ chế cụ thể nào, tính đặc hiệu theo trình tự khiến các thành phần gen đối nghĩa trở nên hấp dẫn như là công cụ để đánh giá đích và chức năng hóa gen, cũng như là liệu pháp để điều biến một cách chọn lọc quá trình biểu hiện của gen liên quan đến sinh bệnh học của các bệnh.

Công nghệ gen đối nghĩa là cách thức hữu hiệu để điều biến mức độ biểu hiện của một hoặc nhiều sản phẩm gen cụ thể và do đó có thể chứng tỏ là đặc biệt hữu dụng trong nhiều ứng dụng điều trị bệnh, chẩn đoán bệnh, và nghiên cứu. Các nucleosit đã được cải biến về mặt hóa học có thể được kết hợp vào các thành phần gen đối nghĩa để làm gia tăng một hoặc nhiều tính chất, như kháng nucleaza, dược động học hoặc ái lực đối với đích axit nucleic. Vào năm 1998, thành phần gen đối nghĩa Vitravene® (fomivirsen; được phát triển bởi Isis Pharmaceuticals Inc., Carlsbad, CA) là thuốc đầu tiên trên cơ sở gen đối nghĩa được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ (Food and Drug Administration - FDA) cho phép tiếp thị, và hiện là cách điều trị bệnh viêm võng mạc do cytomegalovirus (CMV) gây ra ở các bệnh nhân AIDS.

Các cải biến hóa học mới cải thiện hiệu lực và hiệu quả của các thành phần gen đối nghĩa, khám phá tiềm năng phân phối qua đường miệng cũng như làm gia tăng khả năng dùng dưới da, làm giảm khả năng xảy ra tác dụng phụ, và dẫn đến việc cải thiện mức độ thuận tiện cho bệnh nhân. Các cải biến hóa học làm tăng hiệu quả của các thành phần gen đối nghĩa cho phép dùng liều thấp hơn, mà làm giảm khả năng độc tính, cũng như làm giảm tổng chi phí điều trị. Các cải biến làm tăng mức kháng thoái biến khiến quá trình thanh thải ra khỏi cơ thể chậm hơn, cho phép dùng liều kém thường xuyên hơn. Các loại cải biến hóa học khác nhau có thể được kết hợp vào một hợp chất để tối ưu hơn nữa hiệu quả của hợp chất này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các thành phần gen đối nghĩa đã được tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các thành phần gen đối nghĩa đã được tiếp hợp chứa oligonucleotit của gen đối nghĩa bổ trợ cho sản phẩm phiên mã của axit nucleic. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp bao gồm bước cho tế bào tiếp xúc với thành phần gen đối nghĩa đã được tiếp hợp chứa oligonucleotit của gen đối nghĩa bổ trợ cho sản phẩm phiên mã của axit nucleic. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp bao gồm bước cho tế bào tiếp xúc với thành phần gen đối nghĩa đã được tiếp hợp chứa oligonucleotit của gen đối nghĩa và làm giảm lượng hoặc hoạt tính của sản phẩm phiên mã của axit nucleic trong tế bào.

Thụ thể asialoglycoprotein (ASGP-R) đã từng được bộc lộ trước đây. Ví dụ, xem

tài liệu: Park *et al.*, *PNAS* vol. 102, No. 47, pp 17125-17129 (2005). Các thụ thể này được biểu hiện ở các tế bào ở gan, đặc biệt là tế bào gan. Ngoài ra, đã thấy rằng các hợp chất chứa các cụm gồm ba phối tử N-axetylgalactosamin (GalNAc) có khả năng liên kết với ASGP-R, dẫn đến sự hấp thu hợp chất này vào tế bào. Ví dụ, Khorev *et al.*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16, 9, pp 5216-5231 (May 2008). Do đó, các thể tiếp hợp chứa các cụm GalNAc này được dùng để tạo điều kiện thuận lợi cho việc hấp thu một số hợp chất vào tế bào ở gan, đặc biệt là tế bào gan. Ví dụ, đã thấy rằng một số thể tiếp hợp nhất định chứa GalNAc làm tăng hoạt tính của các thành phần ARN can thiệp nhỏ kép ở các tế bào gan *in vivo*. Trong các ví dụ này, các thể tiếp hợp chứa GalNAc thường được gắn vào sợi có nghĩa của ARN can thiệp nhỏ kép. Vì sợi có nghĩa bị loại bỏ trước khi sợi gen đối nghĩa lai với axit nucleic đích, nên hầu như không lo ngại rằng thể tiếp hợp sẽ cản trở hoạt tính. Nói chung, thể tiếp hợp được gắn vào đầu tận cùng 3' của sợi có nghĩa của ARN can thiệp nhỏ. Ví dụ, xem patent Mỹ số 8,106,022. Một số nhóm thể tiếp hợp nhất định được bộc lộ trong bản mô tả này có hoạt tính mạnh hơn và/hoặc dễ tổng hợp hơn các nhóm thể tiếp hợp đã được bộc lộ trước đây.

Theo các phương án nhất định theo sáng chế, các thể tiếp hợp được gắn vào các thành phần gen đối nghĩa sợi đơn, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thành phần gen đối nghĩa trên cơ sở H RNaza và các thành phần gen đối nghĩa mà làm thay đổi mức độ cắt ghép axit nucleic đích của tiền-ARN thông tin. Theo các phương án này, thể tiếp hợp vẫn được gắn vào thành phần gen đối nghĩa đủ dài để có lợi (cải thiện mức độ hấp thu vào tế bào) nhưng sau đó nên được phân cắt, hoặc theo cách khác không cản trở các bước tiếp theo cần thiết đối với hoạt tính, như lai với axit nucleic đích và tương tác với H RNaza hoặc enzym liên quan đến việc điều biến cắt ghép hoặc phân cắt. Sự cân bằng các tính chất là quan trọng trong việc thiết lập các thành phần gen đối nghĩa sợi đơn hơn các thành phần ARN can thiệp nhỏ, khi thể tiếp hợp này đơn giản được gắn vào sợi có nghĩa. Được bộc lộ trong bản mô tả này là các thành phần gen đối nghĩa sợi đơn đã được tiếp hợp có hiệu quả tốt hơn ở các tế bào gan *in vivo* so với chính thành phần gen đối nghĩa đó mà không có thể tiếp hợp. Đối với yêu cầu cân bằng các tính chất ở các thành phần này, hiệu quả cải thiện đó là bất ngờ.

Theo các phương án nhất định, các nhóm thể tiếp hợp trong bản mô tả này bao

gồm gốc dễ phân cắt. Như đã lưu ý, không muốn bị ràng buộc bởi cơ chế, điều hợp lý là thể tiếp hợp vẫn ở trên thành phần này đủ lâu dài để nâng cao mức độ hấp thu, nhưng sau đó, mong muốn rằng một phần nào đó hoặc tốt nhất là toàn bộ thể tiếp hợp được phân cắt, giải phóng thành phần gốc (ví dụ, thành phần gen đối nghĩa) ở dạng hoạt tính nhất của nó. Theo các phương án nhất định, gốc dễ phân cắt là nucleosit dễ phân cắt. Các phương án này khai thác ưu điểm của nucleaza nội sinh trong tế bào bằng cách gắn phần còn lại của thể tiếp hợp (cụm) vào oligonucleotit của gen đối nghĩa thông qua nucleosit nhờ một hoặc nhiều liên kết dễ phân cắt, như liên kết của phosphođieste. Theo các phương án nhất định, cụm này được liên kết với nucleosit dễ phân cắt thông qua liên kết của phosphođieste. Theo các phương án nhất định, nucleosit dễ phân cắt được gắn vào oligonucleotit của gen đối nghĩa (thành phần đối nghĩa) bằng liên kết của phosphođieste. Theo các phương án nhất định, nhóm thể tiếp hợp có thể bao gồm hai hoặc ba nucleosit dễ phân cắt. Theo các phương án này, các nucleosit dễ phân cắt này được liên kết với nhau, với thành phần gen đối nghĩa và/hoặc với cụm này thông qua các liên kết dễ phân cắt (như các liên kết của phosphođieste). Một số thể tiếp hợp theo sáng chế không bao gồm nucleosit dễ phân cắt và thay vào đó bao gồm liên kết dễ phân cắt. Đã thấy rằng mức độ phân cắt đủ đó của thể tiếp hợp từ oligonucleotit được tạo ra bởi ít nhất một liên kết mà dễ phân cắt trong tế bào (liên kết dễ phân cắt).

Theo các phương án nhất định, các thành phần gen đối nghĩa đã được tiếp hợp là các tiền dược chất. Các tiền dược chất này được dùng cho động vật và được chuyển hóa thành dạng có hoạt tính mạnh hơn. Ví dụ, các thành phần gen đối nghĩa đã được tiếp hợp được phân cắt để loại bỏ toàn bộ hoặc một phần của thể tiếp hợp tạo ra dạng hoạt tính (hoặc có hoạt tính mạnh hơn) của thành phần gen đối nghĩa thiếu tất cả hoặc một vài thể tiếp hợp trong số các thể tiếp hợp này.

Theo các phương án nhất định, các thể tiếp hợp được gắn ở đầu tận cùng 5’ của oligonucleotit. Các thể tiếp hợp đầu tận cùng 5’ này được phân cắt hiệu quả hơn so với các thể tiếp hợp cùng loại có nhóm thể tiếp hợp tương tự được gắn vào ở đầu tận cùng 3’. Theo các phương án nhất định, hoạt tính đã được cải thiện có thể tương quan với mức độ phân cắt. Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp ở đầu tận cùng 5’ có công hiệu hơn các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp ở đầu tận cùng 3’ (ví dụ,

xem các Ví dụ 56, 81, 83, và 84). Ngoài ra, việc gắn ở đầu tận cùng 5' cho phép tổng hợp oligonucleotit đơn giản hơn. Nói chung, các oligonucleotit được tổng hợp trên nền rắn theo hướng 3' đến 5'. Để tạo ra oligonucleotit tiếp hợp ở đầu tận cùng 3', thường gắn nucleosit đã được tiếp hợp trước ở đầu tận cùng 3' vào nền rắn và sau đó xây dựng oligonucleotit theo cách thông thường. Tuy nhiên, việc gắn nucleosit đã được tiếp hợp vào nền rắn khiến quy trình tổng hợp trở nên phức tạp hơn. Ngoài ra, bằng cách áp dụng cách thức này, thì thể tiếp hợp có mặt trong toàn bộ quy trình tổng hợp oligonucleotit và có thể bị phân hủy ở các bước tiếp theo hoặc có thể hạn chế loại phản ứng và chất phản ứng mà có thể được sử dụng. Bằng cách sử dụng các cấu trúc và các kỹ thuật được bộc lộ trong bản mô tả này đối với các oligonucleotit đã được tiếp hợp ở đầu tận cùng 5', có thể tổng hợp oligonucleotit bằng cách áp dụng các kỹ thuật chuẩn đã được tự động hóa và đưa vào thể tiếp hợp với nucleosit cuối cùng (đầu tận cùng 5') hoặc sau khi oligonucleotit đã được phân cắt khỏi nền rắn.

Trên cơ sở các giải pháp kỹ thuật đã biết và bản mô tả này, chuyên gia trong lĩnh vực này có thể tạo ra thể tiếp hợp bất kỳ trong số các thể tiếp hợp này và các oligonucleotit đã được tiếp hợp theo sáng chế. Hơn thế nữa, quy trình tổng hợp các thể tiếp hợp và đã tiếp hợp các oligonucleotit đã được bộc lộ trong bản mô tả này là dễ hơn và/hoặc yêu cầu ít bước hơn, và do đó đỡ tốn kém hơn các thể tiếp hợp đã được bộc lộ trước đây, tạo ra các ưu điểm về sản xuất. Ví dụ, quy trình tổng hợp một số nhóm thể tiếp hợp nhất định bao gồm ít bước tổng hợp hơn, tạo ra hiệu suất cao hơn, so với các nhóm thể tiếp hợp đã được bộc lộ trước đây. Các nhóm thể tiếp hợp như GalNAc3-10 trong Ví dụ 46 và GalNAc3-7 trong Ví dụ 48 là đơn giản hơn rất nhiều so với các thể tiếp hợp đã được bộc lộ trước đây như đã được bộc lộ trong các patent Mỹ số U.S. 8,106,022 hoặc U.S. 7,262,177 mà yêu cầu ghép nhiều chất trung gian hóa học hơn. Do đó, các thể tiếp hợp này và các thể tiếp hợp khác được bộc lộ trong bản mô tả này có ưu điểm so với các thành phần đã được bộc lộ trước đây để dùng với oligonucleotit bất kỳ, kể cả các oligonucleotit sợi đơn và sợi bất kỳ của các oligonucleotit sợi đôi (ví dụ, ARN can thiệp nhỏ).

Tương tự, được bộc lộ trong bản mô tả này là cả các nhóm thể tiếp hợp có chỉ một hoặc hai phối tử GalNAc. Như được thể hiện, các nhóm thể tiếp hợp này cải thiện hoạt

tính của các thành phần gen đối nghĩa. Các thành phần này dễ điều chế hơn các thể tiếp hợp chứa ba phối tử GalNAc. Các nhóm thể tiếp hợp chứa một hoặc hai phối tử GalNAc có thể được gắn vào thành phần gen đối nghĩa bất kỳ, kể cả các oligonucleotit sợi đơn và sợi bất kỳ của các oligonucleotit sợi đôi (ví dụ, ARN can thiệp nhỏ).

Theo các phương án nhất định, các thể tiếp hợp theo sáng chế hầu như không làm thay đổi các số đo nhất định về mức dung nạp. Ví dụ, trong bản mô tả này đã thể hiện rằng các thành phần gen đối nghĩa đã được tiếp hợp không sinh miễn dịch hơn các thành phần gốc không tiếp hợp. Vì hiệu quả được cải thiện, nên các phương án mà trong đó mức độ dung nạp duy trì không đổi (hoặc thậm chí nếu mức độ dung nạp kém hơn một chút so với mức gia tăng về hiệu quả) thì có các tính chất điều trị bệnh tốt hơn.

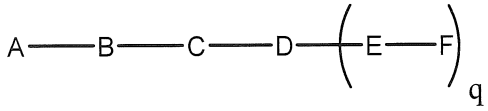
Theo các phương án nhất định, việc tiếp hợp cho phép thay đổi các thành phần gen đối nghĩa theo các cách mà có hệ quả kém thu hút hơn so với sự không có mặt của tiếp hợp. Ví dụ, theo các phương án nhất định, việc thay thế một hoặc nhiều liên kết phosphorothioat của thành phần gen đối nghĩa phosphorothioat hoàn toàn bằng liên kết của phosphođieste cải thiện một số số đo dung nạp. Ví dụ, trong một số trường hợp nhất định, các thành phần gen đối nghĩa này có một hoặc nhiều phosphođieste là kém sinh miễn dịch hơn so với chính các thành phần đó, trong đó mọi liên kết đều là phosphorothioat. Tuy nhiên, trong một số trường hợp nhất định, như được thể hiện trong Ví dụ 26, chính việc thay thế một hoặc nhiều liên kết phosphorothioat bằng liên kết của phosphođieste còn dẫn đến mức độ hấp thu vào tế bào thấp hơn và/hoặc hiệu lực thấp hơn. Theo các phương án nhất định, các thành phần gen đối nghĩa đã được tiếp hợp theo sáng chế dung nạp thay đổi về liên kết này với mức giảm về mức độ hấp thu hoặc hiệu lực rất ít hoặc hầu như không giảm so với khi thành phần hoàn toàn phosphorothioat đã tiếp hợp. Trên thực tế, theo các phương án nhất định, ví dụ, như nêu trong các Ví dụ 44, 57, 59, và 86, các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp và ít nhất một liên kết phosphođieste giữa các nucleosit thực sự thể hiện hiệu quả *in vivo* thậm chí tốt hơn so với dạng hoàn toàn phosphorothioat còn chứa cùng thể tiếp hợp. Hơn thế nữa, vì việc tiếp hợp làm tăng đáng kể mức độ hấp thu/hiệu lực nên mức giảm nhỏ trong mức tăng đáng kể đó là có thể chấp nhận được để đạt được mức độ dung nạp tốt hơn. Do đó, theo các phương án nhất định, các thành phần gen đối nghĩa đã được tiếp hợp bao gồm ít nhất một liên kết

phosphođieste.

Theo các phương án nhất định, việc tiếp hợp các thành phần gen đối nghĩa theo sáng chế dẫn đến mức độ phân phối, mức độ hấp thu và hoạt tính cao hơn ở tế bào gan. Do đó, thành phần này sẽ được phân phối nhiều hơn đến mô gan. Tuy nhiên, theo các phương án nhất định, chỉ riêng mức độ phân phối tăng đó không là nguyên nhân của toàn bộ mức tăng hoạt tính. Theo một số phương án nhất định, lượng thành phần đi vào tế bào gan nhiều hơn. Theo các phương án nhất định, thậm chí mức hấp thu vào tế bào gan tăng cũng không là nguyên nhân của toàn bộ mức tăng hoạt tính. Theo các phương án này, mức độ hấp thu hữu ích của thành phần đã được tiếp hợp tăng. Ví dụ, như được thể hiện trong Ví dụ 102, các phương án nhất định về các thể tiếp hợp chứa GalNAc tăng mức giàu oligonucleotit của gen đối nghĩa trong các tế bào gan so với các tế bào không nhu mô. Mức độ giàu này là có lợi đối với các oligonucleotit mà hướng đến gen đích mà được biểu hiện ở tế bào gan.

Theo các phương án nhất định, các thành phần gen đối nghĩa đã được tiếp hợp theo sáng chế gây giảm mức độ tiếp cận thận. Ví dụ, như được thể hiện trong Ví dụ 20, nồng độ của oligonucleotit của gen đối nghĩa chứa các phương án thể tiếp hợp chứa GalNAc nhất định ở thận là thấp hơn nồng độ của oligonucleotit của gen đối nghĩa không chứa thể tiếp hợp chứa GalNAc. Điều này có một vài ý nghĩa điều trị có lợi. Đối với các chỉ định điều trị bệnh mà không mong muốn có hoạt tính ở thận, việc tiếp xúc với thận chịu nguy cơ độc ở thận mà không có lợi ích tương ứng nào. Hơn thế nữa, nồng độ cao ở thận thường dẫn đến hao hụt thành phần này vào nước tiểu tạo ra hiện tượng thanh thải nhanh hơn. Theo đó, đối với các đích không ở thận, hiện tượng tích tụ ở thận là không mong muốn..

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được thể hiện bởi công thức:



trong đó

A là oligonucleotit đối nghĩa;

B là gốc phân cắt được

C là liên kết của thể tiếp hợp

D là nhóm phân nhánh

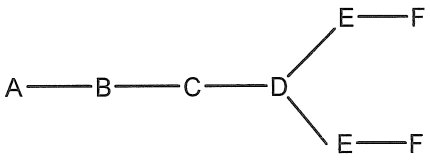
mỗi E là nhóm dắt;

mỗi F là phối tử; và

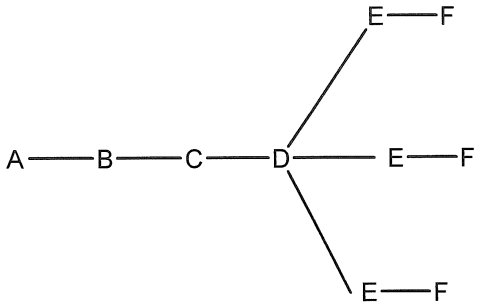
q là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 5.

Trong sơ đồ nêu trên và trong sơ đồ tương tự trong bản mô tả này, nhóm phân nhánh "D" phân nhánh nhiều lần đến mức cần thiết để chứa số lượng của các nhóm (E-F) như biểu thị bằng "q". Do đó, khi q = 1, thì công thức là:

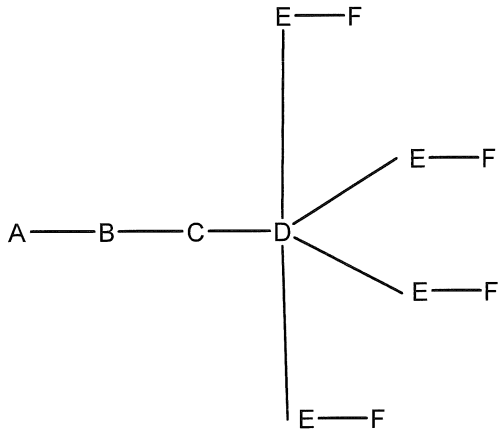
khi q = 2, thì công thức là:



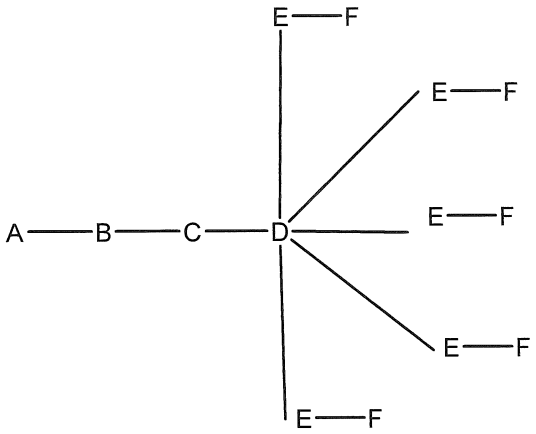
khi q = 3, thì công thức là:



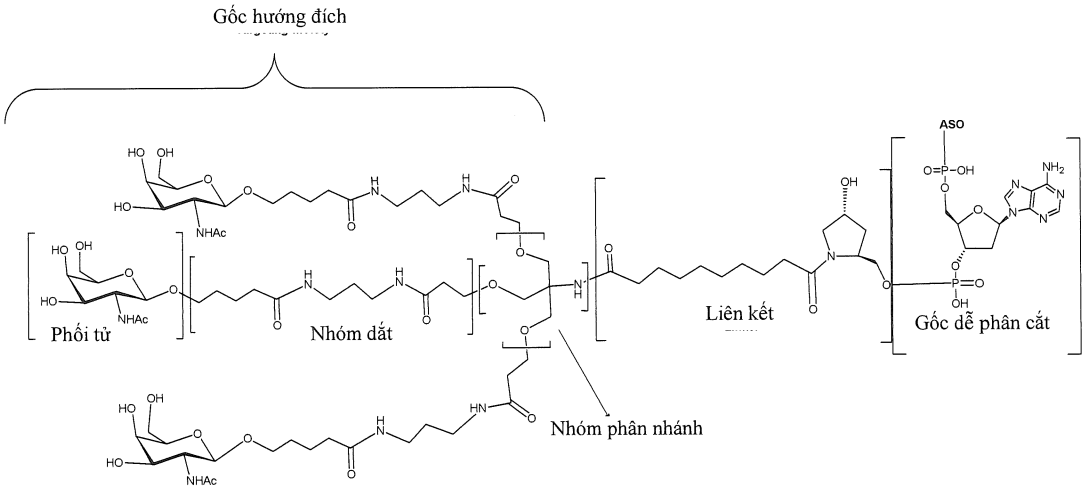
khi q = 4, thì công thức là:



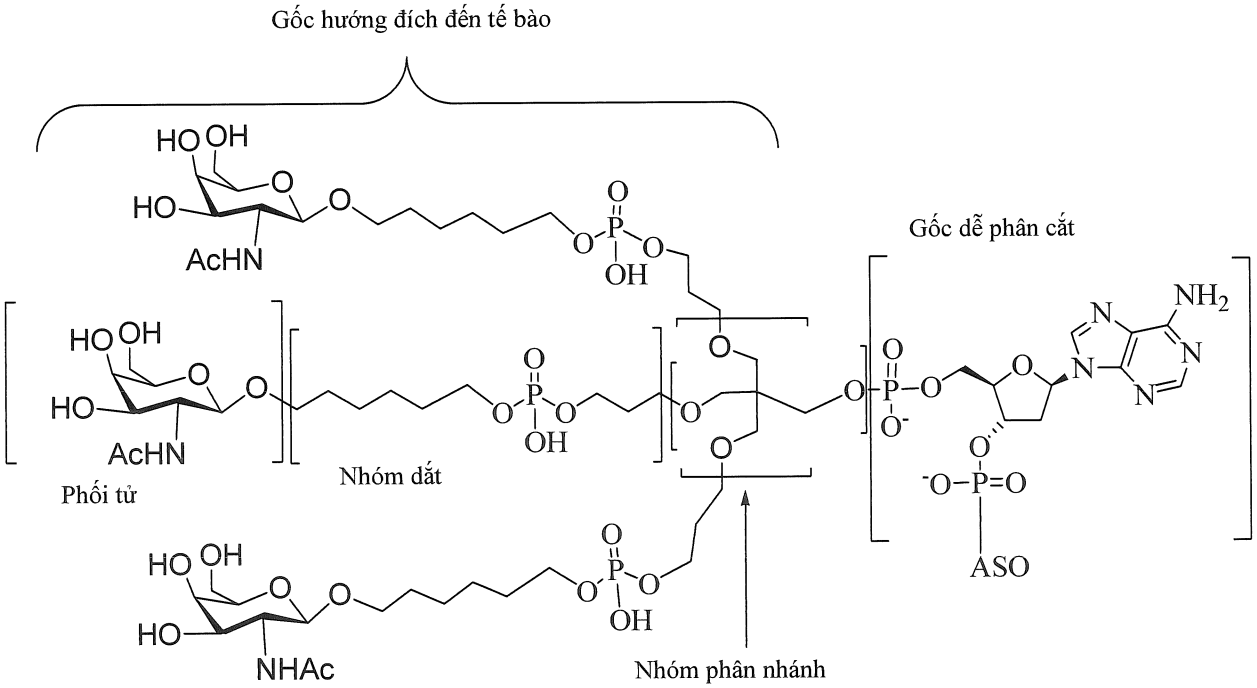
khi q = 5, thì công thức là:



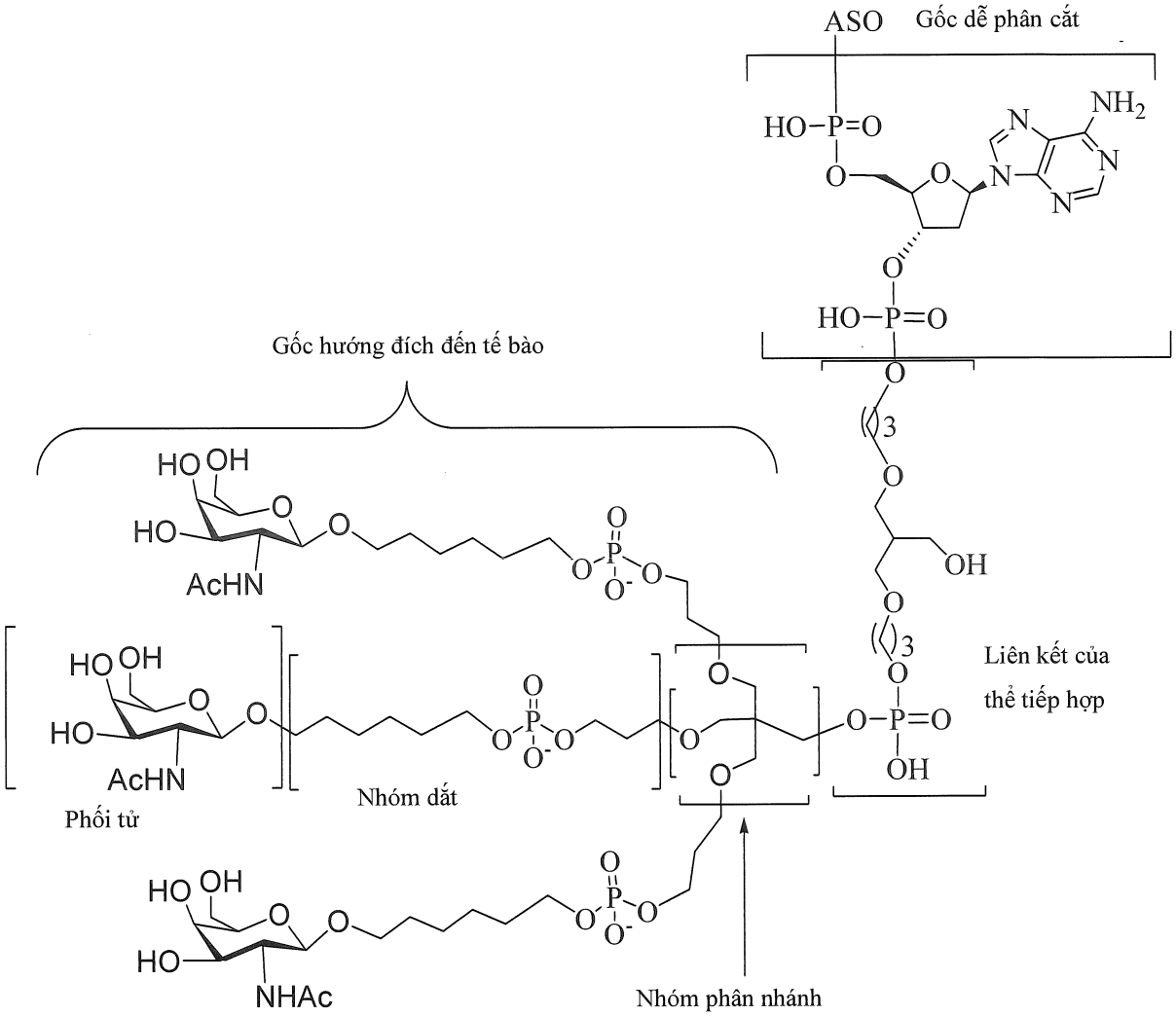
Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được đề xuất có cấu trúc:



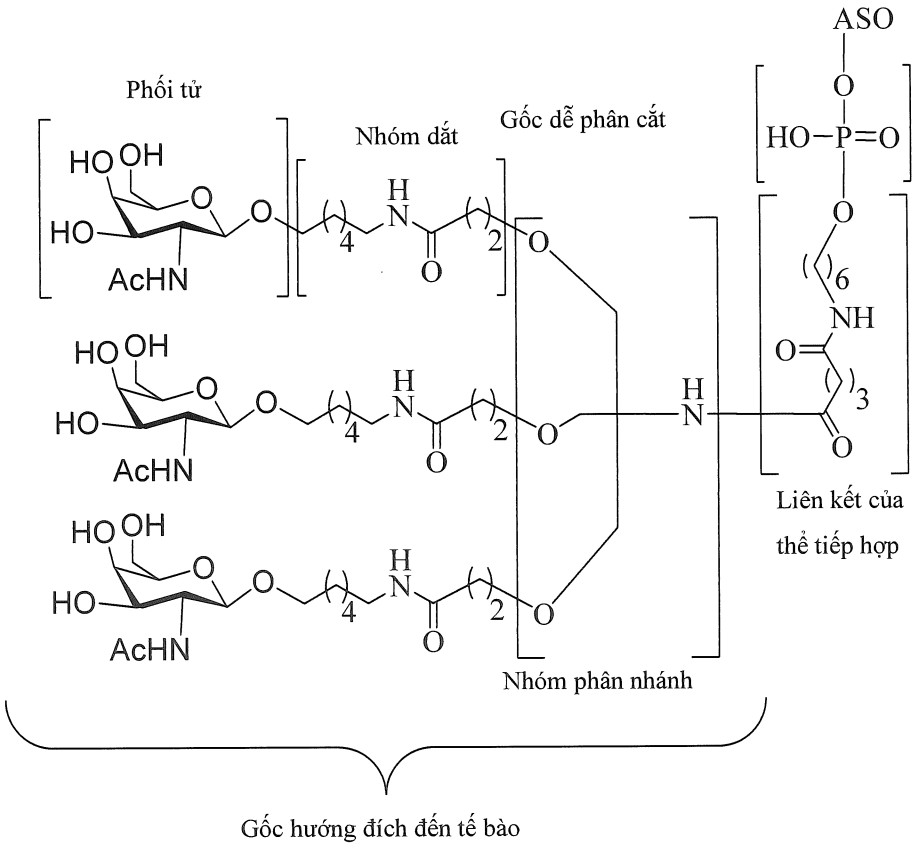
Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được đề xuất có cấu trúc:



Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được đề xuất có cấu trúc:



Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được đề xuất có cấu trúc:



Trong các phương án có nhiều hơn một biến cụ thể (ví dụ, nhiều hơn một "m" hoặc "n"), trừ khi có quy định cụ thể khác, mỗi biến cụ thể này được chọn một cách độc lập. Do đó, đối với cấu trúc có nhiều hơn một n, mỗi n được chọn một cách độc lập, nên chúng có thể giống nhau hoặc không giống nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Cần phải hiểu rằng cả phần mô tả chung nêu trên và phần mô tả chi tiết dưới đây chỉ để làm ví dụ và mang tính minh họa và không giới hạn phần mô tả. Trong bản mô tả này, việc sử dụng số ít bao gồm cả số nhiều, trừ khi có quy định khác. Như được dùng trong bản mô tả này, việc sử dụng "hoặc" có nghĩa là "và/hoặc", trừ khi có quy định khác. Hơn thế nữa, việc sử dụng thuật ngữ "bao gồm" cũng như các dạng khác, như "kể cả" và "gồm", không nhằm để giới hạn. Ngoài ra, thuật ngữ như "bộ phận" hoặc "thành phần" bao gồm cả các bộ phận và các thành phần chứa một cụm và các bộ phận và các thành phần mà bao gồm nhiều hơn một cấu trúc siêu phân tử, trừ khi có quy định khác.

Các đề mục của các phần được dùng trong bản mô tả này là chỉ nhằm mục đích sắp xếp và không nên được hiểu là nhằm mục đích giới hạn đối tượng được bộc lộ. Tất cả các tài liệu, hoặc phần của các tài liệu, được trích dẫn trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các patent, các đơn yêu cầu cấp patent, các bài báo, các sách, và các luận án, được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn cho mọi mục đích.

A. Định nghĩa

Trừ khi có nêu định nghĩa cụ thể, các tên danh pháp được dùng liên quan đến, và các quy trình và các kỹ thuật của, hóa học phân tích, hóa học hữu cơ tổng hợp, và hóa y và hóa dược được bộc lộ trong bản mô tả này đều đã biết và thường được dùng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật chuẩn có thể được áp dụng để tổng hợp hóa học, và phân tích hóa học. Các kỹ thuật và các quy trình nhất định này có thể được tìm thấy theo Ví dụ trong "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", do Sangvi và Cook biên tập, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., 21st edition, 2005; và "Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications" do Stanley T. Crooke, CRC Press, Boca Raton, Florida biên tập; và Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn cho mọi mục đích. Nếu được phép, tất cả patent, đơn yêu cầu cấp patent, đơn yêu cầu cấp patent đã công bố và các ấn phẩm khác và dữ liệu khác được nêu trong toàn bộ bản mô tả này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn.

Trừ khi có quy định cụ thể khác, các thuật ngữ dưới đây có nghĩa sau:

Thuật ngữ "nucleosit" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hợp chất chứa bazơ của gốc nucleotit và gốc đường. Các nucleosit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nucleosit có trong tự nhiên (như được tìm thấy ở ADN và ARN) và các nucleosit cải biến. Các nucleosit có thể được liên kết với gốc phosphat.

Thuật ngữ "cải biến hóa học" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là sự khác biệt hóa học trong hợp chất so với khi bản sao có trong tự nhiên. Các cải biến hóa học của các oligonucleotit bao gồm các cải biến nucleosit (bao gồm các cải biến gốc đường và các cải biến nucleobazơ) và các cải biến liên kết giữa nucleosit. Liên quan đến oligonucleotit, biến đổi về mặt hóa học không bao gồm các khác biệt chỉ có ở trình tự

nucleobazơ.

Thuật ngữ "furanosyl" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là cấu trúc chứa nhân có 5 cạnh chứa bốn nguyên tử cacbon và một nguyên tử oxy.

Thuật ngữ "gốc đường xuất hiện trong tự nhiên" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là ribofuranosyl như tìm thấy ở ARN có trong tự nhiên hoặc đeoxyribofuranosyl như tìm thấy ở ADN có trong tự nhiên.

Thuật ngữ "gốc đường" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là gốc đường có trong tự nhiên hoặc gốc đường được cải biến của nucleosit.

Thuật ngữ "gốc đường được cải biến" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là gốc đường được thế hoặc chất thay thế đường.

Thuật ngữ "gốc đường được thế" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là furanosyl mà không phải là gốc đường có trong tự nhiên. Các gốc đường được thế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các furanosyl chứa các phần tử thế ở vị trí 2', ở vị trí 3', ở vị trí 5' và/hoặc ở vị trí 4'. Các gốc đường nhất định được thế là các gốc đường hai vòng.

Thuật ngữ "gốc đường được thế ở vị trí 2'" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là furanosyl chứa phần tử thế ở vị trí 2' khác với H hoặc OH. Trừ khi có quy định cụ thể khác, gốc đường được thế ở vị trí 2' không phải là gốc đường hai vòng (tức là vị trí thể 2' của gốc đường được thế ở vị trí 2' không tạo ra cầu với nguyên tử khác của nhân furanosyl.

Thuật ngữ "MOE" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là $-OCH_2CH_2OCH_3$.

Thuật ngữ "nucleosit 2'-F" được dùng trong bản mô tả này để chỉ nucleosit chứa đường chứa flo ở vị trí 2'. Trừ khi có quy định cụ thể khác, flo trong nucleosit 2'-F nằm ở vị trí ribo (thay cho OH của riboza tự nhiên).

Thuật ngữ "chất thay thế đường" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là cấu trúc mà không bao gồm furanosyl và có khả năng thay thế gốc đường có trong tự nhiên của nucleosit, sao cho các cấu trúc dưới phân tử nucleosit thu được có khả năng liên kết với nhau và/hoặc liên kết với các nucleosit khác để tạo ra hợp chất oligome mà có khả năng lai với hợp chất oligome bổ trợ. Các cấu trúc này bao gồm các nhân chứa số các nguyên tử khác với furanosyl (ví dụ, các nhân có 4, 6, hoặc 7 cạnh); thay thế nguyên tử

oxy của furanosyl bằng nguyên tử không phải oxy (ví dụ, cacbon, lưu huỳnh, hoặc nitơ); hoặc cả thay đổi về số lượng nguyên tử lẫn thay thế nguyên tử oxy. Các cấu trúc này còn có thể bao gồm các thay thế tương ứng với thay thế đã được bộc lộ cho các gốc đường được thế (ví dụ, chất thay thế đường hai vòng dạng vòng cacbon 6 cạnh tùy ý chứa các phần tử thế bổ sung). Các chất thay thế đường còn bao gồm các thay thế đường phức hơn (ví dụ, không có hệ nhân của peptit axit nucleic). Các chất thay thế đường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các morpholino, các xyclohexenyl và các xyclohexitol.

Thuật ngữ "gốc đường hai vòng" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là gốc đường được cải biến chứa nhân có từ 4 đến 7 cạnh (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, furanosyl) chứa cầu nối hai nguyên tử của nhân có từ 4 đến 7 cạnh để tạo ra nhân thứ hai, tạo ra cấu trúc hai vòng. Theo các phương án nhất định, nhân có từ 4 đến 7 cạnh là nhân đường. Theo các phương án nhất định, nhân có từ 4 đến 7 cạnh là furanosyl. Theo một số phương án nhất định, cầu nối cacbon 2' và cacbon 4' của furanosyl.

Thuật ngữ "nucleotit" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nucleosit còn chứa nhóm liên kết phosphat. Thuật ngữ mà được dùng trong bản mô tả này "nucleosit liên kết" có thể hoặc không thể được liên kết bằng các liên kết phosphat và do đó bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, "các nucleotit liên kết". Thuật ngữ "nucleosit liên kết" được dùng trong bản mô tả này là các nucleosit mà được kết nối theo trình tự liên tục (tức là không có các nucleosit bổ sung có mặt giữa các nucleosit đã liên kết).

Thuật ngữ "nucleobazơ" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nhóm gồm các nguyên tử mà có thể được liên kết với gốc đường để tạo ra nucleosit mà có khả năng kết hợp thành oligonucleotit, và trong đó nhóm bao gồm các nguyên tử có khả năng liên kết với nucleobazơ bổ trợ có trong tự nhiên gồm oligonucleotit hoặc axit nucleic khác. Các nucleobazơ có thể là có trong tự nhiên hoặc có thể được cải biến.

Các thuật ngữ "nucleobazơ không được cải biến" hoặc "nucleobazơ xuất hiện trong tự nhiên" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là các nucleobazơ dị vòng có trong tự nhiên của ARN hoặc ADN: các bazơ của purin là adenin (A) và guanin (G), và các bazơ của pyrimiđin là thymin (T), xytosin (C) (kể cả 5-metyl C), và uraxil (U).

Thuật ngữ "nucleobazơ được cải biến" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nucleobazơ bất kỳ mà không phải là nucleobazơ có trong tự nhiên.

Thuật ngữ "nucleosit được cải biến" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nucleosit chứa ít nhất một biến đổi về mặt hóa học so với các nucleosit ARN hoặc ADN có trong tự nhiên. Các nucleosit được cải biến bao gồm gốc đường được cải biến và/hoặc nucleobazơ được cải biến.

Thuật ngữ "nucleosit hai vòng" hoặc "BNA" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nucleosit chứa gốc đường hai vòng.

Thuật ngữ "etyl nucleosit cưỡng chế" hoặc "cEt" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nucleosit chứa gốc đường hai vòng chứa cầu 4'-$CH(CH_3)$-O-2'.

Thuật ngữ "axit nucleic nucleosit được khóa" hoặc "LNA" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nucleosit chứa gốc đường hai vòng chứa cầu 4'-CH_2-O-2'.

Thuật ngữ "nucleosit được thế ở vị trí 2'" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nucleosit chứa phần tử thế ở vị trí 2' khác với H hoặc OH. Trừ khi có quy định cụ thể khác, nucleosit được thế ở vị trí 2' không là nucleosit hai vòng.

Thuật ngữ "đeoxynucleosit" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nucleosit chứa gốc đường 2'-H furanosyl, như tìm thấy ở các đeoxyribo nucleosit có trong tự nhiên (ADN). Theo các phương án nhất định, đeoxynucleosit 2'- có thể bao gồm nucleobazơ được cải biến hoặc có thể bao gồm nucleobazơ ARN (ví dụ, uraxil).

Thuật ngữ "oligonucleotit" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hợp chất chứa nhiều nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa một hoặc nhiều ribonucleosit không được cải biến (ARN) và/hoặc đeoxyribo nucleosit không được cải biến (ADN) và/hoặc một hoặc nhiều nucleosit được cải biến.

Thuật ngữ "oligonucleosit" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là oligonucleotit, trong đó không có liên kết giữa các nucleosit chứa nguyên tử phospho. Như được dùng trong bản mô tả này, các oligonucleotit bao gồm các oligonucleosit.

Thuật ngữ "oligonucleotit cải biến" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là oligonucleotit chứa ít nhất một nucleosit đã được cải biến và/hoặc ít nhất một liên kết giữa nucleosit đã được cải biến.

Thuật ngữ "liên kết" hoặc "nhóm liên kết" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nhóm gồm các nguyên tử mà liên kết hai hoặc nhiều nhóm nguyên tử khác với nhau.

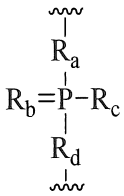
Thuật ngữ "liên kết giữa nucleosit" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là liên kết cộng hóa trị giữa các nucleosit liền kề trong oligonucleotit.

Thuật ngữ "liên kết giữa nucleosit xuất hiện trong tự nhiên" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là liên kết phosphođieste 3' vào 5'.

Thuật ngữ "liên kết giữa nucleosit được cải biến" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là liên kết giữa nucleosit bất kỳ không là liên kết giữa nucleosit xuất hiện trong tự nhiên.

Thuật ngữ "liên kết giữa nucleosit kết thúc" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là liên kết giữa hai nucleosit sau cùng của oligonucleotit hoặc vùng đã định của chúng.

Thuật ngữ "nhóm liên kết phospho" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nhóm liên kết chứa nguyên tử phospho. Các nhóm liên kết phospho bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm có công thức sau:



trong đó:

mỗi R_a và R_d độc lập là O, S, CH_2, NH, hoặc NJ_1, trong đó J_1 là C_1-C_6 alkyl hoặc được C_1-C_6 alkyl được thế;

R_b là O hoặc S;

R_c là OH, SH, C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkyl đã được thế, C_1-C_6 alkoxy, C_1-C_6 alkoxy đã được thế, amino hoặc amino đã được thế; và

J_1 là R_b là O hoặc S.

Các nhóm liên kết phospho bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phosphođieste, phosphorothioat, phosphorođithioat, phosphonat, phosphoramiđat, phosphorothioamiđat, thionoalkylphosphonat, các phosphotrieste, thionoalkylphosphotrieste và boranophosphat.

Thuật ngữ "nhóm liên kết phospho giữa nucleosit" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nhóm liên kết phospho mà liên kết một cách trực tiếp hai nucleosit.

Thuật ngữ “nhóm liên kết phospho không ở giữa nucleosit” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nhóm liên kết phospho mà không liên kết một cách trực tiếp hai nucleosit. Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết phospho không ở giữa nucleosit liên kết nucleosit với nhóm khác với nucleosit. Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết phospho không ở giữa nucleosit liên kết hai nhóm, song không có nhóm nào là nucleosit.

Thuật ngữ "nhóm liên kết trung tính" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nhóm liên kết mà không phải mang điện tích. Các nhóm liên kết trung tính bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phosphotrieste, các metylphosphonat, MMI (-CH_2-$N(CH_3)$-O-), amit-3 (-CH_2-C(=O)-N(H)-), amit-4 (-CH_2-N(H)-C(=O)-), formaxetal (-O-CH_2-O-), và thioformaxetal (-S-CH_2-O-). Các nhóm liên kết trung tính khác bao gồm các liên kết không ion chứa siloxan (đialkylsiloxan), carboxylat este, carboxamit, sulfua, sulfonat este và các amit (Xem ví dụ: Carbohydrate Modifications in Antisense Research; Y.S. Sanghvi and P.D. Cook Eds. ACS Symposium Series 580; Chapters 3 and 4, (pp. 40-65)). Các nhóm liên kết trung tính khác bao gồm các liên kết không ion chứa các thành phần N, O, S và CH_2 kết hợp.

Thuật ngữ “nhóm liên kết trung tính giữa nucleosit” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nhóm liên kết trung tính mà liên kết một cách trực tiếp hai nucleosit.

Thuật ngữ “nhóm liên kết trung tính không ở giữa nucleosit” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nhóm liên kết trung tính mà liên kết không một cách trực tiếp hai nucleosit. Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết trung tính không ở giữa nucleosit liên kết nucleosit với nhóm khác với nucleosit. Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết trung tính không ở giữa nucleosit liên kết hai nhóm, song không có nhóm nào là nucleosit.

Thuật ngữ "hợp chất oligome" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là cấu trúc polyme chứa hai hoặc nhiều cấu trúc phụ. Theo các phương án nhất định, hợp chất oligome chứa oligonucleotit. Theo các phương án nhất định, hợp chất oligome chứa một hoặc nhiều nhóm tiếp hợp và/hoặc nhóm đầu tận cùng. Theo các phương án nhất định, hợp chất oligome bao gồm oligonucleotit. Các hợp chất oligome còn bao gồm các axit nucleic có trong tự nhiên. Theo các phương án nhất định, hợp chất oligome chứa khung

gồm một hoặc nhiều cấu trúc dưới đơn vị monome được liên kết, trong đó mỗi cấu trúc dưới đơn vị monome đã liên kết được gắn một cách trực tiếp hoặc gián tiếp vào gốc bazơ dị vòng. Theo các phương án nhất định, các hợp chất oligome có thể còn bao gồm các cấu trúc dưới đơn vị monome mà không được liên kết với gốc bazơ dị vòng, nhờ đó tạo ra các vị trí không cơ bản. Theo các phương án nhất định, các liên kết nối các cấu trúc dưới đơn vị monome, các gốc đường hoặc các chất thế và các gốc bazơ dị vòng có thể độc lập được cải biến. Theo các phương án nhất định, cụm đường liên kết, mà có thể hoặc không thể bao gồm bazơ dị vòng, có thể được thế bằng chất bắt chước như các monome trong các axit peptit nucleic.

Thuật ngữ "nhóm đầu tận cùng" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là một hoặc nhiều nguyên tử đã được gắn vào một, hoặc cả hai, đầu tận cùng 3' hoặc đầu tận cùng 5' của oligonucleotit. Theo các phương án nhất định nhóm đầu tận cùng là nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, nhóm đầu tận cùng chứa một hoặc nhiều nucleosit của nhóm đầu tận cùng.

Thuật ngữ "thể tiếp hợp" hoặc "nhóm tiếp hợp" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nguyên tử hoặc nhóm bao gồm các nguyên tử liên kết với oligonucleotit hoặc hợp chất oligome. Nói chung, các nhóm tiếp hợp cải biến một hoặc nhiều thuộc tính của hợp chất mà chúng gắn vào, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dược lực học, dược động học, liên kết, hấp thụ, phân bố tế bào, hấp thu, nạp tế bào và/hoặc các tính chất thanh thải.

Thuật ngữ "liên kết của thể tiếp hợp" hoặc "nhóm liên kết" được dùng trong bản mô tả này trong phạm vi nhóm tiếp hợp có nghĩa là phần nhóm tiếp hợp chứa nguyên tử hoặc nhóm bất kỳ bao gồm các nguyên tử và liên kết cộng hóa trị (1) oligonucleotit với phần khác của nhóm tiếp hợp hoặc (2) hai hoặc nhiều phần của nhóm tiếp hợp.

Các nhóm tiếp hợp được thể hiện trong bản mô tả này dưới dạng các gốc, cung cấp liên kết để tạo ra gắn cộng hóa trị vào hợp chất oligome như oligonucleotit đối nghĩa chẳng hạn. Theo các phương án nhất định, điểm gắn trên hợp chất oligome là nguyên tử oxy 3' của nhóm hyđroxyl 3' bao gồm nucleosit kết thúc 3' của hợp chất oligome. Theo các phương án nhất định điểm gắn trên hợp chất oligome là nguyên tử oxy 5' của nhóm hyđroxyl 5' bao gồm nucleosit kết thúc 5' của hợp chất oligome. Theo các phương án

nhất định, liên kết để tạo ra gắn vào hợp chất oligome là liên kết tách được. Theo một số phương án nhất định, liên kết tách được này cấu thành toàn bộ hoặc một phần của gốc phân cắt được.

Theo các phương án nhất định, các nhóm tiếp hợp bao gồm gốc phân cắt được (ví dụ, liên kết tách được hoặc nucleosit tách được) và phần cụm hyđrat cacbon, như phần cụm GalNAc. Phần cụm hyđrat cacbon này chứa: gốc hướng đích và, tùy ý, liên kết của thể tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, phần cụm hyđrat cacbon xác định được theo số lượng và nhận dạng của phối tử. Ví dụ, theo các phương án nhất định, phần cụm hyđrat cacbon chứa 3 nhóm GalNAc và được chỉ rõ "$GalNAc_3$". Theo các phương án nhất định, phần cụm hyđrat cacbon chứa 4 nhóm GalNAc và được chỉ rõ "$GalNAc_4$". Các phần cụm hyđrat cacbon cụ thể (có các nhóm liên kết tiếp hợp và phân nhánh, nhóm dắt cụ thể) được bộc lộ trong bản mô tả này và được chỉ định bởi chữ số La mã tiếp theo là ký hiệu "a". Theo đó, "$GalNAc3\text{-}1_a$" để chỉ phần cụm hyđrat cacbon cụ thể của nhóm tiếp hợp có 3 nhóm GalNAc và nhóm dắt, các nhóm phân nhánh và liên kết đã được xác định cụ thể. Đoạn cụm hyđrat cacbon này được gắn vào hợp chất oligome qua gốc phân cắt được, như liên kết tách được hoặc nucleosit tách được.

Thuật ngữ "gốc phân cắt được" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là liên kết hoặc nhóm mà có khả năng được tách trong các điều kiện sinh lý. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được được tách bên trong tế bào hoặc các ngăn dưới mức tế bào, như thể sinh tan. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được được tách bởi các enzym nội sinh, như các nucleaza. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được chứa nhóm gồm các nguyên tử có một, hai, ba, bốn, hoặc nhiều hơn bốn liên kết tách được.

Thuật ngữ "liên kết tách được" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là liên kết hóa học bất kỳ có khả năng được tách. Theo các phương án nhất định, liên kết tách được được chọn trong số: amit, polyamit, este, ete, một hoặc cả hai este của phosphođieste, phosphat este, carbamat, đi-sulfua, hoặc peptit.

Thuật ngữ "cụm hyđrat cacbon" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hợp chất có một hoặc nhiều gốc hyđrat cacbon đã được gắn vào nhóm gá hoặc nhóm liên kết. (ví dụ, xem: Maier *et al.*, "Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a

Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting", *Bioconjugate Chemistry*, 2003, (14): 18-29, mà được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn, hoặc Rensen *et al.*, "Design and Synthesis Novel *N*-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asiaglycoprotein Receptor, *J. Med. Chem.* 2004, (47): 5798-5808, để làm các ví dụ về các cụm tiếp hợp hyđrat cacbon).

Thuật ngữ "chất dẫn xuất của hyđrat cacbon" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hợp chất bất kỳ mà có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng hyđrat cacbon làm nguyên liệu ban đầu hoặc chất trung gian.

Thuật ngữ "hyđrat cacbon" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hyđrat cacbon có trong tự nhiên, hyđrat cacbon được cải biến, hoặc dẫn xuất của hyđrat cacbon.

Thuật ngữ "nhóm bảo vệ" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hợp chất bất kỳ hoặc nhóm bảo vệ đã được biết bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các nhóm bảo vệ có thể được tìm thấy trong "Protective Groups in Organic Chemistry", T. W. Greene, P. G. M. Wuts, ISBN 0-471-62301-6, John Wiley & Sons, Inc, New York, đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn

Thuật ngữ "sợi đơn" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hợp chất oligome mà không được lai với phần bổ sung của nó và nó không tự bổ sung đủ để tạo ra chính bộ đôi ổn định.

Thuật ngữ "sợi kép" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là cặp hợp chất oligome mà được lai với một hợp chất oligome bổ trợ khách hoặc chính hợp chất oligome bổ trợ mà tạo ra hairpin cấu trúc. Theo các phương án nhất định, hợp chất oligome sợi đôi chứa hợp chất oligome thứ nhất và thứ hai.

Thuật ngữ "hợp chất đối nghĩa" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hợp chất chứa hoặc bao gồm oligonucleotit mà ít nhất một phần của nó bổ trợ khả năng lai cho axit nucleic đích, tạo ra ít nhất một hoạt tính đối nghĩa.

Thuật ngữ " hoạt tính đối nghĩa" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là thay đổi đo được và/hoặc phát hiện được bất kỳ do hợp chất đối nghĩa với axit nucleic đích của nó. Theo các phương án nhất định, hoạt tính đối nghĩa bao gồm sự điều biến lượng hoặc hoạt tính của bản sao axit nucleic đích (ví dụ, ARN thông tin). Theo các phương án nhất định, hoạt tính đối nghĩa bao gồm sự điều biến cắt ghép của tiền ARN thông tin.

Thuật ngữ "hợp chất đối nghĩa trên cơ sở H RNaza" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hợp chất đối nghĩa, trong đó ít nhất một phần hoạt tính đối nghĩa của hợp chất đối nghĩa này là do lai của hợp chất đối nghĩa đối với axit nucleic đích và sự phân cắt tiếp theo của axit nucleic đích nhờ H RNaza.

Thuật ngữ "hợp chất đối nghĩa trên cơ sở RISC" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hợp chất đối nghĩa, trong đó ít nhất một phần hoạt tính đối nghĩa của hợp chất đối nghĩa có khả năng góp phần vào phức câm cảm ứng ARN (RNA Induced Silencing Complex - RISC).

Thuật ngữ "phát hiện" hoặc "đo" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là kiểm nghiệm hoặc thử nghiệm để phát hiện hoặc đo được thực hiện. Việc phát hiện và/hoặc đo này có thể dẫn đến trị số bằng không. Do đó, nếu thử nghiệm để phát hiện hoặc đo dẫn đến không phát hiện hoạt tính (hoạt tính bằng không), tuy nhiên bước phát hiện hoặc đo hoạt tính vẫn được thực hiện.

Thuật ngữ "hoạt tính phát hiện được và/hoặc đo được" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hoạt tính đáng kể về mặt thống kê mà không phải bằng không.

Thuật ngữ "gần như không đổi" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là rất ít hoặc không có thay đổi về thông số cụ thể, đặc biệt là so với thông số khác mà thay đổi nhiều hơn. Theo các phương án nhất định, thông số là gần như không đổi nếu nó thay đổi ít hơn 5%. Theo các phương án nhất định, thông số là gần như không đổi nếu nó thay đổi bé hơn hai lần trong khi thông số khác thay đổi ít nhất mười lần. Ví dụ, theo các phương án nhất định, hoạt tính đối nghĩa là sự thay đổi về lượng axit nucleic đích. Theo một số phương án nhất định, lượng axit nucleic không hướng đích là gần như không đổi nếu nó thay đổi ít hơn nhiều so với axit nucleic đích thay đổi, song sự thay đổi không nhất thiết phải bằng không.

Thuật ngữ "biểu hiện" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là quy trình mà nhờ nó cuối cùng gen dẫn đến protein. Sự biểu hiện bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phiên mã, cải biến sau phiên mã (ví dụ, cắt ghép, polyađenyl hóa, bổ sung chụp ở đầu tận cùng 5'), và dịch mã.

Thuật ngữ "axit nucleic đích" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là phân tử axit nucleic mà hợp chất đối nghĩa nhằm để lai với nó để gây ra hoạt tính đối nghĩa mong

muốn. Các oligonucleotit đối nghĩa có tính bổ trợ đủ để các axit nucleic đích của chúng để cho phép mức độ lai trong các điều kiện sinh lý.

Thuật ngữ "phần bổ trợ nucleobazơ" hoặc "phần bổ trợ" được dùng trong bản mô tả này liên quan đến các nucleobazơ có nghĩa là nucleobazơ mà có khả năng ghép cặp bazơ với nucleobazơ khác. Ví dụ, trong ADN, ađenin (A) bổ trợ cho thymin (T). Ví dụ, trong ARN, ađenin (A) bổ trợ cho uraxil (U). Theo các phương án nhất định, bổ trợ nucleobazơ có nghĩa là nucleobazơ của hợp chất đối nghĩa mà có khả năng ghép cặp bazơ với nucleobazơ của axit nucleic đích của nó. Ví dụ, nếu nucleobazơ nằm ở vị trí nhất định trong hợp chất đối nghĩa có khả năng liên kết hyđro với nucleobazơ nằm ở vị trí nhất định của axit nucleic đích, thì vị trí của liên kết hyđro ở giữa oligonucleotit và axit nucleic đích được xem là bổ trợ ở cặp nucleobazơ đó. Các nucleobazơ chứa các cải biến nhất định có thể duy trì khả năng ghép cặp với bản sao nucleobazơ và do đó, cũng có có khả năng bổ trợ nucleobazơ.

Thuật ngữ "không bổ trợ" được dùng trong bản mô tả này liên quan đến các nucleobazơ có nghĩa là cặp các nucleobazơ mà không tạo ra các liên kết hyđro với nhau.

Thuật ngữ "bổ trợ" được dùng trong bản mô tả này liên quan đến các hợp chất oligome có công thức (ví dụ, liên kết các nucleosit, các oligonucleotit, hoặc các axit nucleic) có nghĩa là khả năng của các hợp chất oligome này hoặc các vùng của chúng được lai với hợp chất oligome khác hoặc vùng của chúng thông qua phần bổ trợ nucleobazơ. Các hợp chất oligome bổ trợ không nhất thiết phải có phần bổ trợ nucleobazơ ở mỗi nucleosit. Đúng hơn là, một số sai lệch được chấp nhận. Theo các phương án nhất định, bổ trợ các hợp chất oligome hoặc các vùng là bổ trợ ở 70% nucleobazơ (mức bổ trợ 70%). Theo các phương án nhất định, mức bổ trợ của các hợp chất oligome bổ trợ hoặc các vùng bổ trợ là 80%. Theo các phương án nhất định, mức bổ trợ của các hợp chất oligome bổ trợ hoặc các vùng bổ trợ là 90%. Theo các phương án nhất định, mức bổ trợ của các hợp chất oligome bổ trợ hoặc các vùng bổ trợ là 95%. Theo các phương án nhất định, mức bổ trợ của các hợp chất oligome bổ trợ hoặc các vùng bổ trợ là 100%.

Thuật ngữ "sai lệch" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nucleobazơ của hợp chất oligome thứ nhất mà không có khả năng tạo cặp với nucleobazơ ở vị trí tương

ứng của hợp chất oligome thứ hai, khi hợp chất oligome thứ nhất và thứ hai được duỗi thẳng. Mỗi hợp chất oligome hoặc cả hai hợp chất oligome thứ nhất và thứ hai đều có thể là oligonucleotit.

Thuật ngữ "lai" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là việc ghép cặp bổ trợ các hợp chất oligome (ví dụ, hợp chất đối nghĩa và axit nucleic đích của nó). Trong khi không bị hạn chế ở cơ chế cụ thể, cơ chế phổ biến nhất của việc ghép cặp liên quan đến liên kết hyđro, mà có thể là liên kết hyđro Watson-Crick, Hoogsteen hoặc Hoogsteen ngược, giữa các nucleobazơ bổ trợ.

Thuật ngữ "lai đặc hiệu" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là khả năng của hợp chất oligome được lai với một vị trí axit nucleic với ái lực cao hơn so với khi nó lai với vị trí axit nucleic khác.

Thuật ngữ "bổ trợ hoàn toàn" được dùng trong bản mô tả này liên quan đến oligonucleotit hoặc phần của chúng có nghĩa là mỗi nucleobazơ của oligonucleotit hoặc phần của chúng có khả năng tạo cặp với nucleobazơ của axit nucleic bổ trợ hoặc liền kề phần của chúng. Do đó, vùng bổ trợ hoàn toàn không chứa các sai lệch hoặc các nucleobazơ không được lai ở sợi khác.

Thuật ngữ "phần trăm phần bổ trợ" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là tỷ lệ phần trăm của các nucleobazơ của hợp chất oligome mà là bổ trợ cho phần chiều dài ngang bằng của axit nucleic đích. Phần trăm phần bổ trợ được tính bằng cách chia số lượng nucleobazơ của hợp chất oligome mà là bổ trợ cho các nucleobazơ ở vị trí tương ứng trong axit nucleic đích cho tổng chiều dài của hợp chất oligome.

Thuật ngữ "mức độ đồng nhất tính theo phần trăm" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là số lượng nucleobazơ trong axit nucleic thứ nhất mà là cùng loại (độc lập về mặt biến đổi hóa học) làm nucleobazơ ở vị trí tương ứng trong axit nucleic thứ hai, chia cho tổng số nucleobazơ trong axit nucleic thứ nhất.

Thuật ngữ "điều biến" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là sự thay đổi về lượng hoặc chất lượng của phân tử, chức năng, hoặc hoạt tính so với lượng hoặc chất lượng của phân tử, chức năng, hoặc hoạt tính trước khi điều biến. Ví dụ, điều biến bao gồm sự thay đổi, hoặc tăng (kích thích hoặc cảm ứng) hoặc giảm (ức chế hoặc giảm) trong mức độ biểu hiện gen. Theo ví dụ khác, điều biến việc biểu hiện có thể bao gồm

thay đổi về sự lựa chọn vị trí cắt ghép của việc xử lý tiền ARN thông tin, tạo ra thay đổi về lượng tuyệt đối hoặc tương đối của biến thể cắt ghép cụ thể so với lượng khi không điều biến.

Thuật ngữ "kiểu hóa học" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là kiểu hình cải biến hóa học trong oligonucleotit hoặc vùng của chúng. Các kiểu có thể được xác định bởi các cải biến ở các nucleosit nhất định và/hoặc ở một số nhóm liên kết của oligonucleotit.

Thuật ngữ "kiểu nucleosit" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là kiểu hình cải biến nucleosit trong oligonucleotit hoặc vùng của chúng. Các liên kết của oligonucleotit này có thể được cải biến hoặc không được cải biến. Trừ khi có quy định cụ thể khác, các kiểu mô tả trong bản mô tả này chỉ các nucleosit được dự định là các kiểu nucleosit. Do đó, trong các trường hợp này, các liên kết là không giới hạn.

Thuật ngữ "kiểu đường" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là kiểu hình cải biến đường trong oligonucleotit hoặc vùng của chúng.

Thuật ngữ "kiểu liên kết" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là kiểu hình cải biến liên kết trong oligonucleotit hoặc vùng của chúng. Các nucleosit này của oligonucleotit này có thể được cải biến hoặc không được cải biến. Trừ khi có quy định cụ thể khác, các kiểu mô tả trong bản mô tả này chỉ là các liên kết được dự định như các kiểu liên kết. Do đó, trong các trường hợp này, các nucleosit này là không giới hạn.

Thuật ngữ "kiểu cải biến nucleobazơ" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là kiểu hình cải biến đối với các nucleobazơ theo oligonucleotit. Trừ khi có quy định cụ thể khác, kiểu cải biến nucleobazơ là độc lập với trình tự nucleobazơ.

Thuật ngữ "kiểu trình tự" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là kiểu hình của các nucleobazơ được sắp xếp dọc theo oligonucleotit hoặc phần của chúng. Trừ khi có quy định cụ thể khác, kiểu trình tự là độc lập với các cải biến hóa học và do đó có thể có tổ hợp cải biến hóa học bất kỳ, kể cả không có cải biến hóa học.

Thuật ngữ "loại cải biến" được dùng trong bản mô tả này liên quan đến nucleosit hoặc nucleosit thuộc "loại" có nghĩa là nucleosit cải biến hóa học và bao gồm các nucleosit được cải biến và không được cải biến. Do đó, trừ khi có quy định cụ thể khác, "nucleosit có cải biến thuộc loại thứ nhất" có thể là nucleosit không được cải biến.

Thuật ngữ "được cải biến một cách khác biệt" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là các cải biến hóa học hoặc các phần tử thế hóa học mà khác nhau, kể cả không có cải biến. Do đó, ví dụ, nucleosit MOE và nucleosit ADN không được cải biến "được cải biến một cách khác biệt", mặc dù nucleosit ADN không được cải biến. Tương tự, ADN và ARN "được cải biến một cách khác biệt, mặc dù cả hai đều là nucleosit không được cải biến trong tự nhiên. Các nucleosit là giống nhau song lại chứa các nucleobazơ khác nhau không được cải biến một cách khác nhau. Ví dụ, nucleosit chứa đường được cải biến 2'-OMe và ađenin nucleobazơ không được cải biến và nucleosit chứa đường được cải biến 2'-OMe và thymin nucleobazơ không được cải biến là không được cải biến một cách khác nhau.

Thuật ngữ "các cải biến cùng loại" được dùng trong bản mô tả này để chỉ các cải biến giống nhau, kể cả không có cải biến. Do đó, ví dụ, hai nucleosit của ADN không được cải biến có "cải biến cùng loại", mặc dù nucleosit của ADN không được cải biến. Các nucleosit này có cùng loại cải biến có thể chứa các nucleobazơ khác nhau.

Thuật ngữ "các vùng riêng biệt" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là phần của oligonucleotit, trong đó các cải biến hóa học hoặc kiểu cải biến hóa học của các phần liền kề bất kỳ bao gồm ít nhất một khác biệt để cho phép phân biệt các vùng riêng biệt với nhau.

Thuật ngữ "chất mang dược dụng hoặc chất pha loãng" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là chất bất kỳ thích hợp để dùng cho động vật. Theo các phương án nhất định, chất mang dược dụng hoặc chất pha loãng là nước muối vô trùng. Theo các phương án nhất định, nước muối vô trùng này nước muối loại dùng cho dược phẩm.

Thuật ngữ "rối loạn chuyển hóa" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là bệnh hoặc tình trạng bệnh lý về nguyên tắc đặc trưng bởi rối loạn điều biến của tập hợp chuyển hóa – phức của các phản ứng hóa học liên quan đến sự phân hủy của thực phẩm để tạo ra năng lượng.

Thuật ngữ "rối loạn tim mạch" khi được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là bệnh hoặc tình trạng bệnh lý về nguyên tắc đặc trưng bởi chức năng suy yếu của tim hoặc các mạch máu.

Thuật ngữ "hệ nhân đơn vòng hoặc đa vòng" được dùng trong bản mô tả này được dự định bao gồm tất cả các hệ nhân được chọn từ các hệ nhân gốc đơn vòng hoặc đa vòng, trong đó các nhân được dung hợp hoặc được liên kết và được hiểu là bao gồm các hệ nhân đơn và hỗn hợp được chọn một cách riêng biệt từ nhân béo, vòng béo, aryl, heteroaryl, aralkyl, arylalkyl, dị vòng, heteroaryl, thơm khác loại và heteroarylalkyl. Các cấu trúc đơn vòng và đa vòng này có thể chứa các nhân mà mỗi nhân có cùng mức độ no hoặc mỗi nhân, một cách độc lập, có mức độ no khác nhau bao gồm hoàn toàn no, no một phần hoặc hoàn toàn không no. Mỗi nhân có thể chứa các nguyên tử trên nhân được chọn từ C, N, O và S để tạo ra các nhân dị vòng cũng như các nhân chỉ chứa nguyên tử C trên nhân mà có thể có mặt trong kiểu hỗn hợp ví dụ như benzimiđazol, trong đó một nhân chỉ có các nguyên tử cacbon trên nhân và nhân đã ngưng tụ có hai nguyên tử nitơ. Hệ nhân đơn vòng hoặc đa vòng có thể được thế tiếp bằng các phần tử thế ví dụ như phtalimit mà có hai nhóm =O đã được gắn vào một trong số các nhân. Các hệ nhân đơn vòng hoặc đa vòng có thể được gắn vào các phân tử gốc bằng cách sử dụng các chiến lược khác nhau như một cách trực tiếp thông qua nguyên tử trên nhân, dung hợp thông qua nhiều nguyên tử trên nhân, thông qua phần tử thế hoặc thông qua gốc liên kết chức kép.

Thuật ngữ “tiền dược chất” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là dạng hoạt tính thấp hơn hoặc không có hoạt tính của hợp chất mà, khi được dùng cho đối tượng, được chuyển hóa để tạo ra hợp chất có hoạt tính, hoặc hoạt tính mạnh hơn (ví dụ, thuốc).

Thuật ngữ "phần tử thế" và "nhóm thế" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nguyên tử hoặc nhóm mà thay thế nguyên tử này hoặc nhóm bao gồm hợp chất gốc được đặt tên. Ví dụ, phần tử thế của nucleosit đã được cải biến là nguyên tử hoặc nhóm bất kỳ mà khác nguyên tử này hoặc nhóm tìm thấy ở nucleosit có trong tự nhiên (ví dụ, nhóm thể được cải biến 2’ là nguyên tử hoặc nhóm bất kỳ ở vị trí 2’ của nucleosit khác với H hoặc OH). Các phần tử thế có thể được bảo vệ hoặc không được bảo vệ. Theo các phương án nhất định, các hợp chất trong bản mô tả này có các phần tử thế ở một hoặc ở nhiều hơn một vị trí của hợp chất gốc. Các phần tử thế còn có thể được thế tiếp bằng các phần tử thế khác và có thể được gắn một cách trực tiếp hoặc thông qua nhóm liên kết như alkyl hoặc nhóm hyđrocarbyl vào hợp chất gốc.

Tương tự, thuật ngữ "thế" được dùng trong bản mô tả này liên quan đến nhóm chức hóa học có nghĩa là nguyên tử hoặc nhóm bao gồm các nguyên tử mà khác nguyên tử này hoặc nhóm gồm các nguyên tử thông thường có mặt trong nhóm chức nêu tên. Theo các phương án nhất định, phần tử thế thế cho nguyên tử hyđro của nhóm chức đó (ví dụ, theo các phương án nhất định, phần tử thế của nhóm metyl được thế là nguyên tử hoặc nhóm khác với hyđro mà thế cho một trong số các nguyên tử hyđro của nhóm metyl không được thế). Trừ khi có quy định cụ thể khác, các nhóm sửa đổi được để dùng như các phần tử thế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, halogen, hyđroxyl, alkyl, alkenyl, alkynyl, axyl ($-C(O)R_{aa}$), carboxyl ($-C(O)O-R_{aa}$), các nhóm béo, các nhóm vòng béo, alkoxy, thế oxy ($-O-R_{aa}$), aryl, aralkyl, gốc dị vòng, heteroaryl, heteroarylalkyl, amino ($-N(R_{bb})(R_{cc})$), imino($=NR_{bb}$), amiđo ($-C(O)N(R_{bb})(R_{cc})$ hoặc $-N(R_{bb})C(O)R_{aa}$), aziđo ($-N_3$), nitro ($-NO_2$), xyano (-CN), carbamiđo ($-OC(O)N(R_{bb})(R_{cc})$ hoặc $-N(R_{bb})C(O)OR_{aa}$), ureiđo ($-N(R_{bb})C(O)N(R_{bb})(R_{cc})$), thioureiđo ($-N(R_{bb})C(S)N(R_{bb})(R_{cc})$), guaniđinyl ($-N(R_{bb})C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})$), amiđinyl ($-C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})$ hoặc $-N(R_{bb})C(=NR_{bb})(R_{aa})$), thiol ($-SR_{bb}$), sulfinyl ($-S(O)R_{bb}$), sulfonyl ($-S(O)_2R_{bb}$) và sulfonamiđyl ($-S(O)_2N(R_{bb})(R_{cc})$or $-N(R_{bb})S(O)_2R_{bb}$). Trong đó mỗi nhóm R_{aa}, R_{bb} và R_{cc} độc lập là H, nhóm chức hóa học được liên kết tùy ý hoặc phần tử thế khác có danh mục được ưu tiên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alkyl, alkenyl, alkynyl, béo, alkoxy, axyl, aryl, aralkyl, heteroaryl, vòng béo, dị vòng và heteroarylalkyl. Các phần tử thế chọn lọc nằm trong các hợp chất theo sáng chế có mặt ở mức độ tái diễn.

Thuật ngữ "alkyl" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là gốc hyđrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh no chứa đến hai mươi bốn nguyên tử cacbon. Các ví dụ về nhóm alkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metyl, etyl, propyl, butyl, isopropyl, n-hexyl, octyl, đexyl, đođexyl và các nhóm tương tự. Các nhóm alkyl thường bao gồm từ 1 đến 24 nguyên tử cacbon, thông thường hơn nằm trong khoảng từ 1 đến 12 nguyên tử cacbon (C_1-C_{12} alkyl) với nhóm có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon được ưu tiên hơn.

Thuật ngữ"alkenyl" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là gốc hyđrocacbon mạch nhánh hoặc mạch thẳng chứa đến hai mươi bốn nguyên tử cacbon và có ít nhất một cacbon-cacbon liên kết đôi. Các ví dụ về nhóm alkenyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, etenyl, propenyl, butenyl, 1-metyl-2-buten-1-yl, các đien như 1,3-butađien và các

nhóm tương tự. Các nhóm alkenyl thường bao gồm từ 2 đến 24 nguyên tử cacbon, thông thường hơn bằng từ 2 đến 12 nguyên tử cacbon với nhóm có từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon được ưu tiên hơn. Các nhóm alkenyl như được dùng trong bản mô tả này có thể tùy ý bao gồm một hoặc các phần tử thế khác.

Thuật ngữ "alkynyl" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là gốc hyđrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa đến hai mươi bốn nguyên tử cacbon và có ít nhất một cacbon-cacbon liên kết ba. Các ví dụ về nhóm alkynyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, etynyl, 1-propynyl, 1-butynyl, và các nhóm tương tự. Các nhóm alkynyl thường bao gồm từ 2 đến 24 nguyên tử cacbon, thông thường hơn bằng từ 2 đến 12 nguyên tử cacbon với nhóm có từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon được ưu tiên hơn. Các nhóm alkynyl như được dùng trong bản mô tả này có thể tùy ý bao gồm một hoặc các phần tử thế khác.

Thuật ngữ "axyl" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là gốc được tạo bởi việc loại bỏ nhóm hyđroxyl ra khỏi axit hữu cơ và có công thức chung -C(O)-X mà X thường là nhóm béo, vòng béo hoặc thơm. Các ví dụ bao gồm cacbonyl béo, cacbonyl thơm, các sulfonyl béo, các sulfinyl thơm, các sulfinyl béo, các phosphat thơm, các phosphat béo và các nhóm tương tự. Các nhóm axyl được dùng trong bản mô tả này có thể tùy ý bao gồm các phần tử thế khác.

Thuật ngữ "vòng béo" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hệ nhân vòng, trong đó nhân là nhân béo. Hệ nhân có thể chứa một hoặc nhiều nhân, trong đó ít nhất một nhân là nhân béo. Các vòng béo được ưu tiên bao gồm các nhân có khoảng từ 5 đến 9 nguyên tử cacbon trong nhân. Vòng béo như được dùng trong bản mô tả này có thể tùy ý bao gồm các phần tử thế khác.

Thuật ngữ "béo" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là gốc hyđrocacbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa đến hai mươi bốn nguyên tử cacbon, trong đó liên kết bão hòa giữa hai nguyên tử cacbon bất kỳ là liên kết đơn, liên kết đôi hoặc liên kết ba. Tốt hơn, nếu nhóm béo chứa từ 1 đến 24 nguyên tử cacbon, thường hơn nằm trong khoảng từ 1 đến 12 nguyên tử cacbon với nhóm có từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon được ưu tiên hơn. Mạch thẳng hoặc mạch nhánh của nhóm béo có thể bị ngắt mạch bằng một hoặc nhiều nguyên tử khác loại mà bao gồm nitơ, oxy, lưu huỳnh và phospho. Các nhóm béo này bị ngắt mạch bởi các nguyên tử khác loại bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các

polyalkoxy, như polyalkylen glycol, các polyamin, và các polyimin. Các nhóm béo như được dùng trong bản mô tả này có thể tùy ý bao gồm các phần tử thế khác.

Thuật ngữ "alkoxy" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là gốc được tạo ra bởi nhóm alkyl và nguyên tử oxy trong đó nguyên tử oxy được sử dụng để gắn nhóm alkoxy vào phân tử gốc. Các ví dụ về nhóm alkoxy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metoxy, etoxy, propoxy, isopropoxy, *n*-butoxy, sec-butoxy, *tert*-butoxy, n-pentoxy, neopentoxy, n-hexoxy và các nhóm tương tự. Các nhóm alkoxy như được dùng trong bản mô tả này có thể tùy ý bao gồm các phần tử thế khác.

Thuật ngữ "aminoalkyl" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là gốc alkyl C_1-C_{12} được thế amino. Phần alkyl của gốc tạo ra liên kết cộng hóa trị với phân tử gốc. Nhóm amin có thể được định vị ở vị trí bất kỳ và nhóm aminoalkyl có thể được thế bằng phần tử thế khác ở các phần alkyl và/hoặc amino .

Thuật ngữ "aralkyl" và "arylalkyl" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nhóm thơm mà được liên kết cộng hóa trị với gốc alkyl C_1-C_{12}. Phần gốc alkyl của nhóm aralkyl (hoặc arylalkyl) thu được tạo ra liên kết cộng hóa trị với phân tử gốc. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, benzyl, phenetyl và các nhóm tương tự. Các nhóm aralkyl như được dùng trong bản mô tả này có thể tùy ý bao gồm các phần tử thế khác đã được gắn vào alkyl, aryl hoặc cả hai nhóm mà tạo ra nhóm gốc.

Thuật ngữ "aryl" và "thơm" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là các gốc hệ nhân vòng cacbon một vòng hoặc nhiều vòng có một hoặc nhiều nhân thơm. Các ví dụ về nhóm aryl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phenyl, naphtyl, tetrahyđronaphtyl, inđanyl, idenyl và các nhóm tương tự. Các hệ nhân aryl được ưu tiên có từ 5 đến 20 nguyên tử cacbon trong một hoặc nhiều nhân. Các nhóm aryl như được dùng trong bản mô tả này có thể tùy ý bao gồm các phần tử thế khác.

Thuật ngữ "halo" và "halogen" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nguyên tử được chọn từ flo, clo, brom và iôt.

Thuật ngữ "heteroaryl" và "thơm khác loại" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là gốc chứa nhân thơm đơn vòng hoặc đa vòng, hệ nhân hoặc hệ nhân được ngưng tụ trong đó ít nhất một trong số các nhân là thơm và bao gồm một hoặc nhiều nguyên tử khác loại. Heteroaryl còn có nghĩa bao gồm các hệ nhân đã được ngưng tụ dung hợp bao

gồm các hệ mà một hoặc nhiều nhân đã được ngưng tụ không chứa các nguyên tử khác loại. Các nhóm heteroaryl thường bao gồm một nhân nguyên tử được chọn từ lưu huỳnh, nitơ hoặc oxy. Các ví dụ về nhóm heteroaryl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, pyriđinyl, pyrazinyl, pyrimiđinyl, pyrolyl, pyrazolyl, imiđazolyl, thiazolyl, oxazolyl, isooxazolyl, thiađiazolyl, oxađiazolyl, thiophenyl, furanyl, quinolinyl, isoquinolinyl, benzimiđazolyl, benzooxazolyl, quinoxalinyl và các nhóm tương tự. Các gốc heteroaryl có thể được gắn vào phân tử gốc một cách trực tiếp hoặc thông qua gốc liên kết như nhóm béo hoặc nguyên tử hetero. Các nhóm heteroaryl như được dùng trong bản mô tả này có thể tùy ý bao gồm các phần tử thế khác.

Thuật ngữ "hợp chất tiếp hợp" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là các nguyên tử bất kỳ, nhóm nguyên tử bất kỳ, hoặc nhóm gồm các nguyên tử đã được liên kết thích hợp để dùng làm nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, các hợp chất tiếp hợp có thể có hoặc tác động đến một hoặc nhiều tính chất, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đặc tính dược lực học, dược động học, liên kết, hấp thụ, phân bố tế bào, hấp thu vào tế bào, nạp và/hoặc thanh thải.

Trừ khi có quy định khác hoặc được cải biến, thuật ngữ "sợi đôi" được dùng trong bản mô tả này để chỉ hai hợp chất oligome riêng biệt mà được lai với nhau. Các hợp chất sợi đôi này có thể có một hoặc nhiều hoặc không có nucleosit lai ở một hoặc cả hai đầu của một hoặc cả hai sợi (các phần nhô) và/hoặc một hoặc nhiều nucleosit không lai bên trong (các sai lệch) được đề xuất có tính bổ trợ đủ để duy trì lai trong các điều kiện có liên quan về mặt sinh lý học.

B. Một số hợp chất nhất định

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các hợp chất đối nghĩa đã được tiếp hợp chứa các oligonucleotit đối nghĩa và thể tiếp hợp.

a. Các oligonucleotit đối nghĩa nhất định

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các oligonucleotit đối nghĩa. Các oligonucleotit đối nghĩa này chứa các nucleosit liên kết, mỗi nucleosit chứa gốc đường và nucleobazơ. Cấu trúc của các oligonucleotit đối nghĩa này có thể được xem xét về dấu hiệu hóa học (ví dụ, các cải biến và các kiểu hình cải biến) và trình tự nucleobazơ (ví dụ, trình tự oligonucleotit đối nghĩa, xác định và trình tự của axit nucleic đích).

i. Các dấu hiệu hóa học nhất định

Theo các phương án nhất định, oligonucleotit đối nghĩa bao gồm một hoặc nhiều cải biến. Theo một số phương án nhất định, các oligonucleotit đối nghĩa bao gồm một hoặc nhiều nucleosit được cải biến và/hoặc các liên kết giữa nucleosit được cải biến. Theo các phương án nhất định, các nucleosit cải biến bao gồm gốc đường cải biến và/hoặc nucleobazơ cải biến.

1. Các gốc đường nhất định

Theo các phương án nhất định, các hợp chất trong bản mô tả này bao gồm một hoặc nhiều nucleosit được cải biến chứa gốc đường được cải biến. Các hợp chất này chứa một hoặc nhiều nucleosit được cải biến đường có thể có thuộc tính mong muốn, như tính ổn định nucleaza nâng cao hoặc ái lực liên kết cao hơn với axit nucleic đích so với oligonucleotit chỉ chứa các nucleosit chứa các gốc có trong tự nhiên đường. Theo các phương án nhất định, các gốc đường cải biến là các gốc đường được thế. Theo các phương án nhất định, các gốc đường cải biến là các chất thay thế đường. Các chất thay thế đường này có thể bao gồm một hoặc nhiều chất thay thế tương ứng với các chất thay thể của các gốc đường được thế.

Theo các phương án nhất định, các gốc đường cải biến là các gốc đường được thế chứa một hoặc nhiều phần tử thế đường không cầu, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phần tử thế ở các vị trí 2' và/hoặc 5'. Các ví dụ về các phần tử thế đường thích hợp đối với vị trí 2', bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: 2'-F, 2'-OCH_3 ("OMe" hoặc "O-metyl"), và 2'-$O(CH_2)_2OCH_3$ ("MOE"). Theo các phương án nhất định, các phần tử thế đường ở vị trí 2' được chọn từ alyl, amino, aziđo, thio, O-alyl, O-C_1-C_{10} alkyl, O-C_1-C_{10} được thế alkyl; OCF_3, $O(CH_2)_2SCH_3$, $O(CH_2)_2$-O-N(Rm)(Rn), và O-CH_2-C(=O)-N(Rm)(Rn), khi mỗi nhóm Rm và Rn độc lập là H hoặc C_1-C_{10} alkyl được thế hoặc không được thế. Các ví dụ về các phần tử thế đường ở vị trí 5', bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở:, 5'-metyl (R hoặc S); 5'-vinyl, và 5'-metoxy. Theo các phương án nhất định, các đường được thế bao gồm nhiều hơn một phần tử thế đường không cầu, ví dụ, các gốc đường 2'-F-5'-metyl (xem, ví dụ, đơn quốc tế PCT số công bố WO 2008/101157, về các gốc đường được thế 5', 2'-bis và các nucleosit bổ sung).

Các nucleosit chứa các gốc đường được thế ở vị trí 2' được gọi là các nucleosit được thế ở vị trí 2'. Theo các phương án nhất định, nucleosit được thế ở vị trí 2' chứa nhóm thế 2' được chọn từ Halo, alyl, amino, aziđo, SH, CN, OCN, CF_3, OCF_3, O, S, hoặc $N(R_m)$-alkyl; O, S, hoặc $N(R_m)$-alkenyl; O, S hoặc $N(R_m)$-alkynyl; O-alkylenyl-O-alkyl, alkynyl, alkaryl, aralkyl, O-alkaryl, O-aralkyl, $O(CH_2)_2SCH_3$,$O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$ hoặc $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$, khi mỗi nhóm R_m và R_n một cách độc lập là H, nhóm bảo vệ amin hoặc C_1-C_{10} alkyl được thế hoặc không được thế. Các phần tử thế 2' này có thể được thế tiếp bằng một hoặc nhiều phần tử thế độc lập được chọn từ hyđroxyl, amino, alkoxy, carboxy, benzyl, phenyl, nitro (NO_2), thiol, thioalkoxy (S-alkyl), halogen, alkyl, aryl, alkenyl và alkynyl.

Theo các phương án nhất định, nucleosit được thế ở vị trí 2' chứa nhóm thế 2' được chọn từ F, NH_2, N_3, OCF_3, $O-CH_3$, $O(CH_2)_3NH_2$, $CH_2-CH=CH_2$, $O-CH_2-CH=CH_2$, $OCH_2CH_2OCH_3$, $O(CH_2)_2SCH_3$, $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$, $O(CH_2)_2O(CH_2)_2N(CH_3)_2$, và axetamit được thế N ($O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$ mà mỗi nhóm R_m và R_n độc lập là H, nhóm bảo vệ amin hoặc C_1-C_{10} alkyl được thế hoặc không được thế.

Theo các phương án nhất định, nucleosit được thế ở vị trí 2' chứa gốc đường chứa nhóm thế 2' được chọn từ F, OCF_3, $O-CH_3$, $OCH_2CH_2OCH_3$, $O(CH_2)_2SCH_3$, $O-(CH_2)_2-O-N(CH_3)_2$, $-O(CH_2)_2O(CH_2)_2N(CH_3)_2$, và $O-CH_2-C(=O)-N(H)CH_3$.

Theo các phương án nhất định, nucleosit được thế ở vị trí 2' chứa gốc đường chứa nhóm thế 2' được chọn từ F, $O-CH_3$, và $OCH_2CH_2OCH_3$.

Các gốc đường cải biến nhất định bao gồm phần tử thế đường kiểu cầu mà tạo ra nhân thứ hai tạo ra gốc đường hai vòng. Theo một số phương án nhất định, gốc đường hai vòng chứa cầu giữa các nguyên tử trên nhân furanoza 4' và 2'. Các ví dụ về phần tử thế đường 4' đến 2' này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: $-[C(R_a)(R_b)]_n-$, $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$, $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ hoặc, $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$; 4'-CH_2-2', 4'-$(CH_2)_2$-2', 4'-$(CH_2)_3$-2',. 4'-(CH_2)-O-2' (LNA); 4'-(CH_2)-S-2'; 4'-$(CH_2)_2$-O-2' (ENA); 4'-$CH(CH_3)$-O-2' (cEt) và 4'-$CH(CH_2OCH_3)$-O-2', và các chất tương tự của chúng (ví dụ, xem patent Mỹ số 7,399,845, cấp ngày 15 tháng 7 năm 2008); 4'-$C(CH_3)(CH_3)$-O-2' và các chất tương tự của chúng, (xem, ví dụ: WO2009/006478, công bố ngày 8 tháng 1 năm 2009); 4'-CH_2-$N(OCH_3)$-2' và các chất tương tự của chúng (xem, ví dụ: WO2008/150729, công bố ngày

11 tháng 12 năm 2008); 4'-CH_2-O-N(CH_3)-2' (xem, ví dụ: US2004/0171570, công bố ngày 2 tháng 9 năm 2004); 4'-CH_2-O-N(R)-2', và 4'-CH_2-N(R)-O-2'-, trong đó mỗi nhóm R, độc lập là H, nhóm bảo vệ, hoặc C_1-C_{12} alkyl; 4'-CH_2-N(R)-O-2', trong đó R là H, C_1-C_{12} alkyl, hoặc nhóm bảo vệ (xem: patent Mỹ số 7,427,672, cấp ngày 23 tháng 9 năm 2008); 4'-CH_2-C(H)(CH_3)-2' (xem, ví dụ: Chattopadhyaya, *et al., J. Org. Chem.*,2009, *74*, 118-134); và 4'-CH_2-C(=CH_2)-2' và các chất tương tự của chúng (xem công bố đơn quốc tế WO 2008/154401, công bố ngày 8 tháng 12 năm 2008).

Theo các phương án nhất định, các cầu 4' đến 2' này độc lập bao gồm từ 1 đến 4 nhóm liên kết độc lập được chọn từ -[C(R_a)(R_b)]$_n$-, -C(R_a)=C(R_b)-, -C(R_a)=N-, -C(=NR_a)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)$_2$-, -S(=O)$_x$-, và -N(R_a)-;

trong đó:

x bằng 0, 1, hoặc 2;

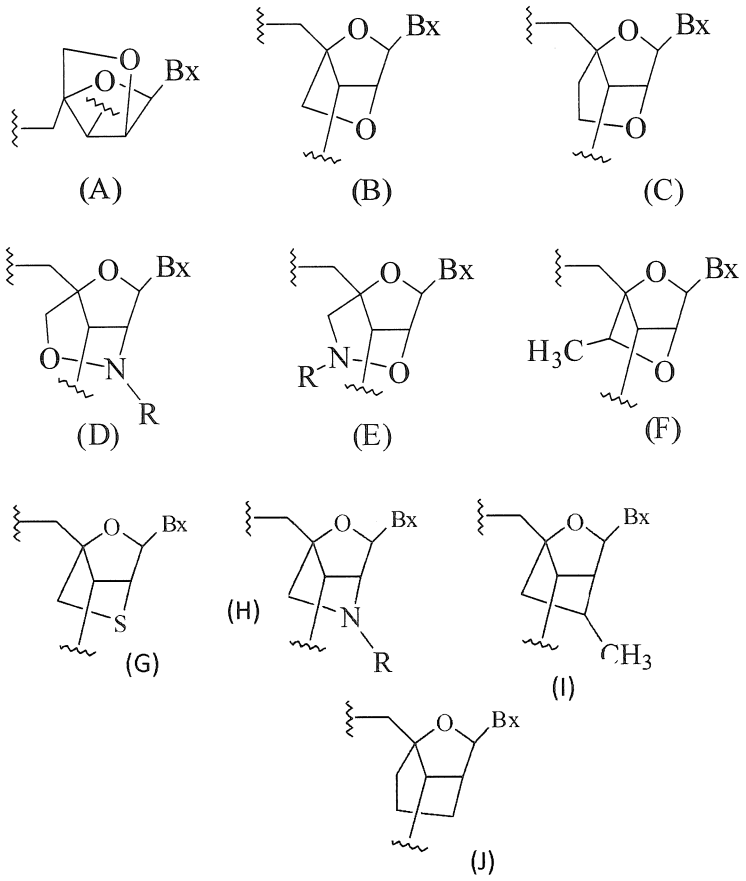
n bằng 1, 2, 3, hoặc 4;

mỗi nhóm R_a và R_b độc lập là H, nhóm bảo vệ, hyđroxyl, 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 đã được thế, gốc vòng béo C_5-C_7, gốc vòng béo C_5-C_7 được thế, halogen, OJ_1, NJ_1J_2, SJ_1, N_3, $COOJ_1$, axyl (C(=O)-H), axyl đã 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_{12} alkyl, C_1-C_{12} alkyl được thế, C_2-C_{12} alkenyl, thế C_2-C_{12} alkenyl, 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 đã 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.

Các nucleosit chứa các gốc đường hai vòng được gọi là các nucleosit hai vòng hoặc BNA. Các nucleosit hai vòng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (A) α-L-metylenoxy (4'-CH_2-O-2') BNA, (B) β-D-metylenoxy (4'-CH_2-O-2') BNA (còn được gọi là axit nucleic đã khóa hoặc LNA), (C) etylenoxy (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 (còn được gọi là etyl bị khóa hoặc cEt), (G) metylen-thio (4'-CH_2-S-2') BNA, (H) metylen-amino (4'-CH2-N(R)-2') BNA, (I) vòng

cacbon metyl (4'-CH_2-$CH(CH_3)$-2') BNA, và (J) vòng cacbon propylen (4'-$(CH_2)_3$-2') BNA như được minh họa dưới đây.



trong đó Bx là bazơ của gốc nucleotit và R độc lập là H, nhóm bảo vệ, hoặc C_1-C_{12} alkyl.

Các gốc đường hai vòng bổ sung là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, 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; Orum *et al.*, *Curr. Opinion Mol. Ther.*, 2001, *3*, 239-243; các patent Mỹ số 7,053,207, 6,268,490, 6,770,748, 6,794,499, 7,034,133, 6,525,191, 6,670,461, và 7,399,845; WO 2004/106356, WO 1994/14226, WO 2005/021570, và WO

2007/134181; các công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US2004/0171570, US2007/0287831, và US2008/0039618; 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 đơn quốc tế PCT số PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154, và PCT/US2008/068922.

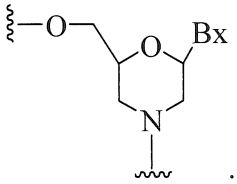
Theo các phương án nhất định, các gốc đường hai vòng và các nucleosit kết hợp các gốc đường hai vòng còn được xác định bởi cấu hình đồng phân. Ví dụ, nucleosit chứa cầu 4'-2' metylen-oxy, có thể là cấu hình α-L hoặc cấu hình β-D. Trước đây, α-L-metylenoxy (4'-CH_2-O-2') các nucleosit hai vòng đã được kết hợp vào các oligonucleotit đối nghĩa mà thể hiện hoạt tính đối nghĩa (Frieden *et al., Nucleic Acids Research,* 2003, *21*, 6365-6372).

Theo các phương án nhất định, các gốc đường đã được thế chứa một hoặc nhiều phần tử thế đường không cầu và một hoặc nhiều phần tử thế đường kiểu cầu (ví dụ, đường đã được thế ở vị trí 5' và đường cầu 4' đến 2'). (xem đơn quốc tế PCT số công bố WO 2007/134181, công bố ngày 22 tháng 11 năm 2007, trong đó LNA được thế, ví dụ, bằng nhóm 5'-metyl hoặc nhóm 5'-vinyl).

Theo các phương án nhất định, các gốc đường cải biến là các chất thay thế đường. Theo một số phương án nhất định, nguyên tử oxy của đường được thế có trong tự nhiên, ví dụ, bằng nguyên tử lưu huỳnh, cacbon hoặc nitơ. Theo một số phương án nhất định, gốc đường được cải biến này còn chứa các phần tử thế cầu và/hoặc không cầu như trên. Ví dụ, các chất thay thế đường nhất định bao gồm nguyên tử sulfer 4' và chất thay thế ở vị trí 2' (xem, ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ đã công bố số US2005/0130923, công bố ngày 16 tháng 6 năm 2005) và/hoặc vị trí 5'. Bằng cách ví dụ bổ sung, các nucleosit hai vòng vòng cacbon có cầu 4' đến 2' đã được bộc lộ (xem, ví dụ: Freier *et al., Nucleic Acids Research*, 1997, *25*(*22*), 4429-4443 và Albaek *et al., J. Org. Chem.*, 2006, *71*, 7731-7740).

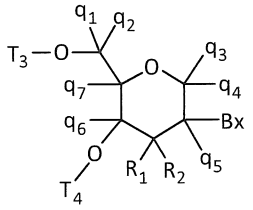
Theo các phương án nhất định, các chất thay thế đường bao gồm các nhân có khác với các nguyên tử 5. Ví dụ, theo các phương án nhất định, chất thay thế đường chứa morphlino. Các hợp chất morpholino và việc sử dụng chúng trong các hợp chất oligome đã được thông báo trong nhiều patent và bài báo đã công bố (ví dụ, xem: Braasch *et al., Biochemistry*, 2002, *41*, 4503-4510; và các patent Mỹ số 5,698,685; 5,166,315;

5,185,444; và 5,034,506). Thuật ngữ "morpholino" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là chất thay thế đường có cấu trúc sau:



Theo các phương án nhất định, các morpholino có thể được cải biến, ví dụ, bằng cách bổ sung hoặc làm thay đổi các phần tử thế khác nhau từ cấu trúc morpholino nêu trên. Các chất thay thế đường này, trong bản mô tả này, được gọi là "các morpholino đã được cải biến".

Để làm ví dụ khác, theo các phương án nhất định, chất thay thế đường chứa tetrahyđropyran có 6 cạnh. Các tetrahyđropyran này còn có thể được cải biến hoặc được thế. Các nucleosit chứa các tetrahyđropyran được cải biến này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axit hexitol nucleic (HNA), axit anitol nucleic (ANA), axit manitol nucleic (MNA) (*xem* Leumann, CJ. *Bioorg. & Med. Chem.* (2002) **10**:841-854), flo HNA (F-HNA), và các hợp chất này mà có Công thức VI:



VI

trong đó độc lập đối với từng gốc đã nêu ít nhất một chất tương tự nucleosit tetrahyđropyran có công thức VI:

Bx là bazơ của gốc nucleotit;

mỗi T_3 và T_4 độc lập là nhóm liên kết giữa nucleosit liên kết chất tương tự nucleosit tetrahyđropyran với hợp chất đối nghĩa hoặc một trong số T_3 và T_4 là nhóm liên kết giữa nucleosit liên kết chất tương tự nucleosit tetrahyđropyran với hợp chất đối nghĩa và hợp chất còn lại trong số T_3 và T_4 là H, nhóm hyđroxyl bảo vệ, nhóm tiếp hợp được liên kết, hoặc nhóm đầu tận cùng 5' hoặc 3';

mỗi q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6 và q_7 độc lập là H, 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; và

mỗi R_1 và R_2 độc lập được chọn trong số: hyđro, halogen, alkoxy thế hoặc không được thế, NJ_1J_2, SJ_1, N_3, $OC(=X)J_1$, $OC(=X)NJ_1J_2$, $NJ_3C(=X)NJ_1J_2$, và CN, trong đó X là O, S hoặc NJ_1, và mỗi J_1, J_2, và J_3 một cách độc lập là H hoặc C_1-C_6 alkyl.

Theo các phương án nhất định, các nucleosit THP được cải biến có công thức VI được đề xuất, trong đó từng q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6 và q_7 là H. Theo các phương án nhất định, ít nhất một trong số q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6 và q_7 không là H. Theo các phương án nhất định, ít nhất một trong số q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6 và q_7 là metyl. Theo các phương án nhất định, các nucleosit THP có công thức VI được đề xuất, trong đó một trong số R_1 và R_2 là F. Theo các phương án nhất định, R_1 là flo và R_2 là H, R_1 là metoxy và R_2 là H, và R_1 là metoxyetoxy và R_2 là H.

Các hệ nhân của chất thay thế đường bixyclo và trixyclo khác cũng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này mà có thể được sử dụng để cải biến các nucleosit để kết hợp vào các hợp chất đối nghĩa (ví dụ: xem bài báo: Leumann, J. C, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2002**, *10*, 841-854).

Các tổ hợp của các cải biến cũng được đề xuất mà không giới hạn, như các nucleosit được thế 2'-F-5'-metyl (xem đơn quốc tế PCT số công bố WO 2008/101157 công bố ngày 21 tháng 8 năm 2008 đối với các nucleosit 5', 2'-bis đã bộc lộ) và thay thế của nguyên tử oxy trên nhân ribosyl bằng S và thay thế tiếp ở vị trí 2' (xem đơn yêu cầu cấp patent Mỹ đã công bố số US2005-0130923, công bố ngày 16 tháng 6 năm 2005) hoặc theo cách khác thế ở vị trí 5' của axit nucleic hai vòng (xem đơn quốc tế PCT số công bố WO 2007/134181, công bố ngày 22 tháng 11 năm 2007, trong đó nucleosit hai vòng 4'-CH_2-O-2' được thế tiếp ở vị trí 5' bằng nhóm 5'-metyl hoặc nhóm 5'-vinyl). Quy trình tổng hợp và việc điều chế các nucleosit hai vòng cacbon cùng với việc oligome hóa chúng và các nghiên cứu sinh hóa cũng được mô tả (xem, ví dụ: Srivastava *et al., J. Am. Chem. Soc.* 2007, *129(26)*, 8362-8379).

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các oligonucleotit chứa các nucleosit được cải biến. Các nucleotit đã được cải biến này có thể bao gồm các đường được cải biến, các nucleobazơ được cải biến, và/hoặc các liên kết được cải biến. Các cải biến cụ thể được chọn sao cho các oligonucleotit thu được có các tính chất mong muốn.

Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit bao gồm một hoặc nhiều nucleosit kiểu ARN. Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit bao gồm một hoặc nhiều nucleotit kiểu ADN.

2. Cải biến nucleobazơ nhất định

Theo các phương án nhất định, các nucleosit trong bản mô tả này chứa một hoặc nhiều nucleobazơ không được cải biến. Theo các phương án nhất định, các nucleosit theo sáng chế chứa một hoặc nhiều nucleobazơ được cải biến.

Theo các phương án nhất định, các nucleobazơ được cải biến được chọn từ: các bazơ phổ biến, các bazơ kỵ nước, các bazơ pha tạp, các bazơ giãn nở kích thước, và các bazơ đã được flo hóa như được xác định trong bản mô tả này. pyrimiđin được thế 5, các azapyrimiđin 6 và purin được thế N-2, N-6 và O-6, bao gồm 2-aminopropylađenin, 5-propynyluraxil; 5-propynylxytosin; 5-hyđroxymetyl xytosin, xanthin, hypoxanthin, 2-aminoađenin, 6-metyl và các chất dẫn xuất alkyl khác của ađenin và guanin, 2-propyl và các chất dẫn xuất alkyl khác của ađenin và guanin, 2-thiouraxil, 2-thiothymin và 2-thioxytosin, 5-halouraxil và xytosin, 5-propynyl (-C≡C-CH_3) uraxil và xytosin và các chất dẫn xuất alkynyl khác của các bazơ pyrimiđin, các ađenin và guanin được thế6-azo uraxil, xytosin và thymin, 5-uraxil (pseudouraxil), 4-thiouraxil, 8-halo, 8-amino, 8-thiol, 8-thioalkyl, 8-hyđroxyl và 8- khác, các uraxil và xytosin được thế 5-halo cụ thể là 5-brom, 5-triflometyl và 5- khác, 7-metylguanin và 7-metylađenin, 2-F-ađenin, 2-amino-ađenin, 8-azaguanin và 8-azaađenin, 7-đeazaguanin và 7-đeazaađenin, 3-đeazaguanin và 3-đeazaađenin, các bazơ phổ biến, các bazơ kỵ nước, các bazơ pha tạp, các bazơ giãn nở kích thước, và các bazơ đã được flo hóa như được xác định trong bản mô tả này. Các nucleobazơ được cải biến tiếp bao gồm các pyrimiđin ba vòng như phenoxazin xytiđin ([5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-on), phenothiazin xytiđin (1H-pyrimiđo[5,4-b][1,4]benzothiazin-2(3H)-on), các kẹp G như phenoxazin xytiđin đã được thế (ví dụ, 9-(2-aminoetoxy)-H-pyrimiđo[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-on), carbazol xytiđin (2H-pyrimiđo[4,5-b]inđol-2-on), pyriđoinđol xytiđin (H-pyriđo[3',2':4,5]pyrolo[2,3-d]pyrimiđin-2-on). Các nucleobazơ được cải biến có thể còn bao gồm loại mà trong đó bazơ purin hoặc pyrimiđin được thế bằng các dị vòng khác, ví dụ, 7-đeaza-ađenin, 7-đeazaguanosin, 2-aminopyriđin và 2-pyriđon. Các nucleobazơ khác bao gồm loại đã bộc

lộ trong patent Mỹ số 3,687,808, loại đã bộc lộ trong: *The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; loại đã bộc lộ bởi Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, *30*, 613; và loại đã bộc lộ bởi Sanghvi, Y.S., Chapter 15, *Antisense Research and Applications*, Crooke, S.T. and Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288.

Các patent Mỹ được lấy làm ví dụ đã bộc lộ cách điều chế các nucleobazơ được cải biến nhất định nêu trên cũng như các nucleobazơ được cải biến khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các patent Mỹ số 3,687,808; 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,681,941; 5,750,692; 5,763,588; 5,830,653 và 6,005,096, một vài trong số này có cùng chủ đơn với đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này, và tất cả các tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn.

3. Các liên kết giữa nucleosit nhất định

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các oligonucleotit chứa các nucleosit liên kết. Theo các phương án này, các nucleosit có thể được liên kết với nhau bằng cách sử dụng liên kết giữa nucleosit bất kỳ. Hai nhóm chính gồm các nhóm liên kết giữa nucleosit được xác định bởi sự có mặt hoặc sự không có mặt của nguyên tử phospho. Liên kết giữa các nucleosit chứa phospho tiêu biểu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phosphođieste (PO), các phosphotrieste, các metylphosphonat, phosphoramiđat, và các phosphorothioat (PS). Các nhóm liên kết giữa nucleosit không chứa phospho tiêu biểu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metylenmetylimino (-CH_2-$N(CH_3)$-O-CH_2-), thiođieste (-O-C(O)-S-), thionocarbamat (-O-C(O)(NH)-S-); siloxan (-O-$Si(H)_2$-O-); và N,N'-đimetylhyđrazin (-CH_2-$N(CH_3)$-$N(CH_3)$-). Các liên kết được cải biến, so với các liên kết phosphođieste tự nhiên, có thể được sử dụng để thay đổi, thường là tăng, tính kháng nucleaza của oligonucleotit. Theo các phương án nhất định, liên kết giữa các nucleosit có nguyên tử không đối xứng có thể được điều chế như hỗn hợp triệt quang, hoặc như các chất đồng phân đối ảnh riêng biệt. Các liên kết không đối xứng được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các alkylphosphonat và các

phosphorothioat. Các phương pháp điều chế liên kết giữa các nucleosit chứa phospho và không chứa phospho là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các oligonucleotit được bộc lộ trong bản mô tả này có một hoặc nhiều tâm bất đối xứng và do đó tạo ra các chất đồng phân đối ảnh, các chất đồng phân không đối quang, và các cấu hình đồng phân lập thể khác mà có thể được xác định, về mặt hóa học lập thể tuyệt đối, như (*R*) hoặc (*S*), α hoặc β như đối với các anome đường, hoặc như (D) hoặc (L) như đối với các axit amin v.v.. Các hợp chất đối nghĩa theo sáng chế bao gồm cả các chất đồng phân có thể này, cũng như dạng triệt quang và dạng tinh khiết quang của chúng.

Liên kết giữa các nucleosit trung tính bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phosphotrieste, các metylphosphonat, MMI (3'-CH_2-N(CH_3)-O-5'), amit-3 (3'-CH_2-C(=O)-N(H)-5'), amit-4 (3'-CH_2-N(H)-C(=O)-5'), formaxetal (3'-O-CH_2-O-5'), và thioformaxetal (3'-S-CH_2-O-5'). Liên kết giữa các nucleosit trung tính khác bao gồm các liên kết không ion chứa siloxan (đialkylsiloxan), carboxylat este, carboxamit, sulfua, sulfonat este và các amit (Xem làm ví dụ: *Carbohydrate Modification in Antisense Research*; Y.S. Sanghvi and P.D. Cook, Eds., ACS Symposium Series 580; Chapters 3 và 4, 40-65). Các liên kết giữa các nucleosit trung tính khác nữa bao gồm các liên kết không ion chứa các phần thành phần N, O, S và CH_2 hỗn hợp.

4. Các kiểu nhất định

Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit đối nghĩa bao gồm một hoặc nhiều nucleosit được cải biến (ví dụ, nucleosit chứa đường được cải biến và/hoặc nucleobazơ được cải biến) và/hoặc một hoặc nhiều liên kết giữa nucleosit được cải biến. Kiểu hình của các cải biến này trên oligonucleotit được gọi trong bản mô tả này là kiểu. Theo các phương án nhất định, đường, nucleobazơ, và các kiểu liên kết là độc lập với nhau.

a. Các kiểu đường nhất định

Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit bao gồm một hoặc nhiều loại gốc đường đã được cải biến và/hoặc các gốc đường có trong tự nhiên được sắp xếp dọc theo oligonucleotit hoặc vùng của chúng theo kiểu hình đã định hoặc kiểu cải biến

đường. Các kiểu này có thể bao gồm cải biến đường bất kỳ trong số các cải biến đường bộc lộ trong bản mô tả này và/hoặc các cải biến đường đã biết khác.

Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit bao gồm hoặc gồm vùng có kiểu đường gapmer, mà chứa hai vùng ngoài hoặc "các cánh" và vùng tâm hoặc vùng bên trong hoặc "đoạn hở". Ba vùng của kiểu đường khe (cánh 5', đoạn hở, và cánh 3') tạo ra trình tự liền kề của các nucleosit trong đó ít nhất một số gốc đường của các nucleosit của mỗi cánh khác biệt so với ít nhất một số gốc đường của các nucleosit này của đoạn hở. Đặc biệt, ít nhất các gốc đường của các nucleosit của mỗi cánh là gần nhất với đoạn hở (nucleosit gần 3' nhất trong cánh 5' và nucleosit gần 5' nhất trong cánh 3') khác biệt so với gốc đường của các nucleosit có đoạn hở liền kề, do đó tạo ra đường bao giữa các cánh và đoạn hở. Theo các phương án nhất định, các gốc đường nằm bên trong đoạn hở là giống các gốc khác. Theo các phương án nhất định, đoạn hở bao gồm một hoặc nhiều nucleosit có gốc đường mà khác gốc đường của một hoặc nhiều nucleosit khác của đoạn hở. Theo các phương án nhất định, các kiểu đường của hai cánh là giống nhau (gapmer đường đối xứng). Theo các phương án nhất định, các kiểu đường của cánh 5' khác kiểu đường của cánh 3' (gapmer đường đối xứng).

i. Các cánh 5' nhất định

Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 1 đến 8 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 1 đến 7 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 1 đến 6 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 1 đến 5 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 2 đến 5 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 3 đến 5 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 4 hoặc 5 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 1 đến 4 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 1 đến 3 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 1 hoặc 2 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 2 đến 4 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 2 hoặc 3 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất

định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 3 hoặc 4 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 1 nucleosit. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 2 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 3 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 4 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 5 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer bao gồm 6 nucleosit liên kết.

Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer chứa ít nhất hai nucleosit hai vòng. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer chứa ít nhất ba nucleosit hai vòng. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer chứa ít nhất bốn nucleosit hai vòng. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit LNA. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của các cánh 5' của gapmer là nucleosit hai vòng. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của các cánh 5' của gapmer là etyl nucleosit cưỡng chế. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của các cánh 5' của gapmer là nucleosit LNA.

Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit được cải biến không hai vòng. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit được thế ở vị trí 2'. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit MOE 2'. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit OMe 2'. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của các cánh 5' của gapmer là nucleosit được cải biến không hai vòng. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của các cánh 5' của gapmer là nucleosit được thế ở vị trí 2'. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của các cánh 5' của gapmer là nucleosit MOE 2'. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của các cánh 5' của gapmer là nucleosit OMe 2' .

Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một đeoxynucleosit 2'. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của các cánh 5' của gapmer là đeoxynucleosit 2'. Theo các phương án nhất định, các cánh 5' của gapmer

chứa ít nhất một ribonucleosit. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của các cánh 5' của gapmer là ribonucleosit. Theo các phương án nhất định, một, nhiều hơn một, hoặc mỗi các nucleosit này của cánh 5'là nucleosit dạng ARN.

Theo các phương án nhất định, cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng và ít nhất một nucleosit được cải biến không hai vòng. Theo các phương án nhất định, cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng và ít nhất một nucleosit được thế ở vị trí 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng và ít nhất một nucleosit MOE 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng và ít nhất một nucleosit OMe 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng và ít nhất một đeoxynucleosit 2'.

Theo các phương án nhất định, cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế và ít nhất một nucleosit được cải biến không hai vòng. Theo các phương án nhất định, cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế và ít nhất một nucleosit được thế ở vị trí 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế và ít nhất một nucleosit MOE 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế và ít nhất một nucleosit OMe 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 5' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế và ít nhất một đeoxynucleosit 2'.

ii. Các cánh 3' nhất định

Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 1 đến 8 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 1 đến 7 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 1 đến 6 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 1 đến 5 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 2 đến 5 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 3 đến 5 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 4 hoặc 5 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 1 đến 4 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 1 đến 3 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 1 hoặc 2 nucleosit

liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 2 đến 4 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 2 hoặc 3 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 3 hoặc 4 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 1 nucleosit. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 2 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 3 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 4 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 5 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer bao gồm 6 nucleosit liên kết.

Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit LNA. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của cánh 3' của gapmer là nucleosit hai vòng. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của cánh 3' của gapmer là etyl nucleosit cưỡng chế. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của cánh 3' của gapmer là nucleosit LNA.

Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit được cải biến không hai vòng. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất hai nucleosit được cải biến không hai vòng. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất ba nucleosit được cải biến không hai vòng. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất bốn nucleosit được cải biến không hai vòng. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit được thế ở vị trí 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit MOE 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit OMe 2'. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của cánh 3' của gapmer là nucleosit được cải biến không hai vòng . Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của cánh 3' của gapmer là nucleosit được thế ở vị trí 2'. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của cánh 3' của gapmer là nucleosit MOE 2'. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của cánh 3' của gapmer là nucleosit OMe 2'.

Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một

đeoxynucleosit 2'. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của cánh 3' của gapmer là đeoxynucleosit 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một ribonucleosit. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của cánh 3' của gapmer là ribonucleosit. Theo các phương án nhất định, một, nhiều hơn một, hoặc mỗi các nucleosit này của cánh 5' là nucleosit dạng ARN.

Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng và ít nhất một nucleosit được cải biến không là loại hai vòng. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng và ít nhất một nucleosit được thế ở vị trí 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng và ít nhất một nucleosit MOE 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng và ít nhất một nucleosit OMe 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng và ít nhất một đeoxynucleosit 2'.

Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế và ít nhất một nucleosit được cải biến không hai vòng. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế và ít nhất một nucleosit được thế ở vị trí 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế và ít nhất một nucleosit MOE 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế và ít nhất một nucleosit OMe 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit khóa giữ và ít nhất một đeoxynucleosit 2'.

Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit LNA và ít nhất một nucleosit được cải biến không hai vòng. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit LNA và ít nhất một nucleosit được thế ở vị trí 2' . Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit LNA và ít nhất một nucleosit MOE 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit LNA và ít nhất một nucleosit OMe 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit LNA và ít nhất một đeoxynucleosit 2'.

Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng, ít nhất một nucleosit được cải biến không hai vòng, và ít nhất một đeoxynucleosit 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế, ít nhất một nucleosit được cải biến không hai vòng, và ít nhất một đeoxynucleosit 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit LNA, ít nhất một nucleosit được cải biến không hai vòng, và ít nhất một đeoxynucleosit 2'.

Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng, ít nhất một nucleosit được thế ở vị trí 2', và ít nhất một đeoxynucleosit 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế, ít nhất một nucleosit được thế ở vị trí 2', và ít nhất một đeoxynucleosit 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit LNA, ít nhất một nucleosit được thế ở vị trí 2', và ít nhất một đeoxynucleosit 2'.

Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng, ít nhất một nucleosit MOE 2', và ít nhất một đeoxynucleosit 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế, ít nhất một nucleosit MOE 2', và ít nhất một đeoxynucleosit 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit LNA, ít nhất một nucleosit MOE 2', và ít nhất một đeoxynucleosit 2'.

Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit hai vòng, ít nhất một nucleosit OMe 2', và ít nhất một đeoxynucleosit 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một etyl nucleosit cưỡng chế, ít nhất một nucleosit OMe 2', và ít nhất một đeoxynucleosit 2'. Theo các phương án nhất định, cánh 3' của gapmer chứa ít nhất một nucleosit LNA, ít nhất một nucleosit OMe 2', và ít nhất một đeoxynucleosit 2'.

iii. Các vùng giữa nhất định (các đoạn hở)

Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 6 đến 20 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 6 đến 15 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 6 đến 12 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 6 đến 10 nucleosit

liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 6 đến 9 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 6 đến 8 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 6 hoặc 7 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 7 đến 10 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 7 đến 9 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 7 hoặc 8 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 8 đến 10 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 8 hoặc 9 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 6 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 7 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 8 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 9 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 10 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 11 nucleosit liên kết. Theo các phương án nhất định, đoạn hở của gapmer bao gồm 12 nucleosit liên kết.

Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của đoạn hở của gapmer là đeoxynucleosit 2'. Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa một hoặc nhiều nucleosit được cải biến. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleosit của đoạn hở của gapmer là đeoxynucleosit 2' hoặc là nucleosit được cải biến mà là "kiểu ADN". Theo các phương án này, "kiểu ADN" có nghĩa là nucleosit có các tính chất tương tự với ADN, sao cho phức kép chứa gapmer và phân tử ARN có khả năng hoạt hóa H RNaza. Ví dụ, ở các điều kiện nhất định, 2'-(ara)-F đã được thấy để hỗ trợ việc hoạt hóa H RNaza, và do đó là kiểu ADN. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều nucleosit của đoạn hở của gapmer không phải là đeoxynucleosit 2' và không phải là kiểu ADN. Theo một số phương án nhất định, tuy nhiên gapmer hỗ trợ việc hoạt hóa H RNaza (ví dụ, do số lượng hoặc sự sắp đặt của các nucleosit không là ADN).

Theo các phương án nhất định, các đoạn hở bao gồm đoạn duỗi thẳng gồm đeoxynucleosit 2' không được cải biến bị ngắt mạch bởi một hoặc nhiều nucleosit được cải biến, do đó tạo ra ba vùng phụ (hai đoạn duỗi thẳng gồm một hoặc nhiều 2'-đeoxynucleosit và một duỗi thẳng gồm một hoặc nhiều nucleosit được cải biến làm đứt

mạch). Theo các phương án nhất định, không có đoạn duỗi thẳng gồm các 2'-đeoxynucleosit không được cải biến là dài hơn 5, 6, hoặc 7 nucleosit. Theo các phương án nhất định, các đoạn duỗi thẳng ngắn như vậy đạt được bằng cách sử dụng các vùng gián đoạn ngắn. Theo các phương án nhất định, các đoạn duỗi thẳng ngắn đạt được bằng cách làm đứt mạch vùng gián đoạn dài hơn.

Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa một hoặc nhiều các nucleosit được cải biến. Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa một hoặc nhiều nucleosit được cải biến được chọn trong số cEt, FHNA, LNA, và 2-thio-thymiđin. Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa một nucleosit được cải biến. Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa gốc đường được thế 5' được chọn trong số 5'-Me, và 5'-(*R*)-Me. Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa hai nucleosit được cải biến. Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa ba nucleosit được cải biến. Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa bốn nucleosit được cải biến. Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa hai hoặc nhiều nucleosit được cải biến và mỗi nucleosit được cải biến là giống nhau. Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa hai hoặc nhiều nucleosit được cải biến và cá nucleosit được cải biến là khác nhau.

Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa một hoặc nhiều liên kết được cải biến. Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa một hoặc nhiều liên kết metyl phosphonat. Theo các phương án nhất định đoạn hở chứa hai hoặc nhiều liên kết được cải biến. Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa một hoặc nhiều liên kết được cải biến và một hoặc nhiều nucleosit được cải biến. Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa một được cải biến liên kết và một nucleosit được cải biến. Theo các phương án nhất định, đoạn hở chứa hai các liên kết được cải biến và hai hoặc nhiều nucleosit được cải biến.

b. <u>Các kiểu liên kết giữa nucleosit nhất định</u>

Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit bao gồm các liên kết giữa nucleosit được cải biến được sắp xếp dọc theo oligonucleotit hoặc vùng của chúng theo kiểu hình đã định hoặc kiểu liên kết giữa nucleosit được cải biến. Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit bao gồm vùng có liên kết giữa kiểu nucleosit xen kẽ. Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit trong bản mô tả này bao gồm vùng các liên

kết giữa nucleosit được cải biến đồng đều. Theo một số phương án nhất định, oligonucleotit chứa vùng mà được liên kết một cách đồng đều nhờ liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit được liên kết một cách đồng đều nhờ liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, mỗi liên kết giữa nucleosit của oligonucleotit được chọn từ phosphođieste và phosphorothioat. Theo các phương án nhất định, mỗi liên kết giữa nucleosit của oligonucleotit được chọn từ phosphođieste và phosphorothioat và ít nhất một liên kết giữa nucleosit là phosphorothioat.

Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất 6 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất 7 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất 8 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất 9 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất 10 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất 11 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất 12 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất 13 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất 14 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit.

Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất một khối gồm ít nhất 6 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit liên tiếp. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất một khối gồm ít nhất 7 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit liên tiếp. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất một khối gồm ít nhất 8 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit liên tiếp. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất một khối gồm ít nhất 9 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit liên tiếp. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất một khối gồm ít nhất 10 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit liên tiếp. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít nhất một khối gồm ít nhất 12 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit liên tiếp. Theo một số phương án nhất định này, ít

nhất một khối này được định vị ở đầu tận cùng 3' của oligonucleotit. Theo một số phương án nhất định, ít nhất một khối này nằm trong 3 nucleosit của đầu tận cùng 3' của oligonucleotit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít hơn 15 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít hơn 14 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít hơn 13 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít hơn 12 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít hơn 11 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít hơn 10 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít hơn 9 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít hơn 8 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít hơn 7 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít hơn 6 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit chứa ít hơn 5 liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit.

c. Các kiểu cải biến nucleobazơ nhất định

Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit bao gồm các cải biến hóa học cho các nucleobazơ được sắp xếp dọc theo oligonucleotit hoặc vùng của chúng theo kiểu hình đã định hoặc các kiểu cải biến nucleobazơ. Theo một số phương án nhất định, nucleobazơ các cải biến được sắp xếp theo kiểu có đoạn hở. Theo các phương án nhất định, nucleobazơ các cải biến được sắp xếp theo kiểu xen kẽ. Theo các phương án nhất định, mỗi nucleobazơ được cải biến. Theo các phương án nhất định, không có các nucleobazơ được cải biến về mặt hóa học.

Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit bao gồm một khối gồm các nucleobazơ được cải biến. Theo một số phương án nhất định, khối này là ở đầu tận cùng 3' của oligonucleotit. Theo các phương án nhất định khối này là nằm trong 3 nucleotit của đầu tận cùng 3' của oligonucleotit. Theo một số phương án nhất định, khối này là ở đầu tận cùng 5' của oligonucleotit. Theo các phương án nhất định khối này là nằm trong 3 nucleotit của đầu tận cùng 5' của oligonucleotit.

Theo các phương án nhất định, các cải biến nucleobazơ là chức năng của bazơ tự nhiên ở vị trí cụ thể của oligonucleotit. Ví dụ, theo các phương án nhất định mỗi purin hoặc mỗi pyrimiđin trong oligonucleotit được cải biến. Theo các phương án nhất định, mỗi ađenin được cải biến. Theo các phương án nhất định, mỗi guanin được cải biến. Theo các phương án nhất định, mỗi thymin được cải biến. Theo các phương án nhất định, mỗi xytosin được cải biến. Theo các phương án nhất định, từng uraxil được cải biến.

Theo các phương án nhất định, một số, tất cả hoặc không có các gốc xytosin trong oligonucleotit là các gốc xytosin 5-metyl. Trong bản mô tả này, xytosin 5-metyl không phải là "nucleobazơ được cải biến". Do đó, trừ khi có quy định cụ thể khác, các nucleobazơ không được cải biến bao gồm cả các gốc xytosin có 5-metyl và các gốc không có 5 metyl. Theo các phương án nhất định, trạng thái metyl hóa của tất cả hoặc một số nucleobazơ xytosin được quy định.

Theo các phương án nhất định, các cải biến hóa học cho các nucleobazơ bao gồm việc gắn các nhóm tiếp hợp nhất định vào các nucleobazơ. Theo các phương án nhất định, mỗi purin hoặc mỗi pyrimiđin trong oligonucleotit có thể tùy ý được cải biến để bao gồm nhóm tiếp hợp.

d. Tổng chiều dài nhất định

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các oligonucleotit có chiều dài bất kỳ trong số các khoảng chiều dài. Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit gồm các nucleosit liên kết X đến Y, khi X thể hiện số nucleosit ít nhất trong một khoảng và Y thể hiện số nucleosit lớn nhất trong khoảng đó. Theo một số phương án nhất định, X và Y độc lập được chọn từ 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, và 50; với điều kiện $X \leq Y$. Ví dụ, theo các phương án nhất định, oligonucleotit có thể bao gồm 8 đến 9, 8 đến 10, 8 đến 11, 8 đến 12, 8 đến 13, 8 đến 14, 8 đến 15, 8 đến 16, 8 đến 17, 8 đến 18, 8 đến 19, 8 đến 20, 8 đến 21, 8 đến 22, 8 đến 23, 8 đến 24, 8 đến 25, 8 đến 26, 8 đến 27, 8 đến 28, 8 đến 29, 8 đến 30, 9 đến 10, 9 đến 11, 9 đến 12, 9 đến 13, 9 đến 14, 9 đến 15, 9 đến 16, 9 đến 17, 9 đến 18, 9 đến 19, 9 đến 20, 9 đến 21, 9 đến 22, 9 đến 23, 9 đến 24, 9 đến 25, 9 đến 26, 9 đến 27, 9 đến 28, 9 đến 29, 9 đến 30, 10 đến 11, 10 đến 12, 10 đến 13, 10 đến 14, 10 đến 15, 10 đến 16, 10 đến 17, 10 đến 18, 10 đến 19,

10 đến 20, 10 đến 21, 10 đến 22, 10 đến 23, 10 đến 24, 10 đến 25, 10 đến 26, 10 đến 27, 10 đến 28, 10 đến 29, 10 đến 30, 11 đến 12, 11 đến 13, 11 đến 14, 11 đến 15, 11 đến 16, 11 đến 17, 11 đến 18, 11 đến 19, 11 đến 20, 11 đến 21, 11 đến 22, 11 đến 23, 11 đến 24, 11 đến 25, 11 đến 26, 11 đến 27, 11 đến 28, 11 đến 29, 11 đến 30, 12 đến 13, 12 đến 14, 12 đến 15, 12 đến 16, 12 đến 17, 12 đến 18, 12 đến 19, 12 đến 20, 12 đến 21, 12 đến 22, 12 đến 23, 12 đến 24, 12 đến 25, 12 đến 26, 12 đến 27, 12 đến 28, 12 đến 29, 12 đến 30, 13 đến 14, 13 đến 15, 13 đến 16, 13 đến 17, 13 đến 18, 13 đến 19, 13 đến 20, 13 đến 21, 13 đến 22, 13 đến 23, 13 đến 24, 13 đến 25, 13 đến 26, 13 đến 27, 13 đến 28, 13 đến 29, 13 đến 30, 14 đến 15, 14 đến 16, 14 đến 17, 14 đến 18, 14 đến 19, 14 đến 20, 14 đến 21, 14 đến 22, 14 đến 23, 14 đến 24, 14 đến 25, 14 đến 26, 14 đến 27, 14 đến 28, 14 đến 29, 14 đến 30, 15 đến 16, 15 đến 17, 15 đến 18, 15 đến 19, 15 đến 20, 15 đến 21, 15 đến 22, 15 đến 23, 15 đến 24, 15 đến 25, 15 đến 26, 15 đến 27, 15 đến 28, 15 đến 29, 15 đến 30, 16 đến 17, 16 đến 18, 16 đến 19, 16 đến 20, 16 đến 21, 16 đến 22, 16 đến 23, 16 đến 24, 16 đến 25, 16 đến 26, 16 đến 27, 16 đến 28, 16 đến 29, 16 đến 30, 17 đến 18, 17 đến 19, 17 đến 20, 17 đến 21, 17 đến 22, 17 đến 23, 17 đến 24, 17 đến 25, 17 đến 26, 17 đến 27, 17 đến 28, 17 đến 29, 17 đến 30, 18 đến 19, 18 đến 20, 18 đến 21, 18 đến 22, 18 đến 23, 18 đến 24, 18 đến 25, 18 đến 26, 18 đến 27, 18 đến 28, 18 đến 29, 18 đến 30, 19 đến 20, 19 đến 21, 19 đến 22, 19 đến 23, 19 đến 24, 19 đến 25, 19 đến 26, 19 đến 29, 19 đến 28, 19 đến 29, 19 đến 30, 20 đến 21, 20 đến 22, 20 đến 23, 20 đến 24, 20 đến 25, 20 đến 26, 20 đến 27, 20 đến 28, 20 đến 29, 20 đến 30, 21 đến 22, 21 đến 23, 21 đến 24, 21 đến 25, 21 đến 26, 21 đến 27, 21 đến 28, 21 đến 29, 21 đến 30, 22 đến 23, 22 đến 24, 22 đến 25, 22 đến 26, 22 đến 27, 22 đến 28, 22 đến 29, 22 đến 30, 23 đến 24, 23 đến 25, 23 đến 26, 23 đến 27, 23 đến 28, 23 đến 29, 23 đến 30, 24 đến 25, 24 đến 26, 24 đến 27, 24 đến 28, 24 đến 29, 24 đến 30, 25 đến 26, 25 đến 27, 25 đến 28, 25 đến 29, 25 đến 30, 26 đến 27, 26 đến 28, 26 đến 29, 26 đến 30, 27 đến 28, 27 đến 29, 27 đến 30, 28 đến 29, 28 đến 30, hoặc 29 đến 30 nucleosit liên kết. Trong các phương án, nếu số lượng nucleosit của oligonucleotit của hợp chất bị giới hạn, cho dù trong một khoảng hoặc ở con số cụ thể, thì dù sao hợp chất này có thể còn bao gồm các phần tử thế bổ sung khác. Ví dụ, oligonucleotit chứa 8 đến 30 nucleosit không kể các oligonucleotit có 31 nucleosit, song, trừ khi có quy định cụ thể khác, oligonucleotit này có thể còn bao gồm, ví dụ, một hoặc

nhiều nhóm tiếp hợp, các nhóm đầu tận cùng, hoặc các phần tử thế khác.

Hơn nữa, khi oligonucleotit được mô tả theo khoảng chiều dài và theo khoảng có chiều dài đã định, và khi tổng chiều dài đã định của các vùng này là ngắn hơn giới hạn trên của khoảng tổng chiều dài, thì oligonucleotit có thể có các nucleosit bổ sung, vượt quá số lượng của khoảng đã định, với điều kiện tổng số nucleosit không vượt quá giới hạn trên của khoảng tổng chiều dài.

5. Các kiểu hóa học oligonucleotit đối nghĩa nhất định

Theo các phương án nhất định, các dấu hiệu cấu trúc hóa học của các oligonucleotit đối nghĩa được đặc trưng bởi kiểu đường, liên kết giữa kiểu nucleosit, kiểu cải biến nucleobazơ và tổng chiều dài của chúng. Theo các phương án nhất định, mỗi trong số các thông số này độc lập với nhau. Do đó, mỗi liên kết giữa nucleosit của oligonucleotit có kiểu đường gapmer có thể được cải biến hoặc không được cải biến và có thể hoặc không thể tuân theo kiểu hình gapmer cải biến của các cải biến đường. Do đó, liên kết giữa các nucleosit bên trong các vùng cánh của của gapmer đường có thể là giống hoặc khác nhau và có thể là giống hoặc khác liên kết giữa các nucleosit của vùng gián đoạn. Tương tự, các oligonucleotit đường gapmer này có thể bao gồm một hoặc nhiều nucleobazơ được cải biến độc lập với kiểu hình gapmer của các cải biến đối với đường. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng các kiểu này có thể được kết hợp để tạo ra nhiều loại oligonucleotit.

Theo các phương án nhất định, lựa chọn liên kết giữa nucleosit và cải biến nucleosit là không độc lập với nhau.

i. Các trình tự và các đích nhất định

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các oligonucleotit đối nghĩa có trình tự bổ trợ cho axit nucleic đích. Các hợp chất đối nghĩa này có khả năng lai với axit nucleic đích, tạo ra ít nhất một hoạt tính đối nghĩa. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa lai đặc hiệu với một hoặc nhiều axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa lai đặc hiệu có trình tự nucleobazơ chứa vùng đủ bổ trợ với axit nucleic đích để cho phép lai và gây ra hoạt tính đối nghĩa và không đủ bổ trợ với phần không là đích để tránh hoặc giảm mức độ lai không đặc hiệu đối với các trình tự axit nucleic không là đích trong các điều kiện mà trong đó mong muốn lai đặc hiệu (ví

dụ, trong các điều kiện sinh lý đối với ứng dụng *in vivo* hoặc ứng dụng điều trị bệnh, và trong các điều kiện mà trong đó các thử nghiệm được thực hiện trong trường hợp thử nghiệm *in vitro*). Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit được lựa chọn giữa đích và không đích, mặc dù cả đích và không đích đều bao gồm trình tự đích. Theo các phương án này, mức độ chọn lọc có thể tạo ra khả năng tiếp cận tương đối của vùng đích của một phân tử axit nucleic so với phân tử khác.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các hợp chất đối nghĩa chứa các oligonucleotit mà là bổ trợ hoàn toàn cho axit nucleic đích trên toàn bộ chiều dài của oligonucleotit. Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit bổ trợ 99% đối với axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit bổ trợ 95% đối với axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit này bổ trợ 90% đối với axit nucleic đích.

Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit này bổ trợ 85% đối với axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit này bổ trợ 80% đối với axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa chứa vùng mà bổ trợ hoàn toàn đối với axit nucleic đích và bổ trợ ít nhất 80% đối với axit nucleic đích trên toàn bộ chiều dài của oligonucleotit. Theo một số phương án nhất định, vùng bổ trợ hoàn toàn có chiều dài 6 đến 14 nucleobazơ.

Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit bao gồm vùng lai và vùng kết thúc. Theo một số phương án nhất định, vùng lai bao gồm 12 đến 30 nucleosit liên kết và là bổ trợ hoàn toàn cho axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, vùng lai bao gồm một sai lệch so với axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, vùng lai bao gồm hai sai lệch so với axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, vùng lai bao gồm ba sai lệch so với axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, vùng kết thúc bao gồm 1 đến 4 nucleosit kết thúc. Theo các phương án nhất định, các nucleosit kết thúc nằm ở đầu tận cùng 3'. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều nucleosit kết thúc là không bổ trợ cho axit nucleic đích.

Các cơ chế đối nghĩa bao gồm cơ chế bất kỳ liên quan đến việc lai oligonucleotit với axit nucleic đích, trong đó việc lai này dẫn đến hiệu quả sinh học. Theo các phương án nhất định, việc lai này dẫn đến sự thoái biến axit nucleic đích hoặc chiếm chỗ với sự

ức chế đồng phát hoặc kích thích của tổ chức tế bào có liên quan, ví dụ, dịch mã, phiên mã, hoặc cắt ghép axit nucleic đích.

Một loại cơ chế đối nghĩa liên quan đến thoái biến ARN đích là gen đối nghĩa gián tiếp H RNaza. H RNaza là enđonucleaza tế bào mà phân cắt sợi ARN của cặp ARN:ADN. Trong lĩnh vực kỹ thuật này, đã biết rằng các hợp chất đối nghĩa sợi đơn mà là "kiểu ADN" thể hiện hoạt tính H RNaza ở tế bào của động vật có vú. Do đó, việc hoạt hóa H RNaza dẫn đến mức độ phân cắt đích ARN, nhờ đó làm gia tăng đáng kể hiệu quả ức chế biểu hiện gen gián tiếp nhờ oligonucleotit kiểu ADN.

Theo các phương án nhất định, nhóm tiếp hợp chứa gốc phân cắt được. Theo các phương án nhất định, nhóm tiếp hợp chứa một hoặc nhiều liên kết tách được. Theo các phương án nhất định, nhóm tiếp hợp chứa nhóm liên kết. Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết chứa gốc liên kết protein. Theo các phương án nhất định, nhóm tiếp hợp chứa gốc hướng đích đến tế bào (còn được gọi là nhóm tế bào hướng đích). Theo các phương án nhất định gốc hướng đích đến tế bào chứa nhóm phân nhánh. Theo các phương án nhất định, gốc hướng đích đến tế bào chứa một hoặc nhiều nhóm dắt. Theo các phương án nhất định, gốc hướng đích đến tế bào chứa hyđrat cacbon hoặc cụm hyđrat cacbon.

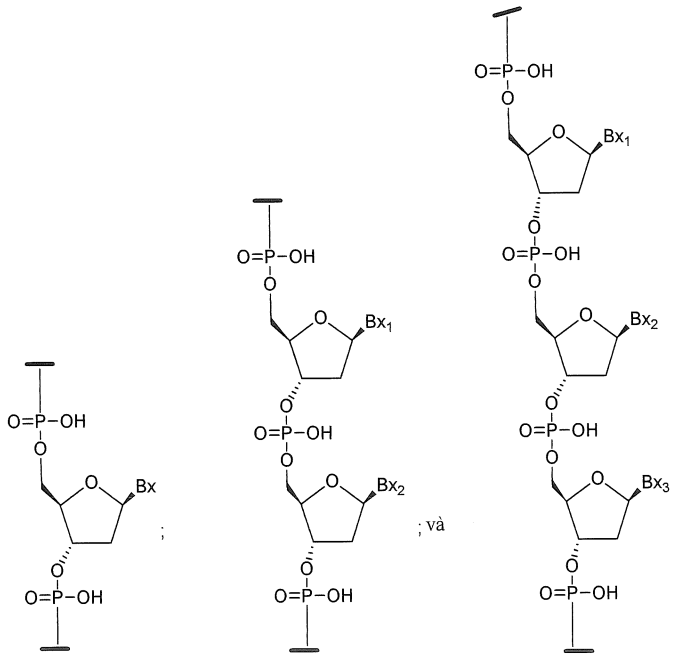
ii. <u>Các gốc tách được nhất định</u>

Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là liên kết tách được. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được chứa liên kết tách được. Theo các phương án nhất định, nhóm tiếp hợp chứa gốc phân cắt được. Theo một số phương án nhất định, gốc phân cắt được gắn vào oligonucleotit đối nghĩa. Theo một số phương án nhất định, gốc phân cắt được gắn một cách trực tiếp vào gốc hướng đích đến tế bào. Theo một số phương án nhất định, gốc phân cắt được gắn vào liên kết của thể tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được chứa phosphat hoặc phosphođieste. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là nucleosit hoặc chất tương tự nucleosit tách được. Theo các phương án nhất định, nucleosit hoặc chất tương tự nucleosit chứa bazơ dị vòng tùy ý được bảo vệ được chọn từ purin, purin đã được thế, pyrimiđin hoặc được thế pyrimiđin. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là nucleosit chứa bazơ dị vòng tùy ý được bảo vệ được chọn từ uraxil, thymin, xytosin, 4-N-benzoylxytosin, 5-

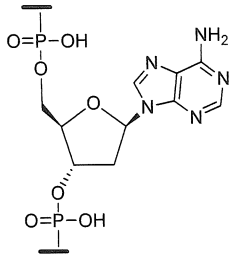
metylxytosin, 4-N-benzoyl-5-metylxytosin, ađenin, 6-N-benzoylađenin, guanin và 2-N-isobutyrylguanin. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là 2'-đeoxy nucleosit mà được gắn vào vị trí 3' của oligonucleotit đối nghĩa bằng phosphođieste liên kết và gắn vào nhóm liên kết bằng phosphođieste hoặc liên kết phosphorothioat. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là 2'-đeoxy ađenosin mà được gắn vào vị trí 3' của oligonucleotit đối nghĩa bằng liên kết phosphođieste và gắn vào nhóm liên kết bằng phosphođieste hoặc liên kết phosphorothioat. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là 2'-đeoxy ađenosin mà được gắn vào vị trí 3' của oligonucleotit đối nghĩa bằng liên kết phosphođieste và gắn vào nhóm liên kết bằng liên kết phosphođieste.

Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được được gắn vào vị trí 3' của oligonucleotit đối nghĩa. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được được gắn vào vị trí 5' của oligonucleotit đối nghĩa. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được được gắn vào vị trí 2' của oligonucleotit đối nghĩa. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được được gắn vào oligonucleotit đối nghĩa bằng liên kết phosphođieste. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được được gắn vào nhóm liên kết nhờ liên kết phosphođieste hoặc liên kết phosphorothioat. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được được gắn vào nhóm liên kết bằng liên kết phosphođieste. Theo các phương án nhất định, nhóm tiếp hợp không bao gồm gốc phân cắt được.

Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được được tách sau khi phức đã được dùng cho động vật chỉ sau khi được tiếp thu bởi tế bào đích. Nhờ đó tế bào gốc phân cắt được được tách giải phóng oligonucleotit đối nghĩa hoạt hóa bên trong. Trong khi không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, tin rằng gốc phân cắt được được tách bởi một hoặc nhiều nucleaza bên trong tế bào. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều nucleaza tách liên kết phosphođieste giữa gốc phân cắt được và nhóm liên kết. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được có cấu trúc được chọn trong số các cấu trúc sau:



trong đó mỗi Bx, Bx_1, Bx_2, và Bx_3 độc lập là gốc bazơ dị vòng. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được có cấu trúc được chọn trong số các cấu trúc sau:



iii. <u>Các nhóm liên kết nhất định</u>

Theo các phương án nhất định, các nhóm tiếp hợp bao gồm nhóm liên kết. Theo một số phương án nhất định, nhóm liên kết là liên kết cộng hóa trị với gốc phân cắt được. Theo một số phương án nhất định, nhóm liên kết là liên kết cộng hóa trị với oligonucleotit đối nghĩa. Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết là liên kết cộng hóa trị với gốc hướng đích đến tế bào. Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết còn chứa nhóm gắn cộng hóa trị vào nền rắn. Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết còn chứa nhóm gắn cộng hóa trị vào gốc liên kết protein. Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết còn chứa nhóm gắn cộng hóa trị vào nền rắn và còn chứa nhóm gắn cộng hóa trị vào gốc liên kết protein. Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết bao gồm

nhiều vị trí để gắn các phối tử đã được dắt. Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết bao gồm nhiều vị trí để gắn các phối tử đã được dắt và không được gắn vào nhóm phân nhánh. Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết còn chứa một hoặc nhiều liên kết tách được. Theo các phương án nhất định, nhóm tiếp hợp không bao gồm nhóm liên kết.

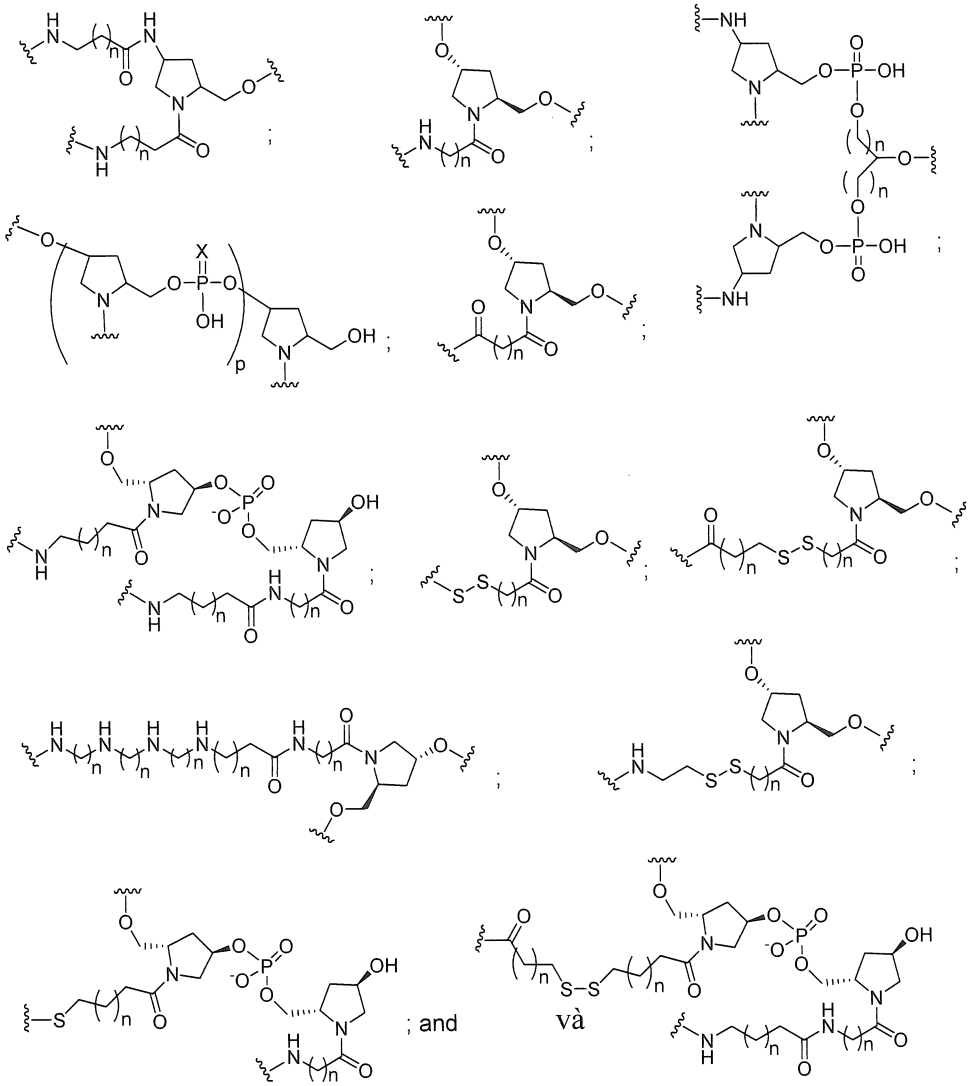
Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết bao gồm ít nhất một nhóm tuyến tính chứa các nhóm được chọn từ các nhóm alkyl, amit, đisulfua, polyetylen glycol, ete, thioete (-S-) và hyđroxylamino (-O-N(H)-). Theo các phương án nhất định, nhóm tuyến tính chứa các nhóm được chọn từ các nhóm alkyl, amit và ete. Theo các phương án nhất định, nhóm tuyến tính chứa các nhóm được chọn từ các nhóm alkyl và ete. Theo các phương án nhất định, nhóm tuyến tính chứa ít nhất một nhóm liên kết phospho. Theo các phương án nhất định, nhóm tuyến tính chứa ít nhất một nhóm phosphođieste. Theo các phương án nhất định, nhóm tuyến tính bao gồm ít nhất một nhóm liên kết trung tính. Theo các phương án nhất định, nhóm tuyến tính được gắn cộng hóa trị vào gốc hướng đích đến tế bào và gốc phân cắt được. Theo các phương án nhất định, nhóm tuyến tính được gắn cộng hóa trị vào gốc hướng đích đến tế bào và oligonucleotit đối nghĩa. Theo các phương án nhất định, nhóm tuyến tính được gắn cộng hóa trị vào gốc hướng đích đến tế bào, gốc phân cắt được và nền rắn. Theo các phương án nhất định, nhóm tuyến tính được gắn cộng hóa trị vào gốc hướng đích đến tế bào, gốc phân cắt được, nền rắn và gốc liên kết protein. Theo các phương án nhất định, nhóm tuyến tính bao gồm một hoặc nhiều liên kết tách được.

Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết bao gồm nhóm tuyến tính đã được gắn cộng hóa trị vào nhóm treo. Theo các phương án nhất định, nhóm treo bao gồm nhóm béo phân nhánh chứa các nhóm được chọn từ các nhóm alkyl, amit, đisulfua, polyetylen glycol, ete, thioete và hyđroxylamino. Theo các phương án nhất định, nhóm treo bao gồm nhóm béo phân nhánh chứa các nhóm được chọn từ các nhóm alkyl, amit và ete. Theo các phương án nhất định, nhóm treo bao gồm ít nhất một hệ nhân đơn vòng hoặc đa vòng. Theo các phương án nhất định, nhóm treo bao gồm ít nhất hai các hệ nhân đơn vòng hoặc đa vòng. Theo các phương án nhất định, nhóm tuyến tính được gắn cộng hóa trị vào nhóm treo và nhóm treo được gắn cộng hóa trị vào gốc phân cắt được và nhóm liên kết. Theo các phương án nhất định, nhóm tuyến tính được gắn cộng hóa trị vào nhóm treo và

nhóm treo được gắn cộng hóa trị vào gốc phân cắt được, nhóm liên kết và nền rắn. Theo các phương án nhất định, nhóm tuyến tính được gắn cộng hóa trị vào nhóm treo và nhóm treo được gắn cộng hóa trị vào gốc phân cắt được, nhóm liên kết và gốc liên kết protein. Theo các phương án nhất định, nhóm tuyến tính được gắn cộng hóa trị vào nhóm treo và nhóm treo được gắn cộng hóa trị vào gốc phân cắt được, nhóm liên kết, gốc liên kết protein và nền rắn. Theo các phương án nhất định, nhóm treo bao gồm một hoặc nhiều liên kết tách được.

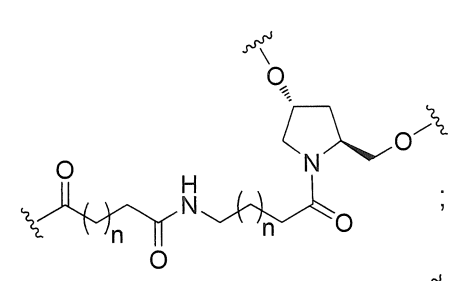
Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết bao gồm gốc liên kết protein. Theo các phương án nhất định, gốc liên kết protein là lipit như theo ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cholesteol, axit cholic, axit ađamantan axetic, axit 1-pyren butyric, đihyđrotestosteron, 1,3-Bis-O(hexađexyl)glyxerol, nhóm geranyloxyhexyl, hexađexylglyxerol, borneol, tinh dầu bạc hà, 1,3-propanđiol, nhóm heptađexyl, axit palmitic, axit myristic, axit O3-(oleoyl)litocholic, axit O3-(oleoyl)cholenic, đimetoxytrityl, hoặc phenoxazin), vitamin (ví dụ, folat, vitamin A, vitamin E, biotin, pyriđoxal), peptit, hyđrat cacbon (ví dụ, monosacarit, đisacarit, trisacarit, tetrasacarit, oligosacarit, polysacarit), thành phần endosomolytic, steroit (ví dụ, uvaol, hexigenin, điosgenin), terpen (ví dụ, triterpen, ví dụ, sarsasapogenin, friedelin, axit litocholic dẫn xuất epifriedelanol), hoặc lipit cation. Theo các phương án nhất định, gốc liên kết protein là axit béo no hoặc không no mạch dài C16 đến C22, cholesterol, axit cholic, vitamin E, ađamantan hoặc 1-pentaflopropyl.

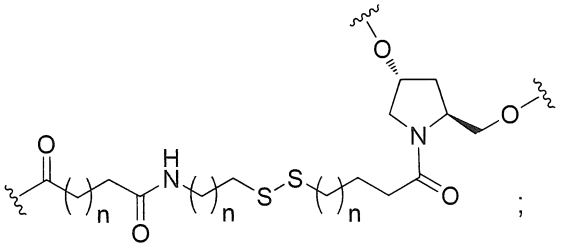
Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có cấu trúc được chọn trong số:

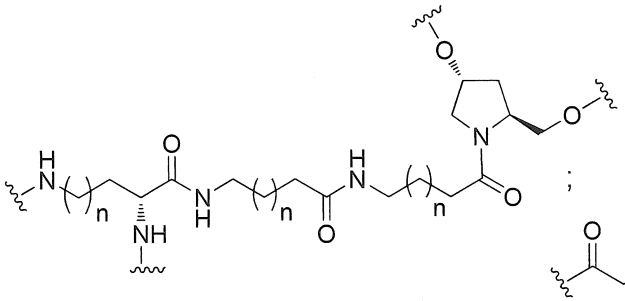


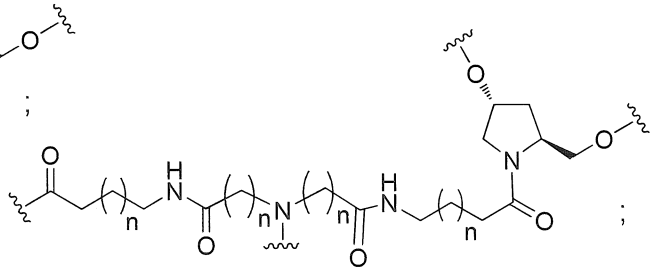
trong đó mỗi n độc lập bằng từ 1 đến 20; và p bằng từ 1 đến 6.

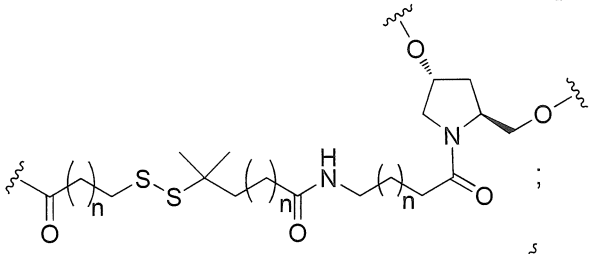
Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có cấu trúc được chọn trong số:

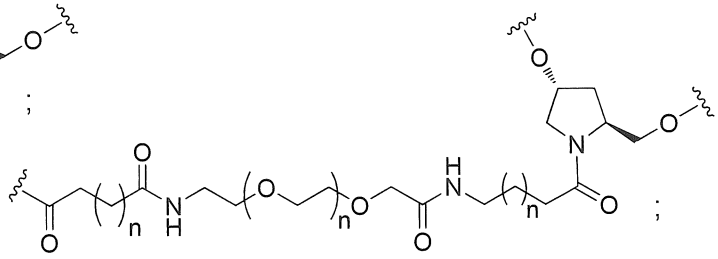

;

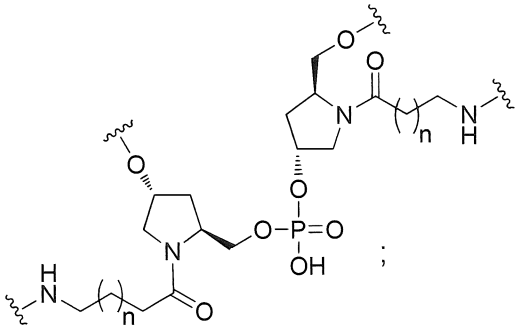

;

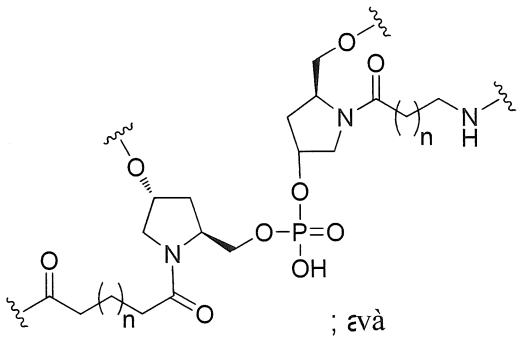

;


;

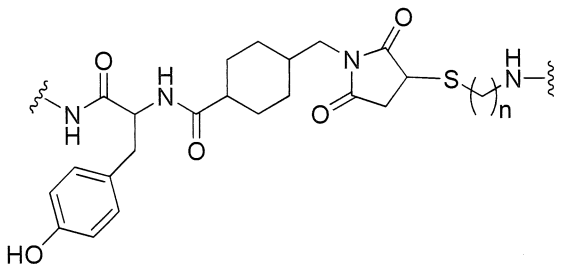

;


;


;

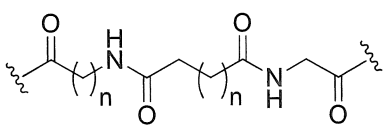
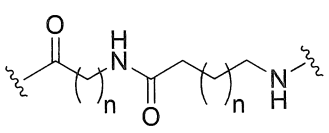
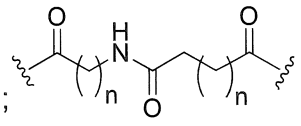

; εvà

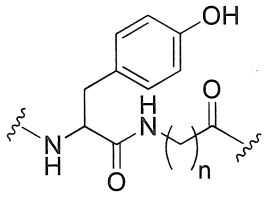
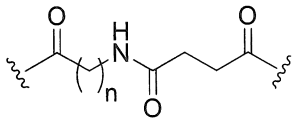
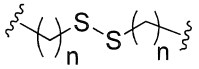
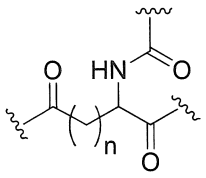
và

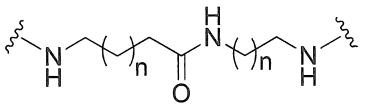
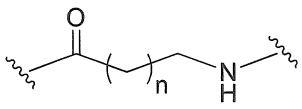
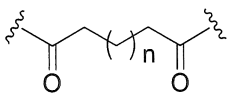


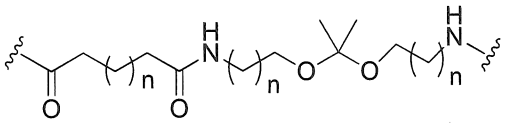
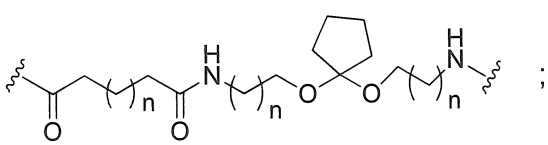
trong đó mỗi n độc lập bằng từ 1 đến 20.

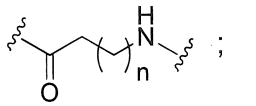
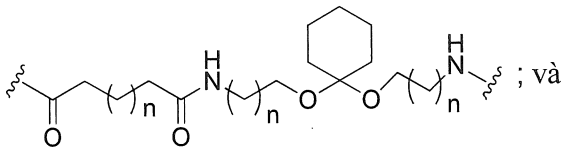
Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có cấu trúc được chọn trong số:

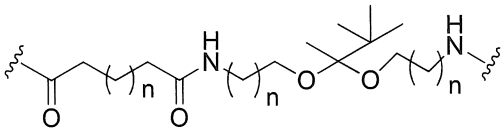

;

;

;


;

;

;

;


;

;

;

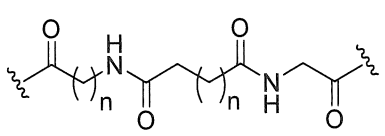
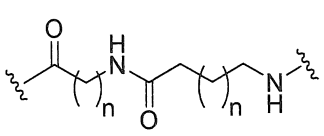
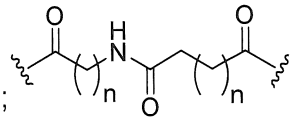

;

;

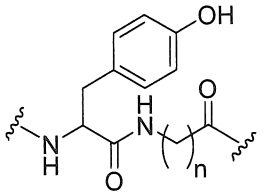
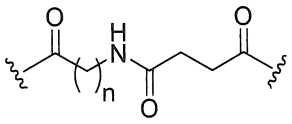
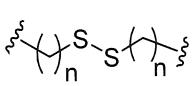
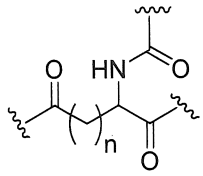

;

; và

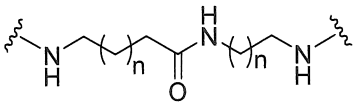
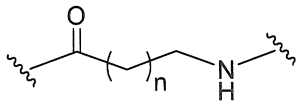
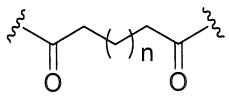
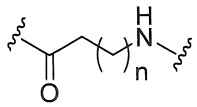


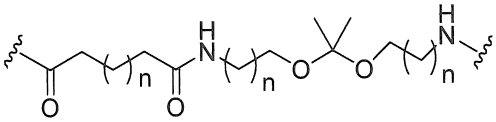
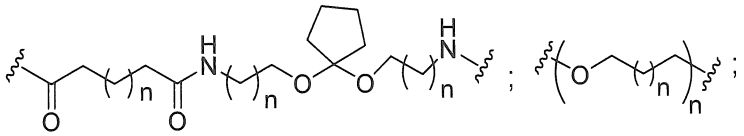
trong đó n bằng từ 1 đến 20.

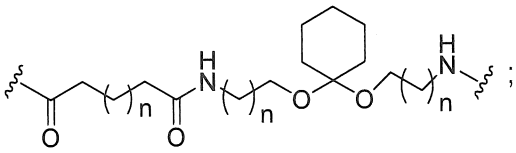
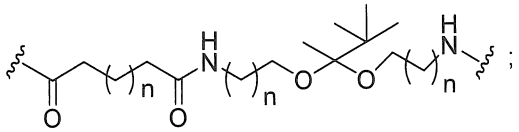
Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có cấu trúc được chọn trong số:

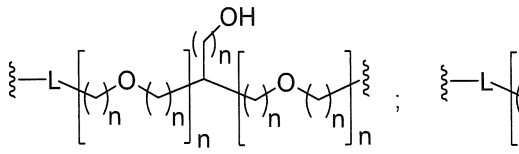
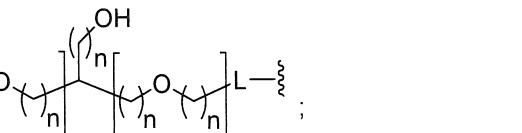

;

;

;


;

;

;

;


;

;

;

;

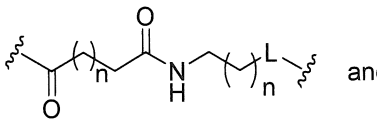
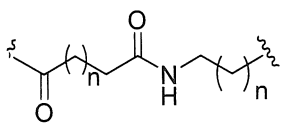

;

;


;

;


;

;

;

;

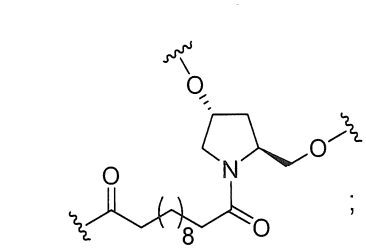
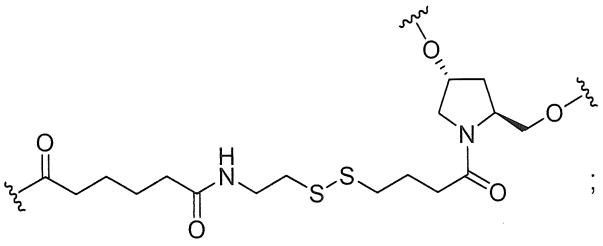
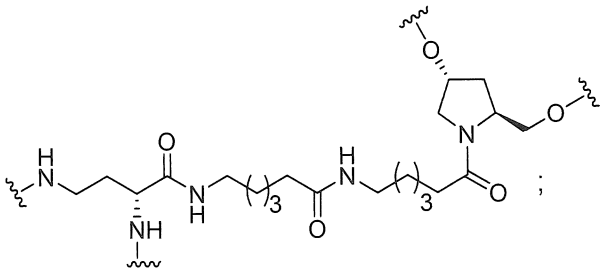
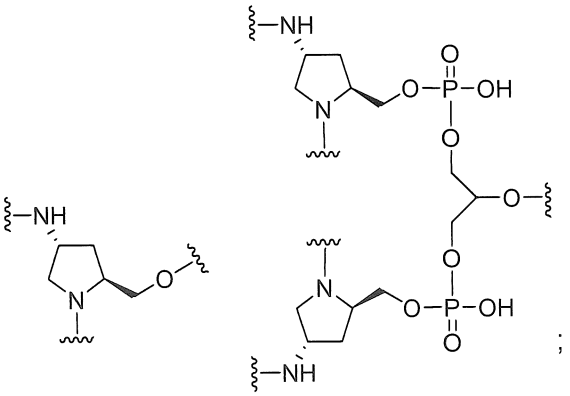
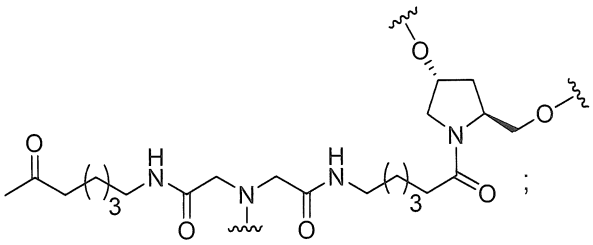
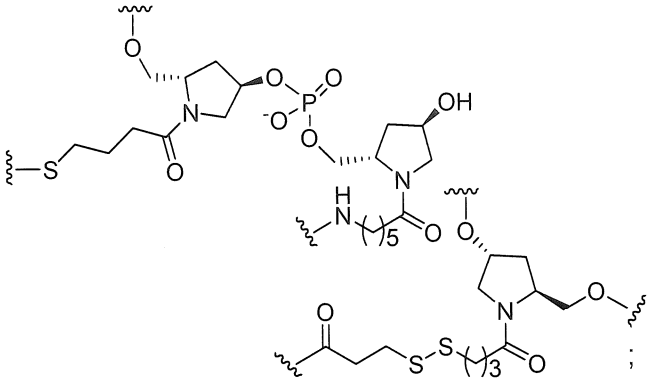
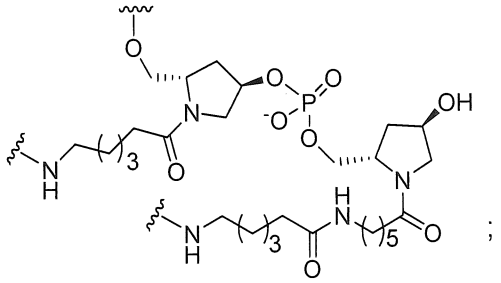
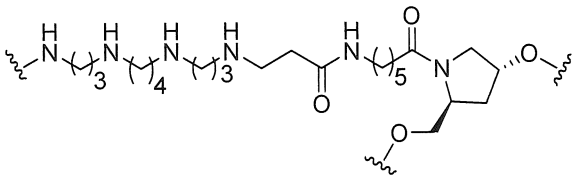
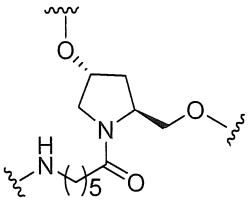
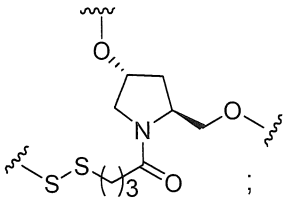
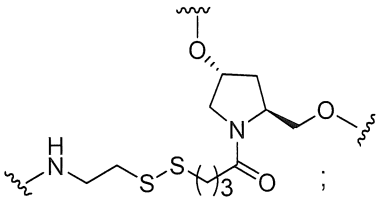
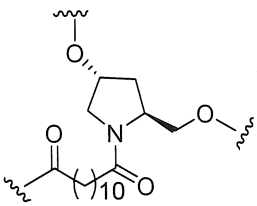
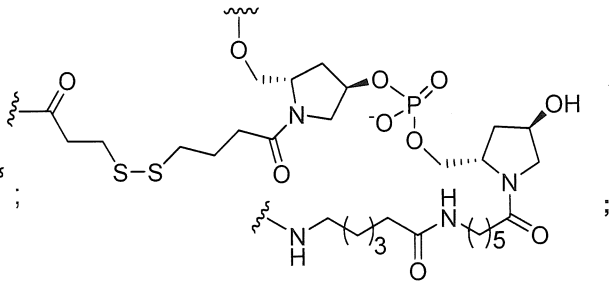

and và

.

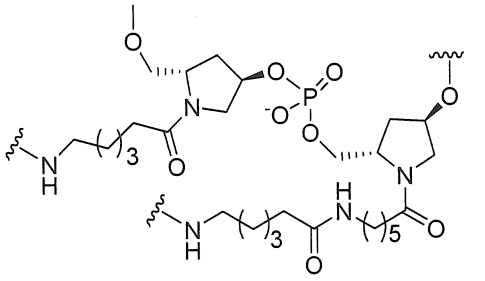
trong đó mỗi L độc lập là nhóm liên kết phospho hoặc nhóm liên kết trung tính;

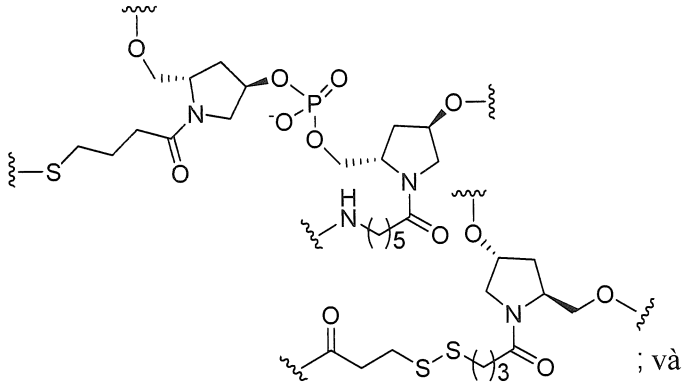
và

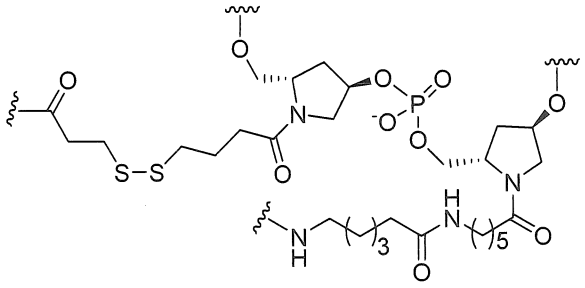
mỗi n độc lập bằng từ 1 đến 20.

Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có cấu trúc được chọn trong số:

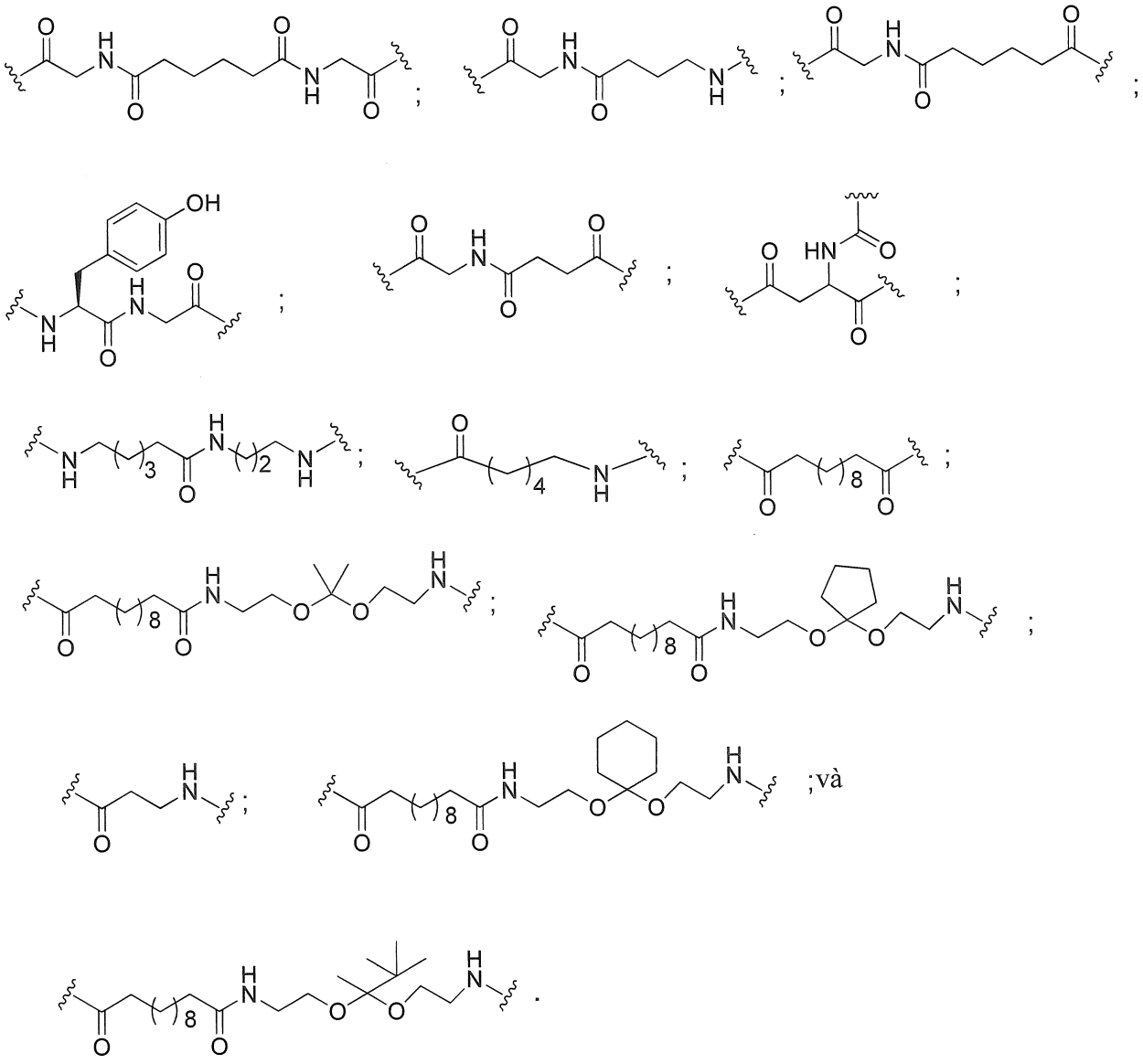

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;


;

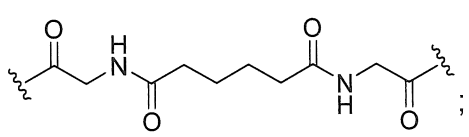
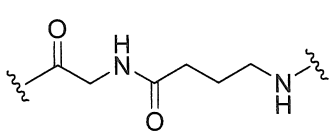
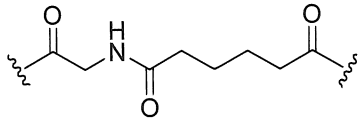

; và

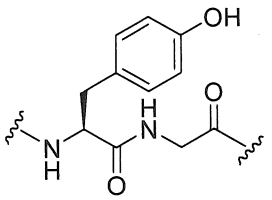
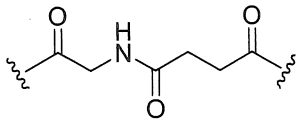
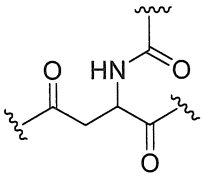

.

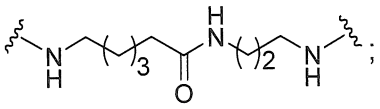
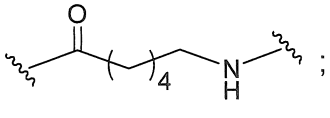
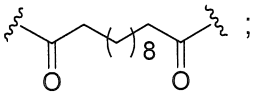
Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có cấu trúc được chọn trong số:

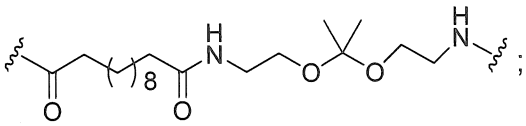
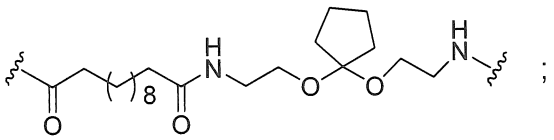


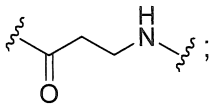
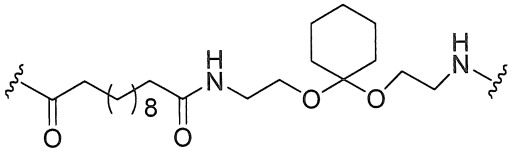
Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có cấu trúc được chọn trong số:

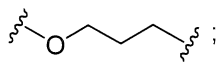
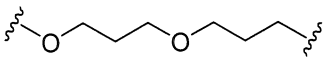
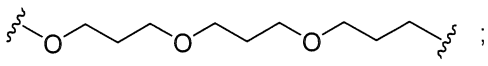

;

;

;

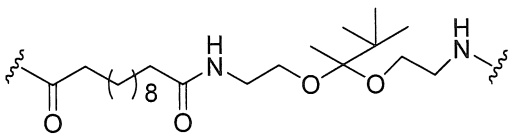
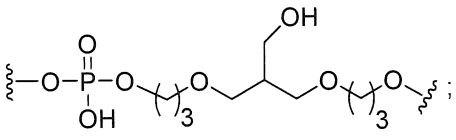

;

;

;

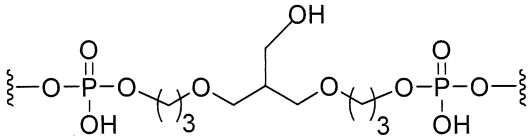
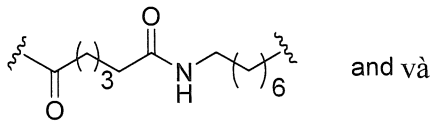

;

;

;

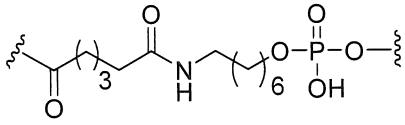

;

;


;


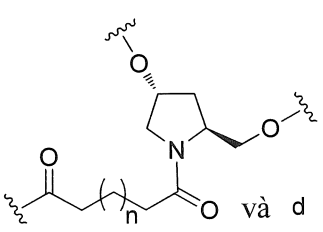
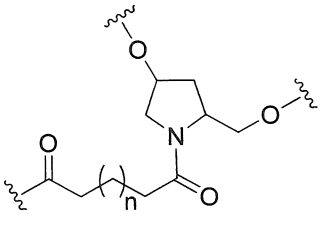

;

;

;


;

;


;

and và

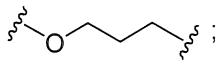
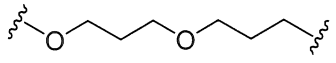
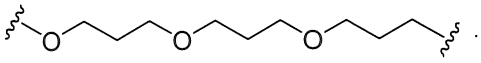

.

Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có cấu trúc được chọn trong số:

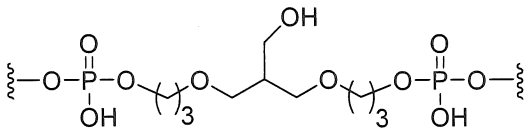
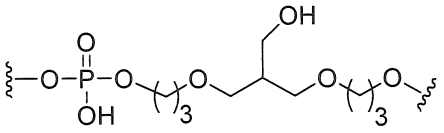
 và d 

trong đó n bằng từ 1 đến 20.

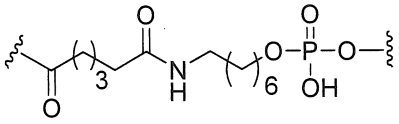
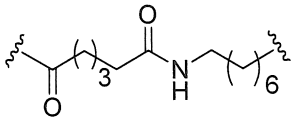
Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có cấu trúc được chọn trong số:

 ;  ; and 

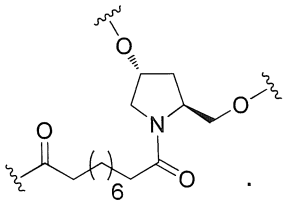
Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có cấu trúc được chọn trong số:

 và 

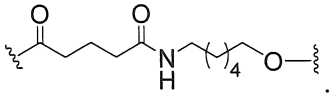
Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có cấu trúc được chọn trong số:

 và 

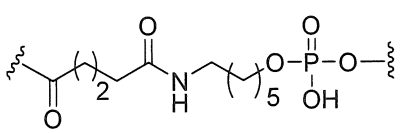
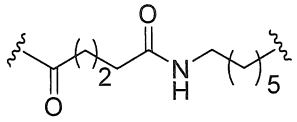
Theo các phương án nhất định, liên kết của thể tiếp hợp có cấu trúc:



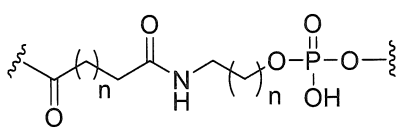
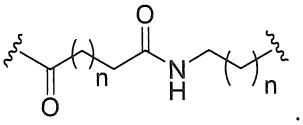
Theo các phương án nhất định, liên kết của thể tiếp hợp có cấu trúc:



Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có cấu trúc được chọn trong số:

 và and 

Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có cấu trúc được chọn trong số:

 và  ;

trong đó mỗi n độc lập bằng 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, hoặc 7.

iv. Các gốc hướng đích tế bào nhất định

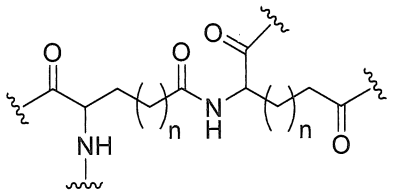
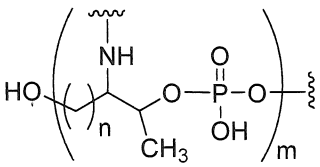
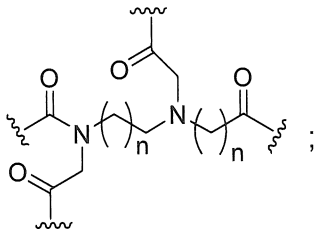
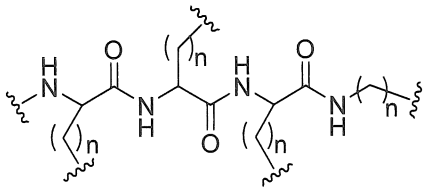
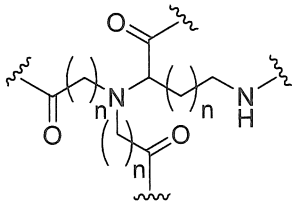
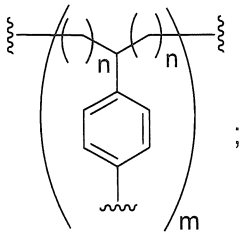
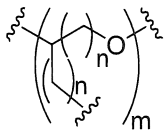
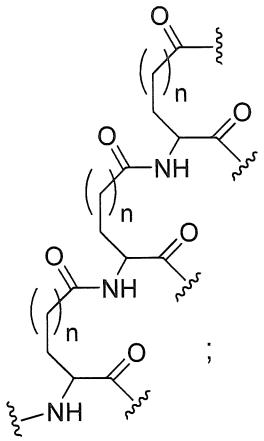
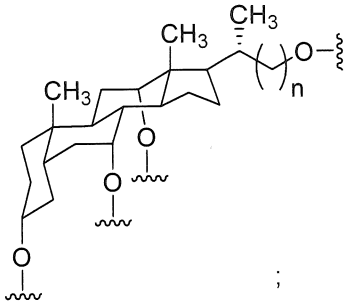
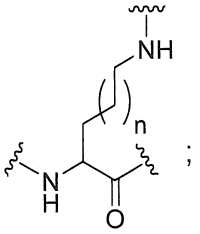
Theo các phương án nhất định, các nhóm tiếp hợp bao gồm các gốc hướng đích tế bào. Các gốc hướng đích tế bào nhất định này làm tăng sự thu hút tế bào của các hợp chất đối nghĩa. Theo các phương án nhất định, các gốc hướng đích tế bào bao gồm nhóm phân nhánh, một hoặc nhiều nhóm dắt, và một hoặc nhiều phối tử. Theo các phương án nhất định, các gốc hướng đích tế bào bao gồm nhóm phân nhánh, một hoặc nhiều nhóm dắt, một hoặc nhiều phối tử và một hoặc nhiều liên kết tách được.

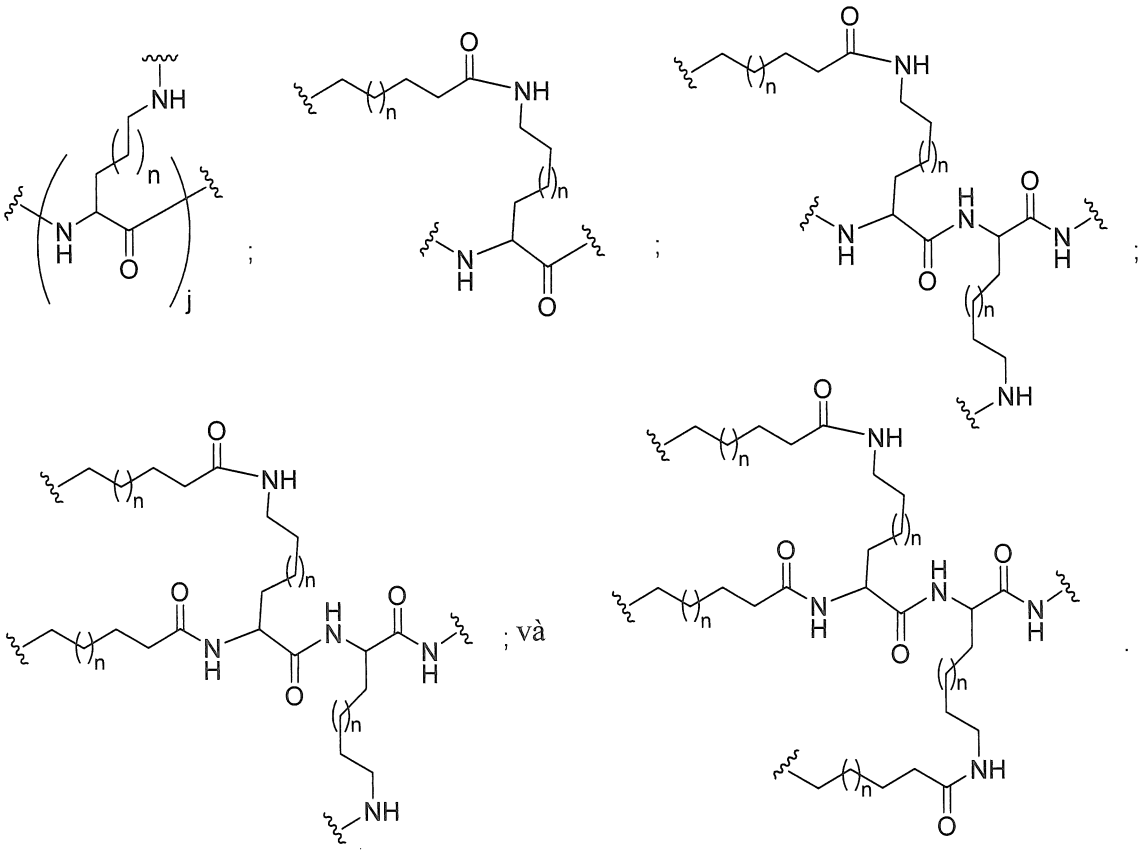
1. Các nhóm phân nhánh nhất định

Theo các phương án nhất định, các nhóm tiếp hợp bao gồm gốc hướng đích chứa nhóm phân nhánh và ít nhất hai phối tử được dắt. Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh gắn liên kết của thể tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh gắn gốc phân cắt được. Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh gắn oligonucleotit đối nghĩa. Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh được gắn cộng hóa trị vào nhóm liên kết và mỗi phối tử được dắt. Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh chứa nhóm béo phân nhánh chứa các nhóm được chọn từ các nhóm alkyl, amit, đisulfua, polyetylen glycol, ete, thioete và hyđroxylamino. Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh chứa các nhóm được chọn từ các nhóm alkyl, amit và ete. Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh chứa các nhóm được chọn từ các nhóm alkyl và ete. Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh chứa hệ nhân đơn vòng

hoặc đa vòng. Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh chứa một hoặc nhiều liên kết tách được. Theo các phương án nhất định, nhóm tiếp hợp không bao gồm nhóm phân nhánh.

Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh có cấu trúc được chọn trong số:


;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

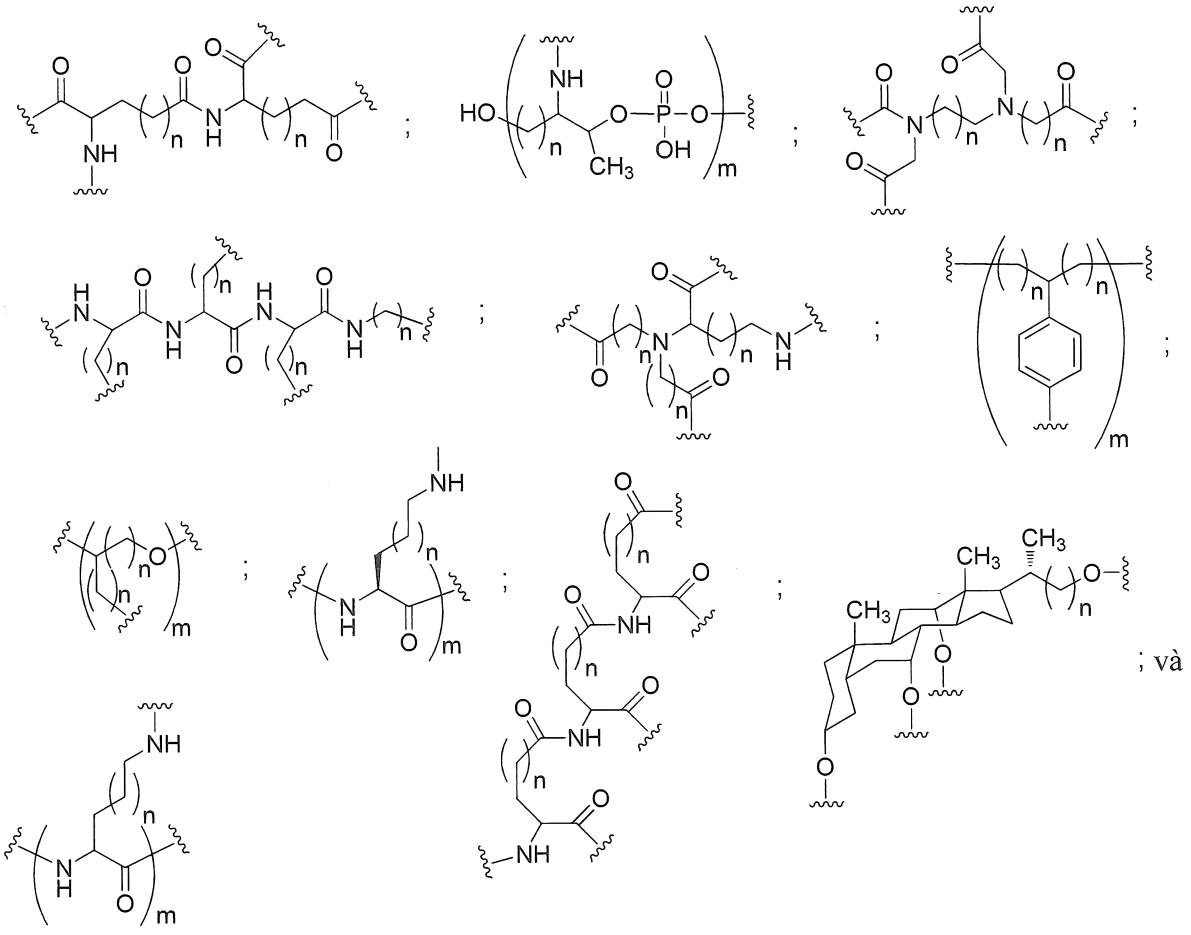


trong đó mỗi n độc lập bằng từ 1 đến 20;

j bằng từ 1 đến 3; và

m bằng từ 2 đến 6.

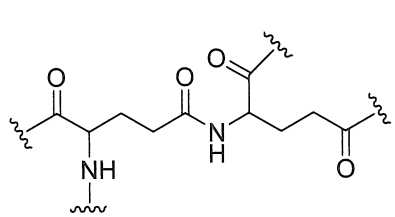
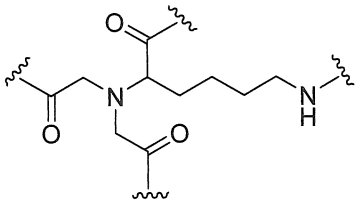
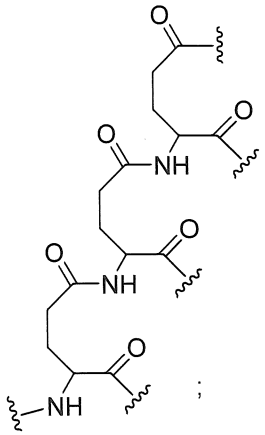
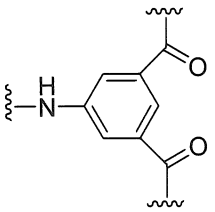
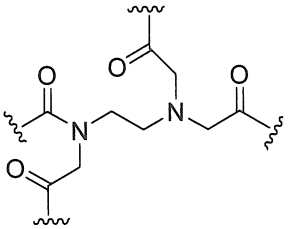
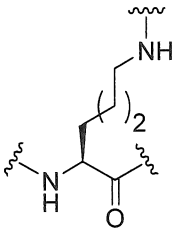
Theo các phương án nhất định, nhóm liên kết có cấu trúc được chọn trong số:

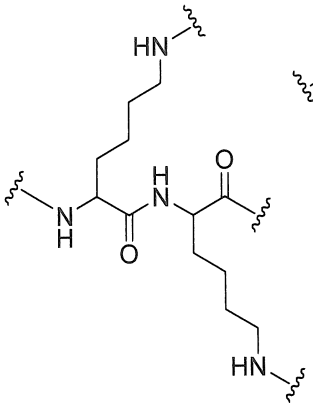
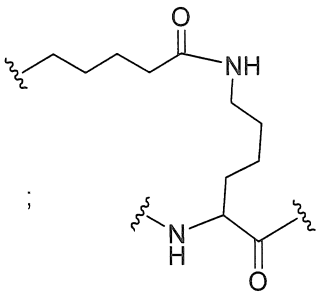
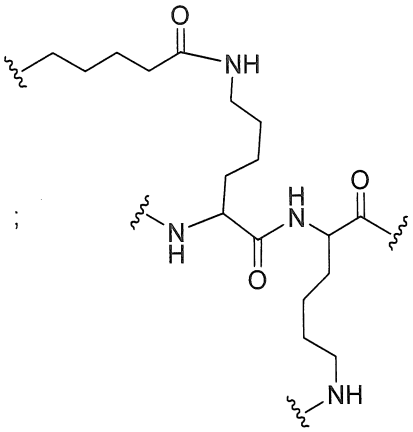
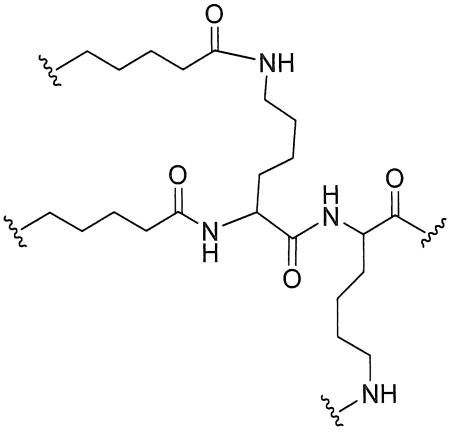
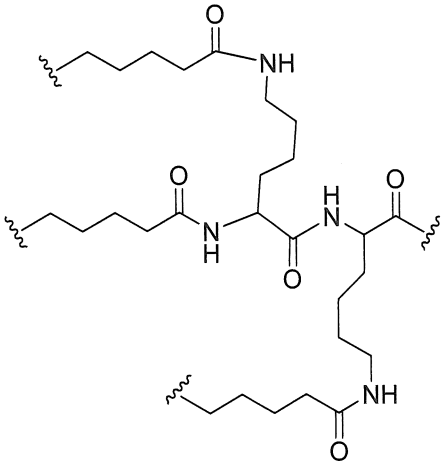


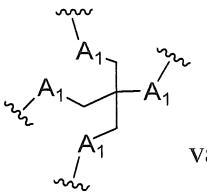
trong đó mỗi n độc lập bằng từ 1 đến 20; và

m bằng từ 2 đến 6.

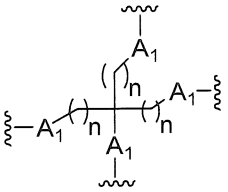
Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh có cấu trúc được chọn trong số:


;

;


;

;

;

;

;

;

;

; và

.



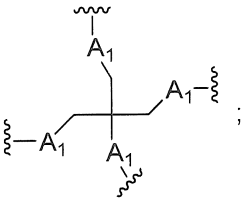
và



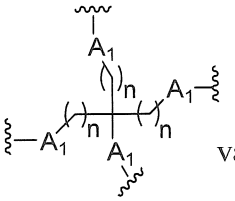
trong đó mỗi A_1 độc lập là O, S, C=O hoặc NH; và

mỗi n độc lập bằng từ 1 đến 20.

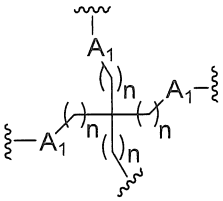
Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh có cấu trúc được chọn trong số:



;



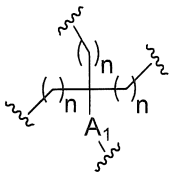
và d



trong đó mỗi A_1 độc lập là O, S, C=O hoặc NH; và

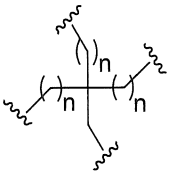
mỗi n độc lập bằng từ 1 đến 20.

Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh có cấu trúc được chọn trong số:



và

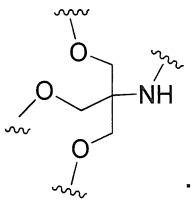
and



trong đó A_1 là O, S, C=O hoặc NH; và

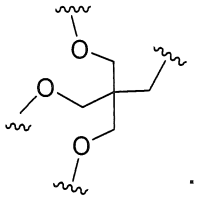
mỗi n độc lập bằng từ 1 đến 20.

Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh có cấu trúc được chọn trong số:

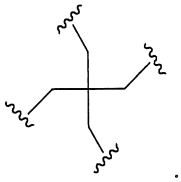


.

Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh có cấu trúc được chọn trong số:



Theo các phương án nhất định, nhóm phân nhánh có cấu trúc được chọn trong số:



2. Các nhóm dắt nhất định

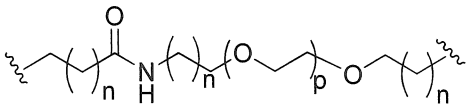
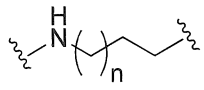
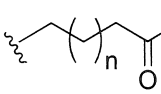
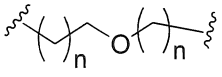
Theo các phương án nhất định, các nhóm tiếp hợp bao gồm một hoặc nhiều nhóm dắt đã được gắn cộng hóa trị vào nhóm phân nhánh. Theo các phương án nhất định, các nhóm tiếp hợp bao gồm một hoặc nhiều nhóm dắt đã được gắn cộng hóa trị vào liên kết nhóm. Theo các phương án nhất định, mỗi nhóm dắt là nhóm béo mạch thẳng chứa một hoặc nhiều nhóm được chọn từ các nhóm alkyl, ete, thioete, đisulfua, amit và polyetylen glycol theo cách kết hợp bất kỳ. Theo các phương án nhất định, mỗi nhóm dắt là nhóm béo mạch thẳng chứa một hoặc nhiều nhóm được chọn từ các nhóm alkyl, alkyl đã được thế, ete, thioete, đisulfua, amit, phosphođieste và polyetylen glycol theo cách kết hợp bất kỳ. Theo các phương án nhất định, mỗi nhóm dắt là nhóm béo mạch thẳng chứa một hoặc nhiều nhóm được chọn từ các nhóm alkyl, ete và amit theo cách kết hợp bất kỳ. Theo các phương án nhất định, mỗi nhóm dắt là nhóm béo mạch thẳng chứa một hoặc nhiều nhóm được chọn từ các nhóm alkyl, alkyl đã được thế, phosphođieste, ete và amit theo cách kết hợp bất kỳ. Theo các phương án nhất định, mỗi nhóm dắt là nhóm béo mạch thẳng chứa một hoặc nhiều nhóm được chọn từ alkyl và phosphođieste theo cách kết hợp bất kỳ. Theo các phương án nhất định, mỗi nhóm dắt chứa ít nhất một nhóm liên kết phospho hoặc nhóm liên kết trung tính.

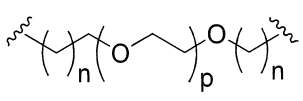
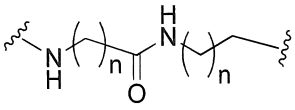
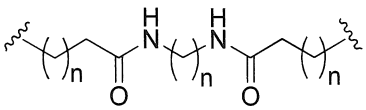
Theo các phương án nhất định, nhóm dắt bao gồm một hoặc nhiều liên kết tách được. Theo các phương án nhất định, nhóm dắt được gắn vào nhóm phân nhánh thông qua amit hoặc nhóm ete. Theo các phương án nhất định, nhóm dắt được gắn vào nhóm

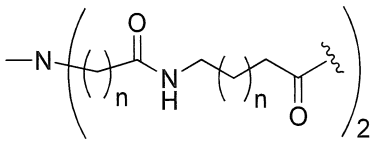
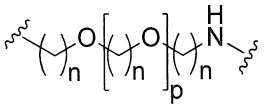
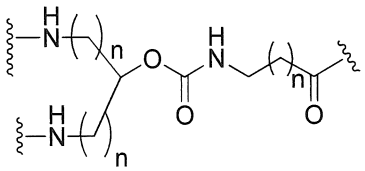
phân nhánh thông qua nhóm phosphođieste. Theo các phương án nhất định, nhóm dắt được gắn vào nhóm phân nhánh thông qua nhóm liên kết phospho hoặc nhóm liên kết trung tính. Theo các phương án nhất định, nhóm dắt được gắn vào nhóm phân nhánh thông qua nhóm ete. Theo các phương án nhất định, nhóm dắt được gắn vào phối tử thông qua amit hoặc nhóm ete. Theo các phương án nhất định, nhóm dắt được gắn vào phối tử thông qua nhóm ete. Theo các phương án nhất định, nhóm dắt được gắn vào phối tử thông qua amit hoặc nhóm ete. Theo các phương án nhất định, nhóm dắt được gắn vào phối tử thông qua nhóm ete.

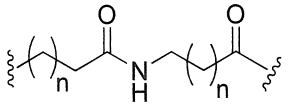
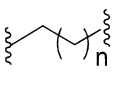
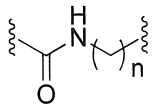
Theo các phương án nhất định, mỗi nhóm dắt chứa khoảng từ 8 đến 20 nguyên tử theo chiều dài mạch giữa phối tử và nhóm phân nhánh. Theo các phương án nhất định, mỗi nhóm dắt chứa từ khoảng 10 đến khoảng 18 nguyên tử theo chiều dài mạch giữa phối tử và nhóm phân nhánh. Theo các phương án nhất định, mỗi nhóm dắt chứa khoảng 13 nguyên tử theo chiều dài mạch.

Theo các phương án nhất định, nhóm dắt có cấu trúc được chọn trong số:


;

;

;

;


;

;

;

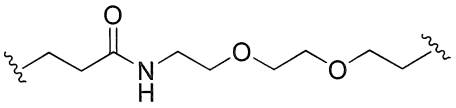
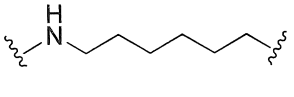
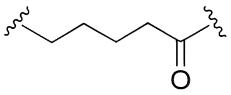

;

;

;

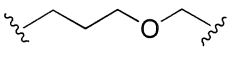
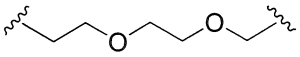
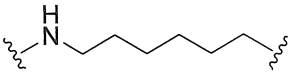
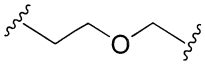

;

; và


trong đó mỗi n độc lập bằng từ 1 đến 20; và

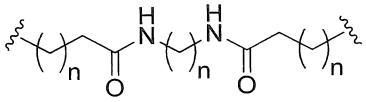
mỗi p bằng từ 1 đến 6.

Theo các phương án nhất định, nhóm dắt có cấu trúc được chọn trong số:

 ;  ;  ;

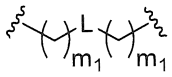
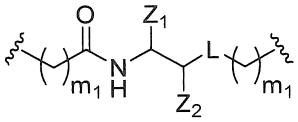
 ;  ;  ; và  .

Theo các phương án nhất định, nhóm dắt có cấu trúc được chọn trong số:



trong đó mỗi n độc lập bằng từ 1 đến 20.

Theo các phương án nhất định, nhóm dắt có cấu trúc được chọn trong số:

 và 

trong đó L là nhóm liên kết phospho hoặc nhóm liên kết trung tính;

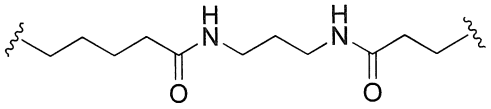
Z_1 là C(=O)O-R_2;

Z_2 là H, C_1-C_6 alkyl hoặc C_1-C_6 alky được thế;

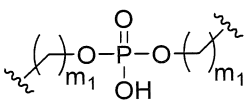
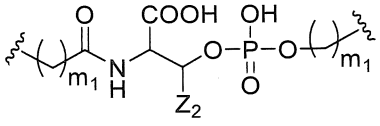
R_2 là H, C_1-C_6 alkyl hoặc C_1-C_6 alky được thế; và

mỗi m_1 độc lập bằng từ 0 đến 20 trong đó ít nhất một m_1 lớn hơn 0 cho mỗi nhóm dắt.

Theo các phương án nhất định, nhóm dắt có cấu trúc được chọn trong số:

 .

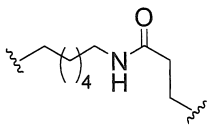
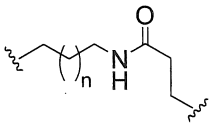
Theo các phương án nhất định, nhóm dắt có cấu trúc được chọn trong số:

 và 

trong đó Z_2 là H hoặc CH_3; và

mỗi m_1 độc lập bằng từ 0 đến 20 trong đó ít nhất một m_1 là lớn hơn 0 cho mỗi nhóm dắt.

Theo các phương án nhất định, nhóm dắt có cấu trúc được chọn trong số:

 , hoặc  ; trong đó mỗi n độc lập bằng 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, hoặc 7.

Theo các phương án nhất định, nhóm dắt chứa nhóm liên kết phospho. Theo các phương án nhất định, nhóm dắt không bao gồm các liên kết amit bất kỳ. Theo các phương án nhất định, nhóm dắt chứa nhóm liên kết phospho và không bao gồm các liên kết amit bất kỳ.

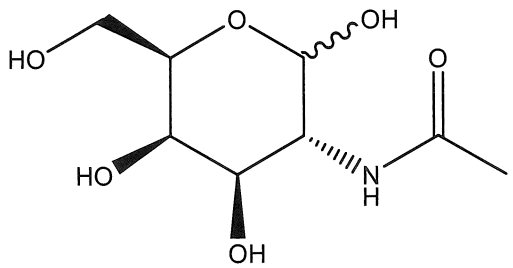
3. Các phối tử nhất định

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các phối tử trong đó mỗi phối tử được gắn cộng hóa trị vào nhóm dắt Theo các phương án nhất định, mỗi phối tử được chọn để có ái lực đối với ít nhất một loại thụ thể trên tế bào đích. Theo các phương án nhất định, các phối tử được chọn mà có ái lực đối với ít nhất một loại thụ thể trên bề mặt của tế bào gan của động vật có vú. Theo các phương án nhất định, các phối tử được chọn mà có ái lực đối với thụ thể gan asialoglycoprotein (ASGP-R). Theo các phương án nhất định, mỗi phối tử là hyđrat cacbon. Theo các phương án nhất định, mỗi phối tử, độc lập được chọn từ galactoza, N-axetyl galactozaamin, manoza, glucoza, glucosamon và fucoza. Theo các phương án nhất định, mỗi phối tử là N-axetyl galactozaamin (GalNAc). Theo các phương án nhất định, gốc hướng đích chứa 2 đến 6 phối tử. Theo các phương án nhất định, gốc hướng đích chứa 3 phối tử. Theo các phương án nhất định, gốc hướng đích chứa các phối tử 3 N-axetyl galactozaamin.

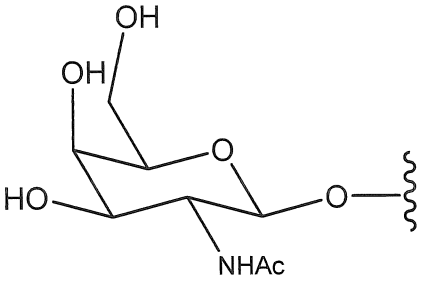
Theo các phương án nhất định, phối tử là hyđrat cacbon, dẫn xuất của hyđrat cacbon, hyđrat cacbon cải biến, cụm hyđrat cacbon đa trị, polysacarit, polysacarit cải biến, hoặc dẫn xuất polysacarit. Theo các phương án nhất định, phối tử là đường amino hoặc đường thio. Ví dụ, các đường amino có thể được chọn từ số lượng bất kỳ hợp chất đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, glucosamin, axit sialic, α-D-galactosamin, N-Axetylgalactosamin, 2-axetamiđo-2-đeoxy-D-galactopyranoza (GalNAc), 2-amino-3-*O*-

[(R)-1-carboxyetyl]-2-đeoxy-β-D-glucopyranoza (axit β-muramic), 2-đeoxy-2-metylamino-L-glucopyranoza, 4,6-điđeoxy-4-formamiđo-2,3-đi-*O*-metyl-D-mannopyranoza, 2-đeoxy-2-sulfoamino-D-glucopyranoza và *N*-sulfo-D-glucosamin, và axit *N*-Glycoloyl-α-neuraminic. Ví dụ, các đường thio có thể được chọn từ nhóm bao gồm 5-thio-β-D-glucopyranoza, metyl 2,3,4-tri-*O*-axetyl-1-thio-6-*O*-trityl-α-D-glucopyranosit, 4-thio-β-D-galactopyranoza, và etyl 3,4,6,7-tetra-*O*-axetyl-2-đeoxy-1,5-đithio-α-D-*gluco*-heptopyranosit.

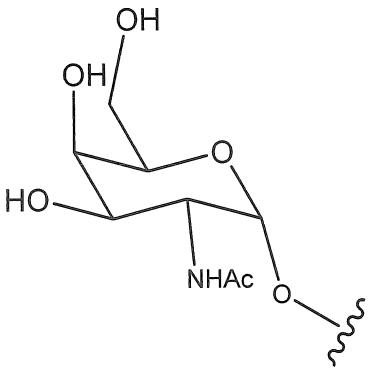
Theo các phương án nhất định, "GalNac" hoặc "Gal-NAc" để chỉ 2-(axetylamino)-2-đeoxy-D-galactopyranoza, thường được gọi trong tài liệu chuyên ngành là N-axetyl galactosamin. Theo các phương án nhất định, "N-axetyl galactosamin" để chỉ 2-(axetylamino)-2-đeoxy-D-galactopyranoza. Theo các phương án nhất định, "GalNac" hoặc "Gal-NAc" để chỉ 2-(axetylamino)-2-đeoxy-D-galactopyranoza. Theo các phương án nhất định, "GalNac" hoặc "Gal-NAc" để chỉ 2-(axetylamino)-2-đeoxy-D-galactopyranoza, mà bao gồm cả dạng β: 2-(axetylamino)-2-đeoxy-β-D-galactopyranoza và dạng α: 2-(axetylamino)-2-đeoxy-D-galactopyranoza. Theo các phương án nhất định, cả dạng β: 2-(axetylamino)-2-đeoxy-β-D-galactopyranoza và dạng α: 2-(axetylamino)-2-đeoxy-D-galactopyranoza có thể được sử dụng thay thế nhau. Do đó, trong các cấu trúc trong đó một dạng được minh họa, các cấu trúc này được dự định để bao gồm cả dạng khác. Ví dụ, khi cấu trúc đối với dạng α: 2-(axetylamino)-2-đeoxy-D-galactopyranoza được thể hiện, cấu trúc này nhằm bao gồm cả dạng khác. Theo các phương án nhất định, Theo các phương án được ưu tiên nhất định, 2-(axetylamino)-2-đeoxy-D-galactopyranoza dạng β là phương án được ưu tiên.



2-(axetylamino)-2-đeoxy-D-galactopyranoza

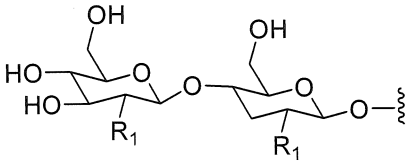


2-(axetylamino)-2-đeoxy-β-D-galactopyranoza

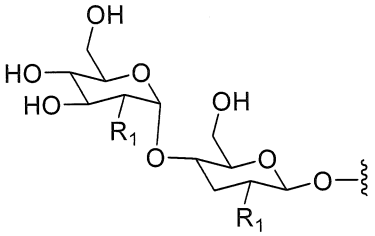


2-(Axetylamino)-2-đeoxy-α-D-galactopyranoza

Theo các phương án nhất định một hoặc nhiều phối tử có cấu trúc được chọn trong số:

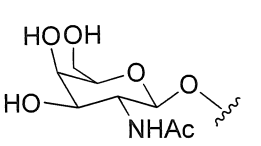
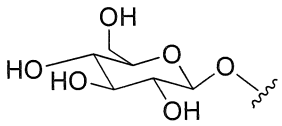
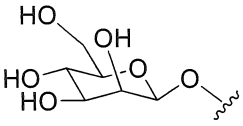
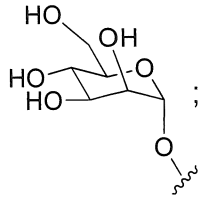
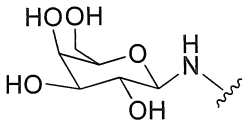
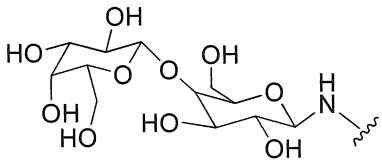
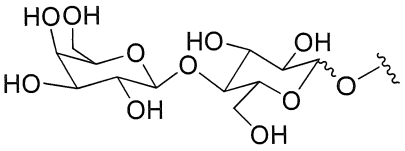
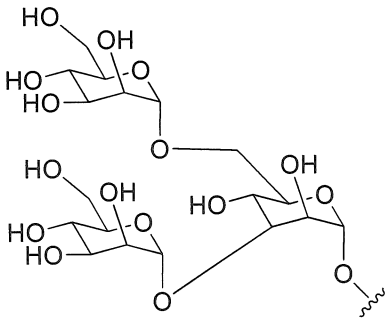


và

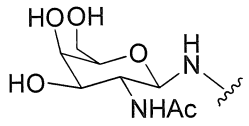


trong đó mỗi nhóm R_1 được chọn từ OH và NHCOOH.

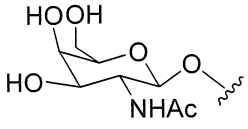
Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều phối tử có cấu trúc được chọn trong số:


;

;

;

;

;

;

và ; and

.

Theo các phương án nhất định một hoặc nhiều phối tử có cấu trúc được chọn trong số:

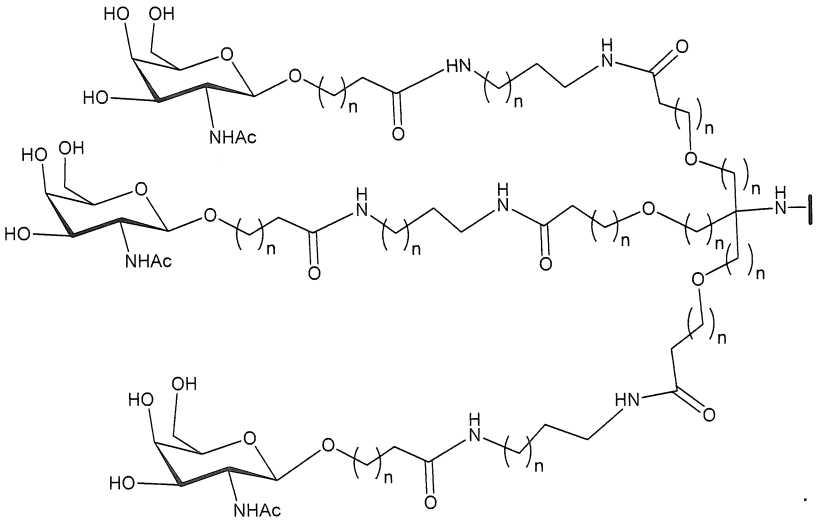

.

Theo các phương án nhất định một hoặc nhiều phối tử có cấu trúc được chọn trong số:


.

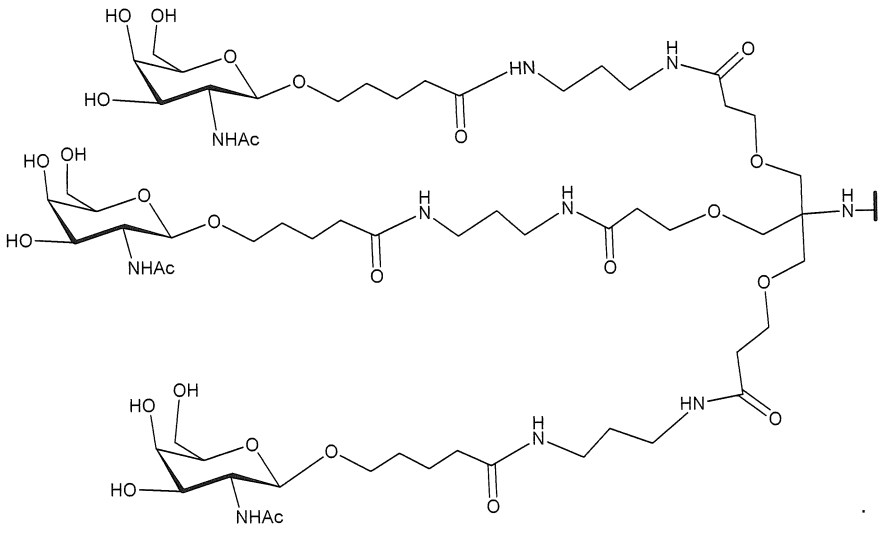
i. <u>Các thể tiếp hợp nhất định</u>

Theo các phương án nhất định, các nhóm tiếp hợp có các dấu hiệu cấu trúc nêu trên. Theo một số phương án nhất định, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:

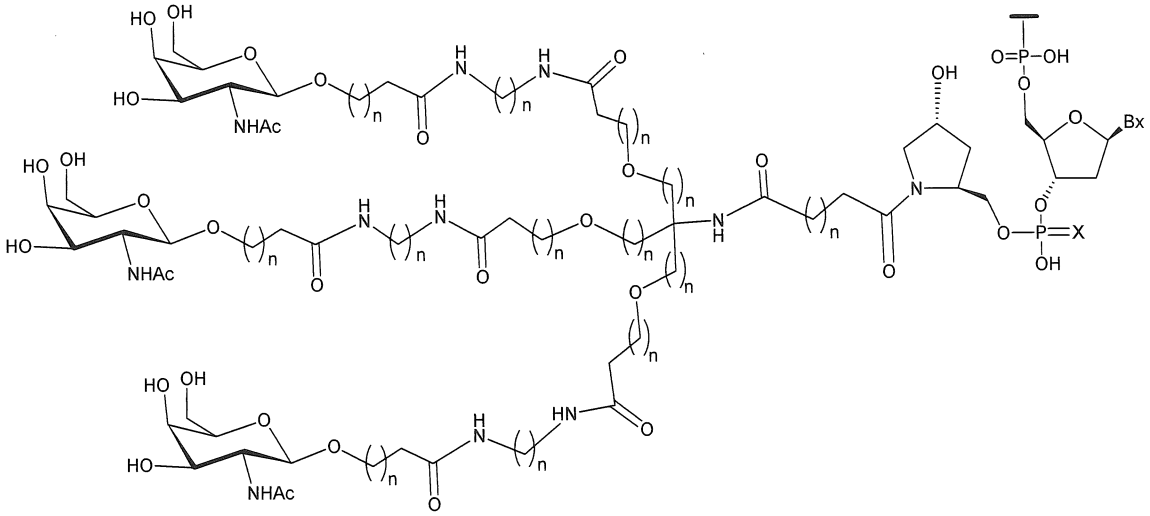


trong đó mỗi n độc lập bằng từ 1 đến 20.

Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



trong đó mỗi n độc lập bằng từ 1 đến 20;

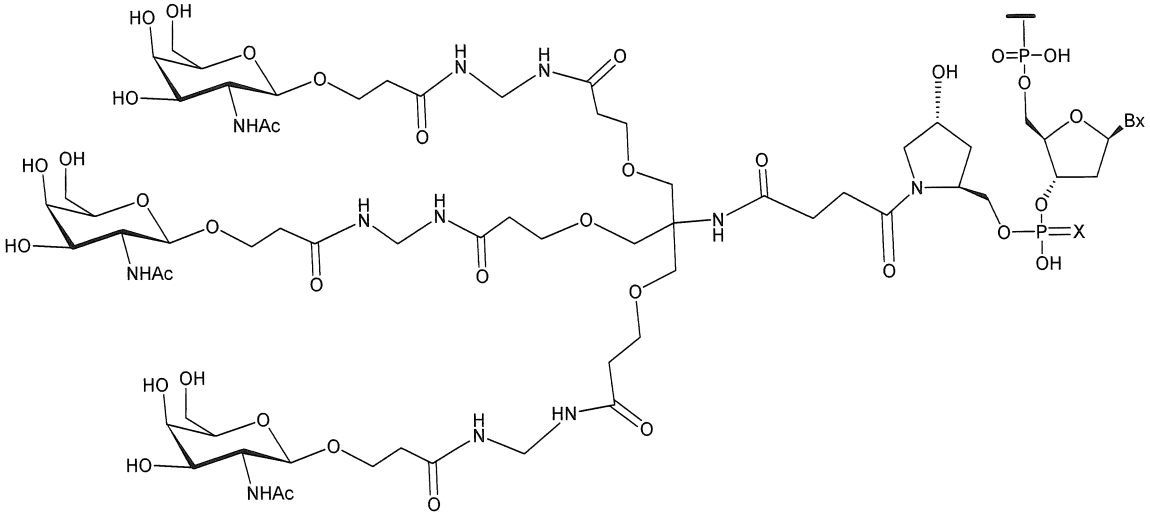
Z là H hoặc nền rắn được liên kết;

Q là hợp chất đối nghĩa;

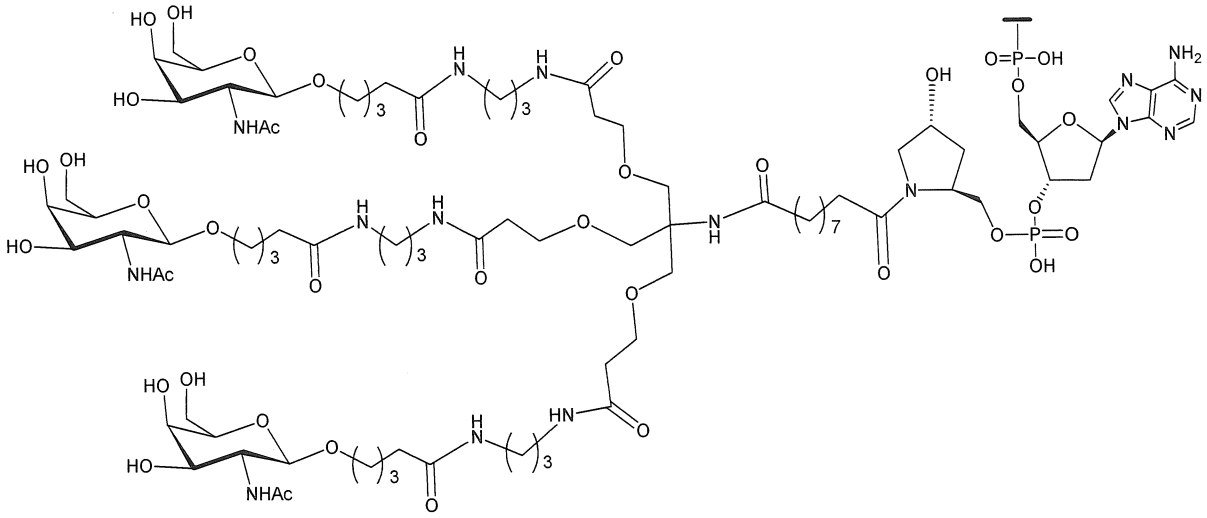
X là O hoặc S; và

Bx là gốc bazơ dị vòng.

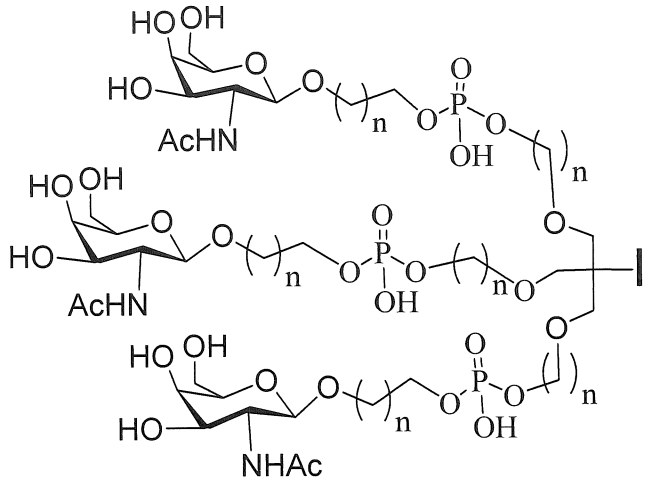
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



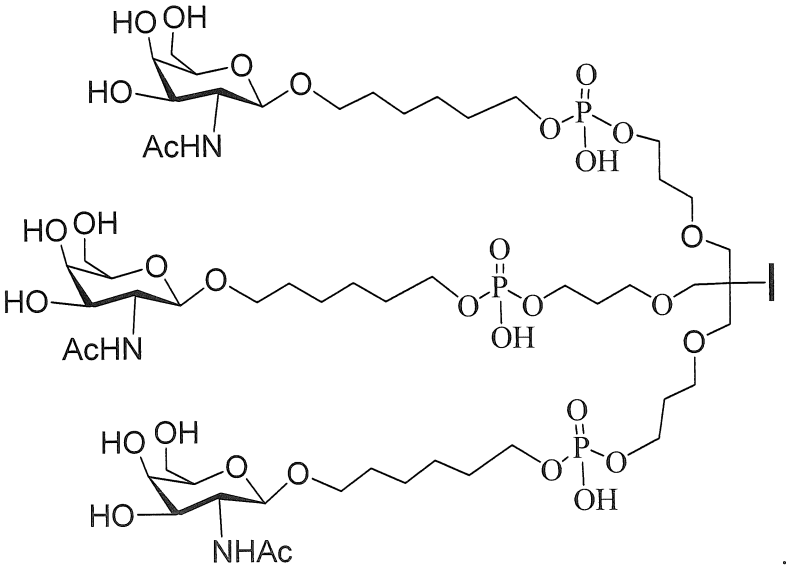
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



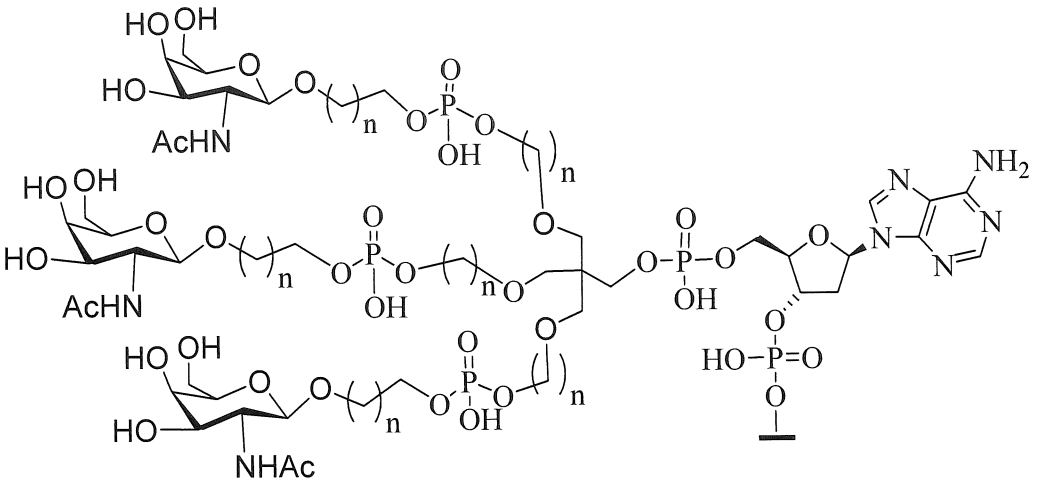
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



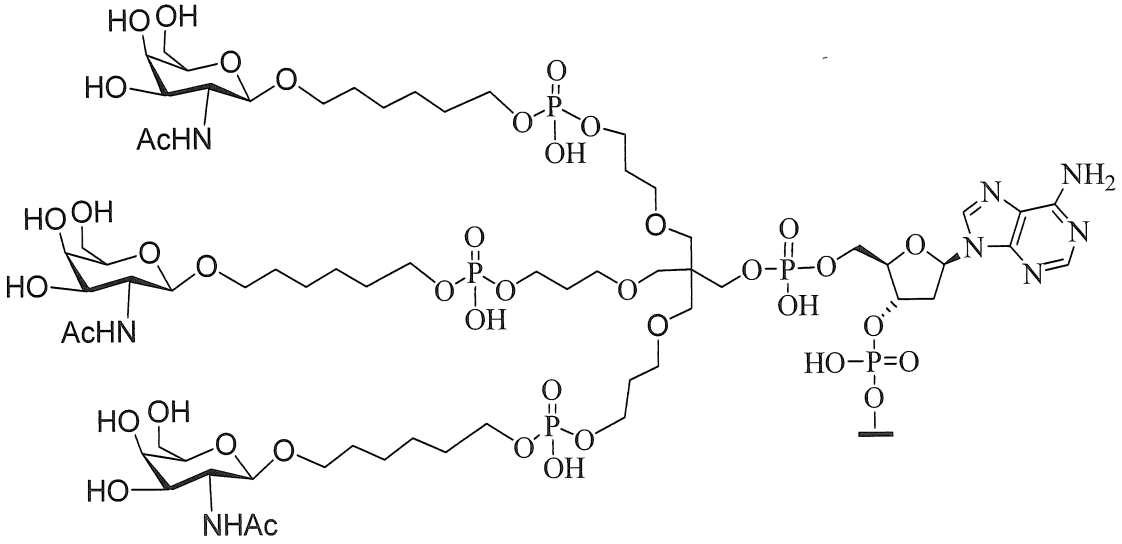
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



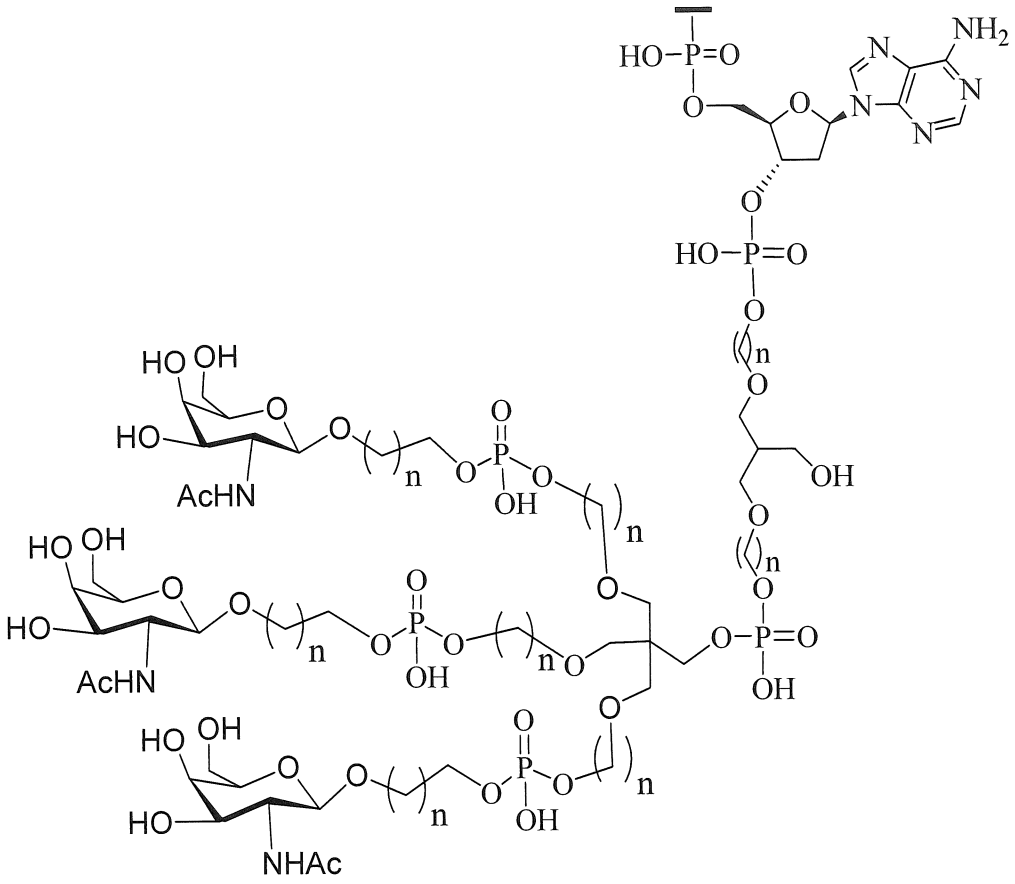
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



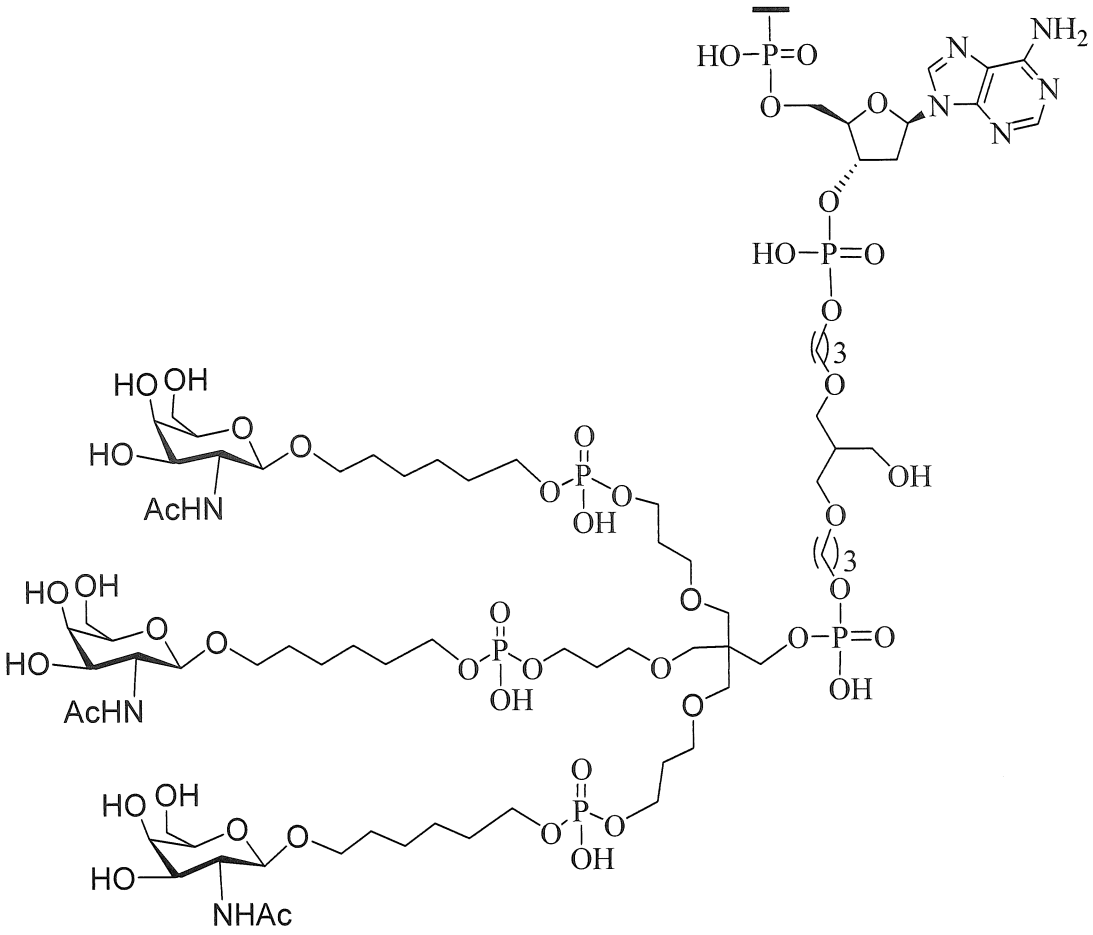
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:

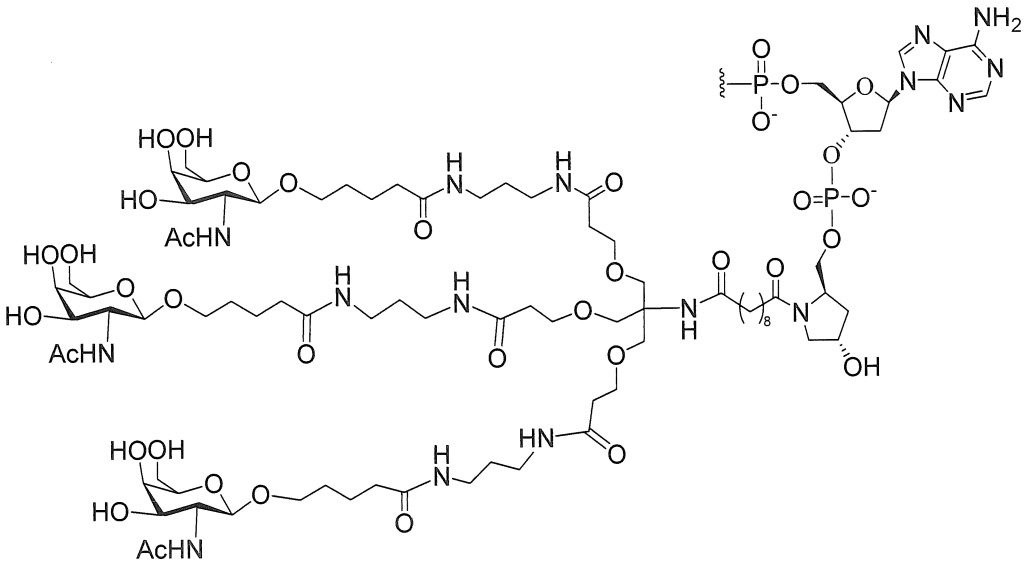


Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:

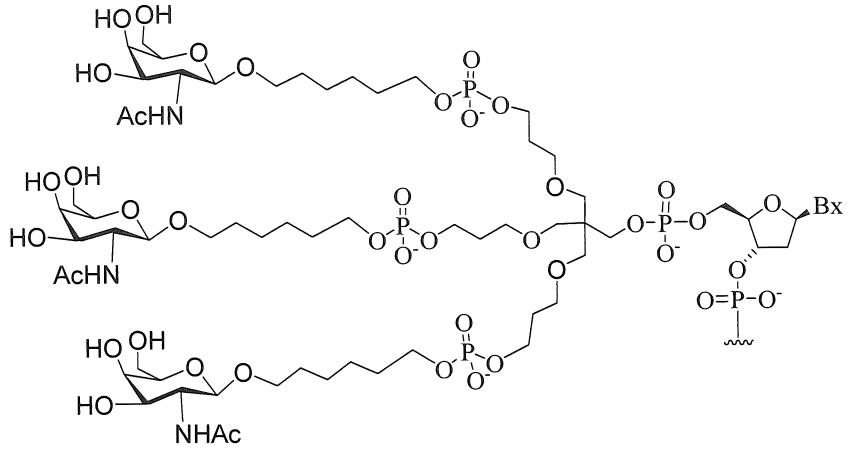


Theo các phương án nhất định, các thể tiếp hợp không bao gồm pyroliđin.

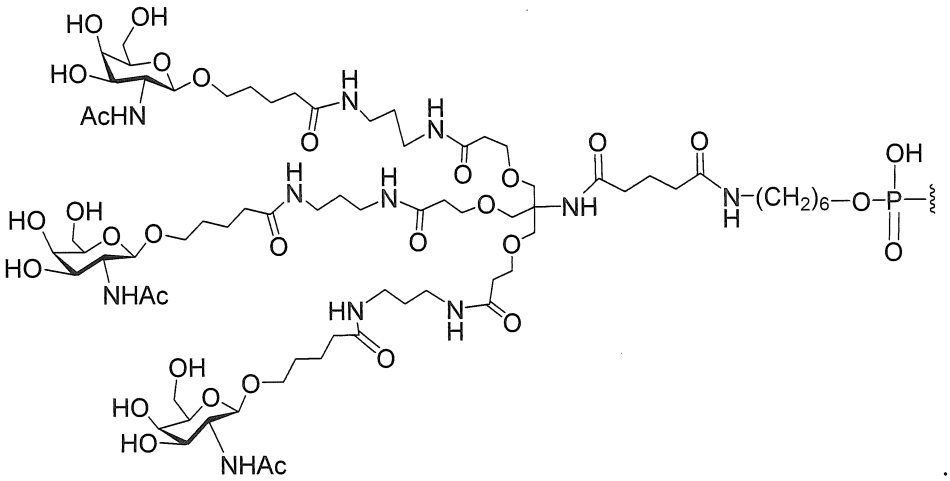
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



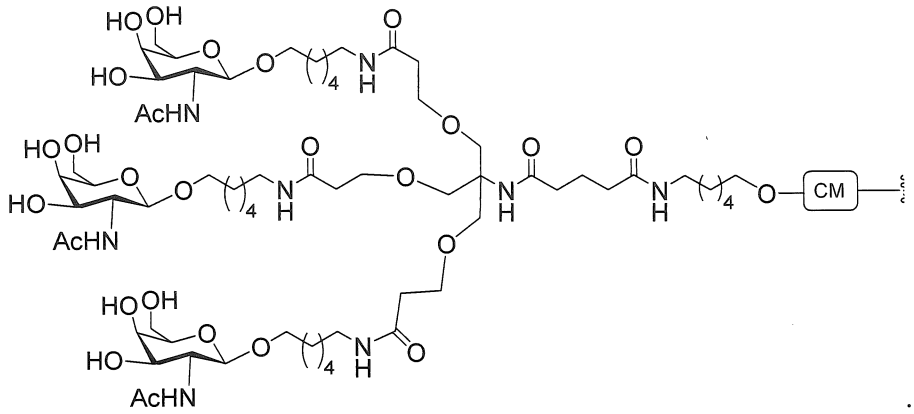
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



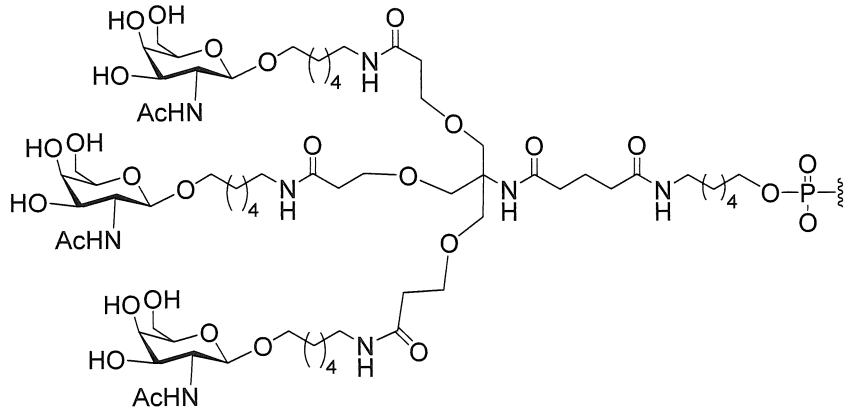
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



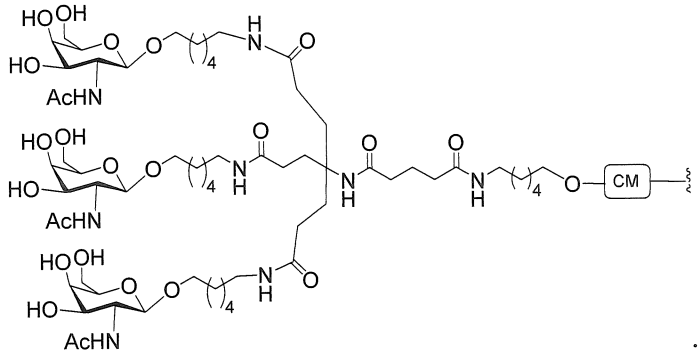
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



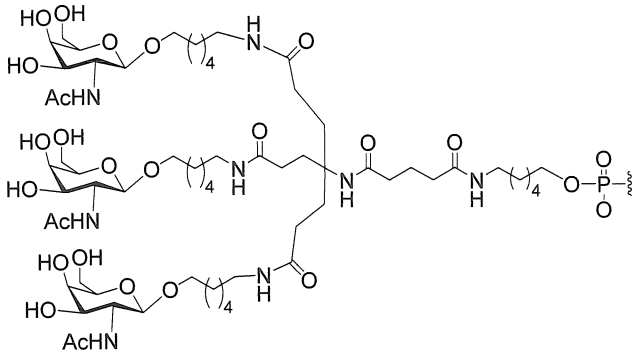
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



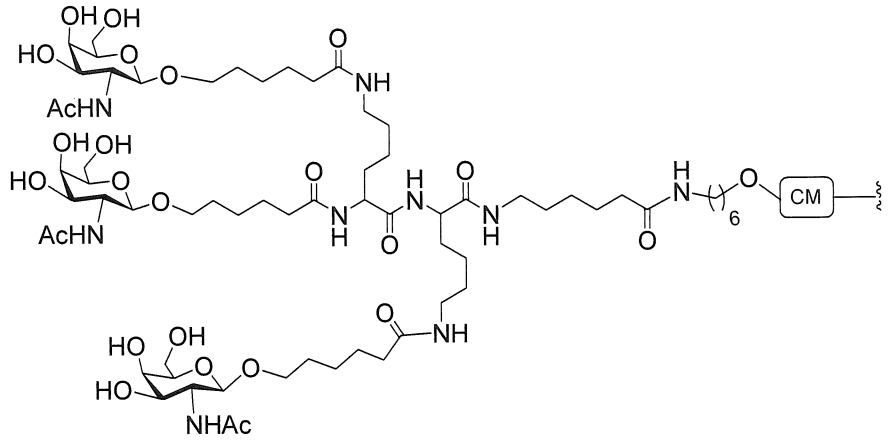
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



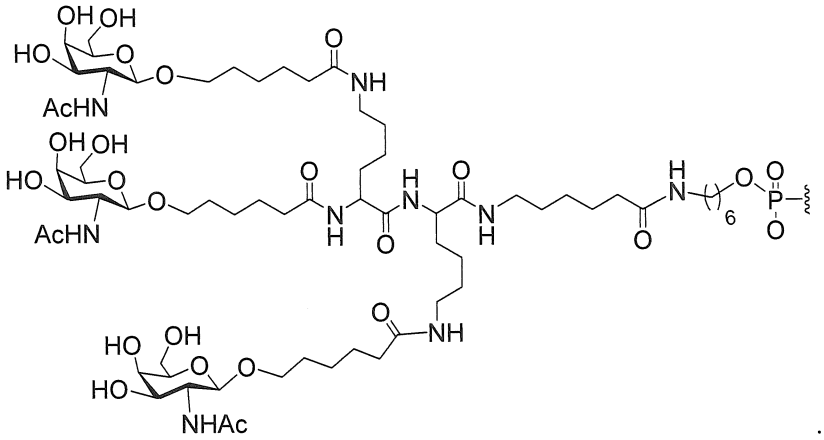
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



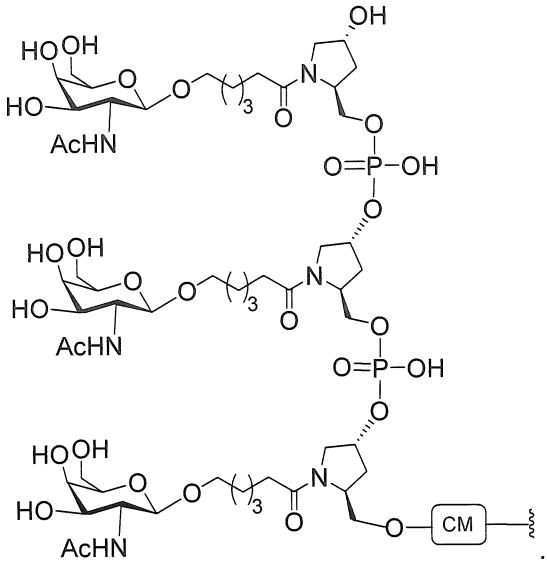
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



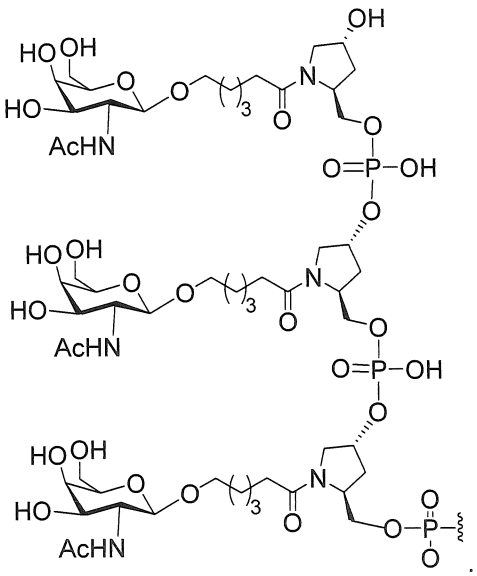
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



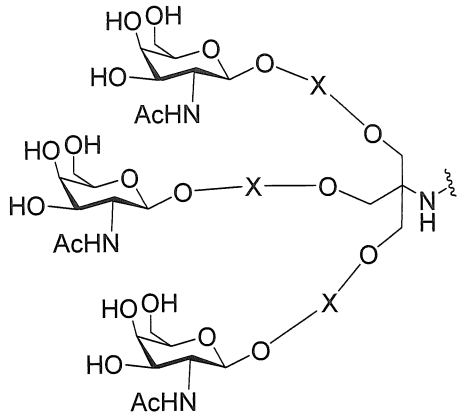
Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



Theo một số phương án nhất định này, các nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:

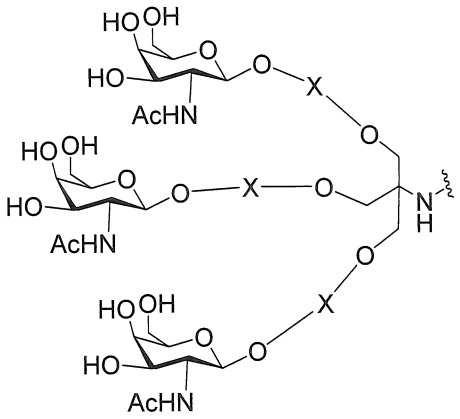


Theo các phương án nhất định, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



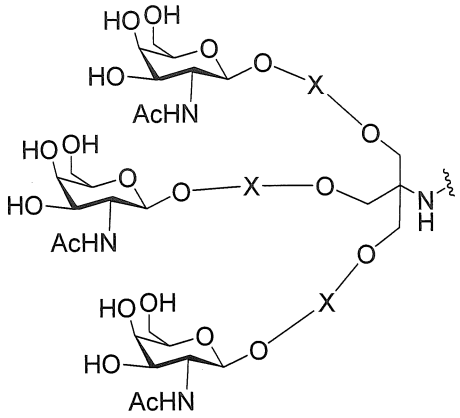
trong đó X là nhóm dắt được thế hoặc không được thế gồm sáu đến mười một nguyên tử liên kết liên tục.

Theo các phương án nhất định, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



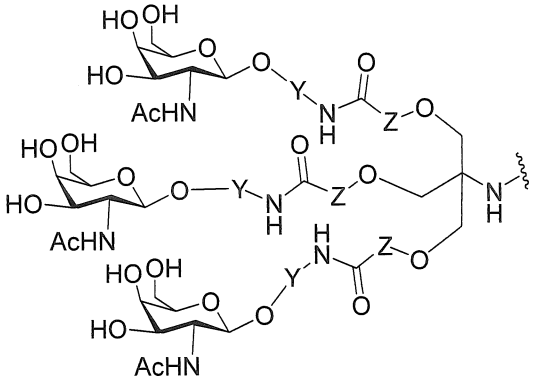
trong đó X là nhóm dắt được thế hoặc không được thế gồm mười nguyên tử liên kết liên tục.

Theo các phương án nhất định, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



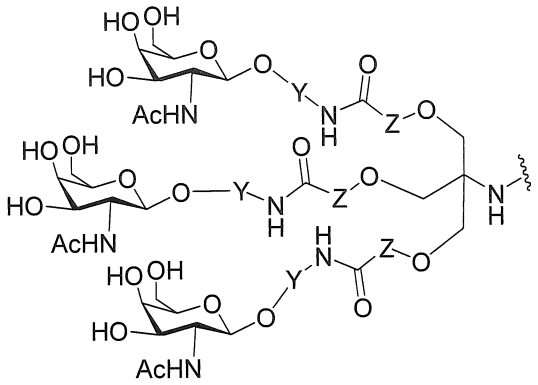
trong đó X là nhóm dắt được thế hoặc không được thế gồm bốn đến mười một nguyên tử liên kết liên tục và trong đó nhóm dắt chứa đúng một liên kết amit.

Theo các phương án nhất định, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



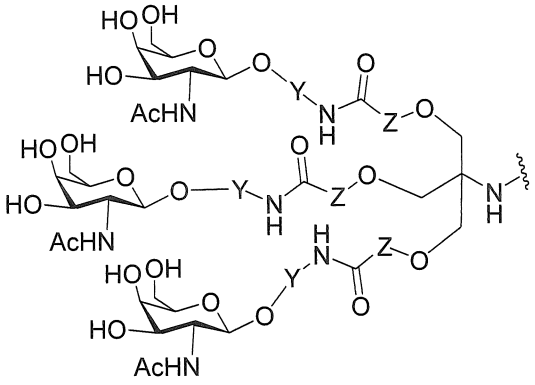
trong đó Y và Z độc lập được chọn từ C_1-C_{12} alkyl được thế hoặc không được thế, nhóm alkenyl, hoặc alkynyl, hoặc nhóm chứa ete, keton, amit, este, carbamat, amin, piperiđin, phosphat, phosphođieste, phosphorothioat, triazol, pyroliđin, đisulfua, hoặc thioete.

Theo một số phương án nhất định này, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



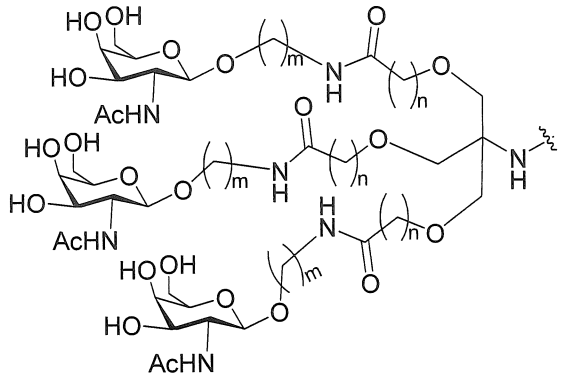
trong đó Y và Z độc lập được chọn từ nhóm C_1-C_{12} alkyl được thế hoặc không được thế, hoặc nhóm chứa đúng một ete hoặc chính xác hai ete, amit, amin, piperiđin, phosphat, phosphođieste, hoặc phosphorothioat.

Theo một số phương án nhất định này, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



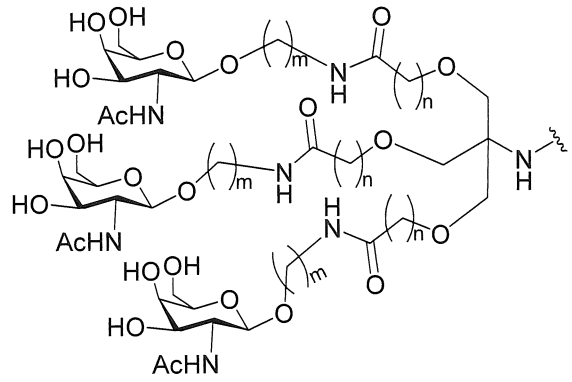
trong đó Y và Z độc lập được chọn từ nhóm C_1-C_{12} alkyl được thế hoặc không được thế.

Theo một số phương án nhất định này, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



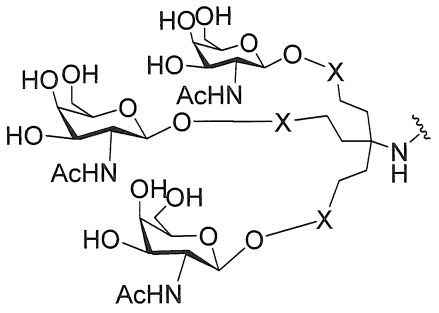
trong đó m và n độc lập được chọn từ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, và 12.

Theo một số phương án nhất định này, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



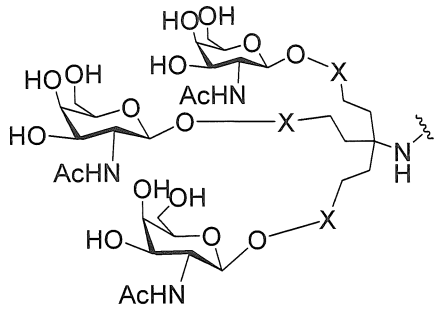
trong đó m bằng 4, 5, 6, 7, hoặc 8, và n bằng 1, 2, 3, hoặc 4.

Theo các phương án nhất định, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



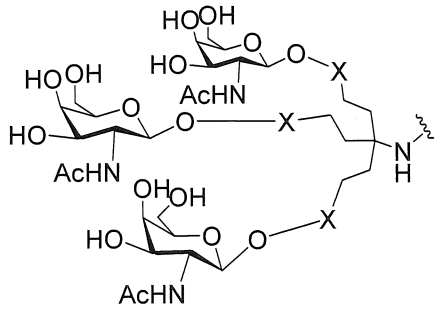
trong đó X là nhóm dắt được thế hoặc không được thế gồm bốn đến mười ba nguyên tử liên kết liên tục, và trong đó X không bao gồm nhóm ete.

Theo các phương án nhất định, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



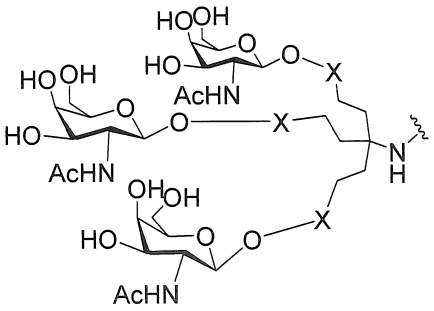
trong đó X là nhóm dắt được thế hoặc không được thế gồm tám nguyên tử liên kết liên tục, và trong đó X không bao gồm nhóm ete.

Theo các phương án nhất định, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



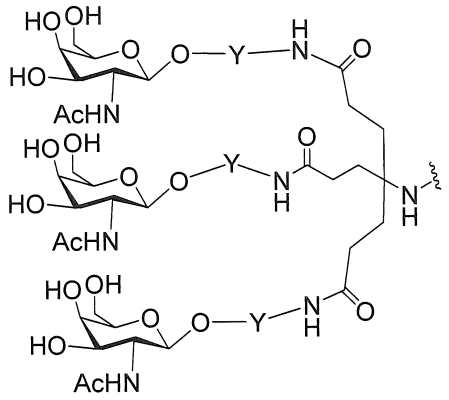
trong đó X là nhóm dắt được thế hoặc không được thế của bốn đến mười ba nguyên tử liên kết liên tục, và trong đó nhóm dắt chứa đúng một liên kết amit, và trong đó X không bao gồm nhóm ete.

Theo các phương án nhất định, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



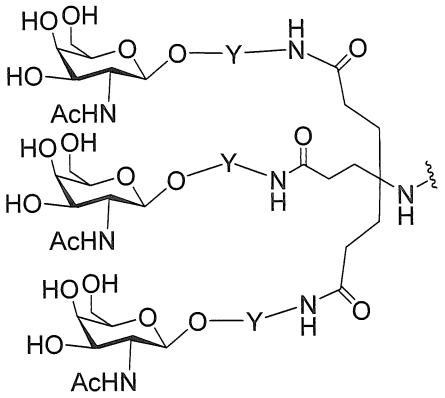
trong đó X là nhóm dắt được thế hoặc không được thế gồm bốn đến mười ba nguyên tử liên kết liên tục và trong đó nhóm dắt bao gồm liên kết amit và nhóm C_2-C_{11} alkyl được thế hoặc không được thế.

Theo các phương án nhất định, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



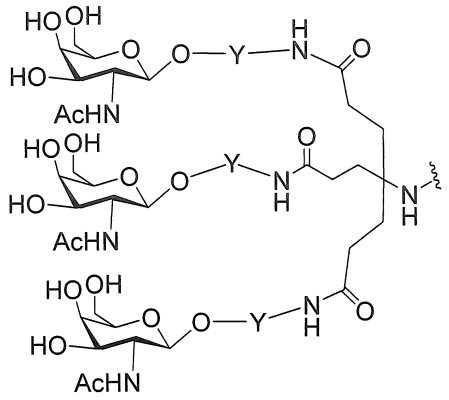
trong đó Y được chọn từ C_1-C_{12} alkyl được thế hoặc không được thế, alkenyl, hoặc nhóm alkynyl, hoặc nhóm chứa ete, keton, amit, este, carbamat, amin, piperiđin, phosphat, phosphođieste, phosphorothioat, triazol, pyroliđin, đisulfua, hoặc thioete.

Theo một số phương án nhất định này, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



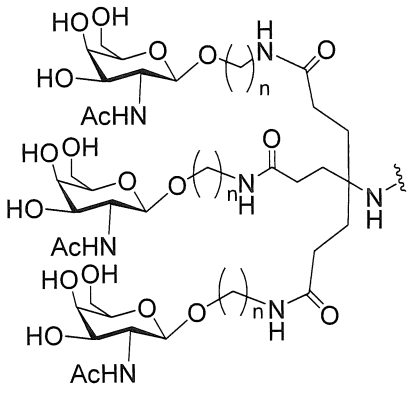
trong đó Y được chọn từ nhóm C_1-C_{12} alkyl được thế hoặc không được thế, hoặc nhóm chứa ete, amin, piperiđin, phosphat, phosphođieste, hoặc phosphorothioat.

Theo một số phương án nhất định này, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



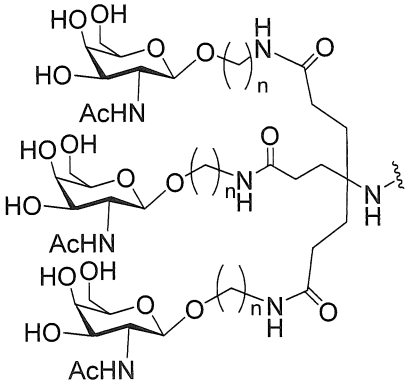
trong đó Y được chọn từ nhóm C_1-C_{12} alkyl được thế hoặc không được thế.

Theo một số phương án nhất định này, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



trong đó n bằng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, hoặc 12.

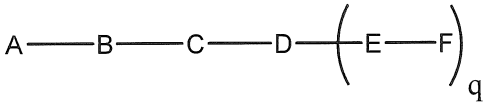
Theo một số phương án nhất định này, gốc hướng đích đến tế bào của nhóm tiếp hợp có cấu trúc sau:



trong đó n bằng 4, 5, 6, 7, hoặc 8.

b. Các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp nhất định

Theo các phương án nhất định, các thể tiếp hợp này được liên kết với nucleosit của oligonucleotit đối nghĩa ở vị trí 2', 3', của 5' của nucleosit. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp có cấu trúc sau:



trong đó

A là oligonucleotit đối nghĩa;

B là gốc phân cắt được

C là liên kết của thể tiếp hợp

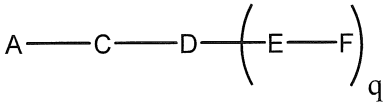
D là nhóm phân nhánh

mỗi E là nhóm dắt;

mỗi F là phối tử; và

q là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 5.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp có cấu trúc sau:



trong đó

A là oligonucleotit đối nghĩa;

C là liên kết của thể tiếp hợp

D là nhóm phân nhánh

mỗi E là nhóm dắt;

mỗi F là phối tử; và

q là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 5.

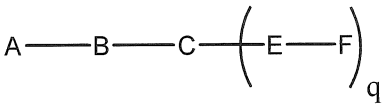
Theo một số phương án nhất định này, liên kết của thể tiếp hợp chứa ít nhất một liên kết tách được.

Theo một số phương án nhất định này, nhóm phân nhánh chứa ít nhất một liên kết tách được.

Theo các phương án nhất định mỗi nhóm dắt chứa ít nhất một liên kết tách được.

Theo các phương án nhất định, các thể tiếp hợp này liên kết với nucleosit của oligonucleotit đối nghĩa ở vị trí 2', 3', của 5' của nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp có cấu trúc sau:



trong đó

A là oligonucleotit đối nghĩa;

B là gốc phân cắt được

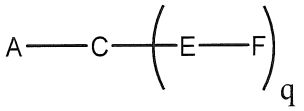
C là liên kết của thể tiếp hợp

mỗi E là nhóm dắt;

mỗi F là phối tử; và

q là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 5.

Theo các phương án nhất định, các thể tiếp hợp này liên kết với nucleosit của oligonucleotit đối nghĩa ở vị trí 2', 3', của 5' của nucleosit. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp có cấu trúc sau:



trong đó

A là oligonucleotit đối nghĩa;

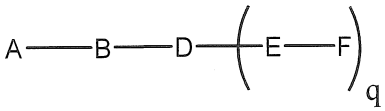
C là liên kết của thể tiếp hợp

mỗi E là nhóm dắt;

mỗi F là phối tử; và

q là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 5.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp có cấu trúc sau:



trong đó

A là oligonucleotit đối nghĩa;

B là gốc phân cắt được

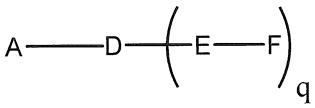
D là nhóm phân nhánh

mỗi E là nhóm dắt;

mỗi F là phối tử; và

q là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 5.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp có cấu trúc sau:



trong đó

A là oligonucleotit đối nghĩa;

D là nhóm phân nhánh

mỗi E là nhóm dắt;

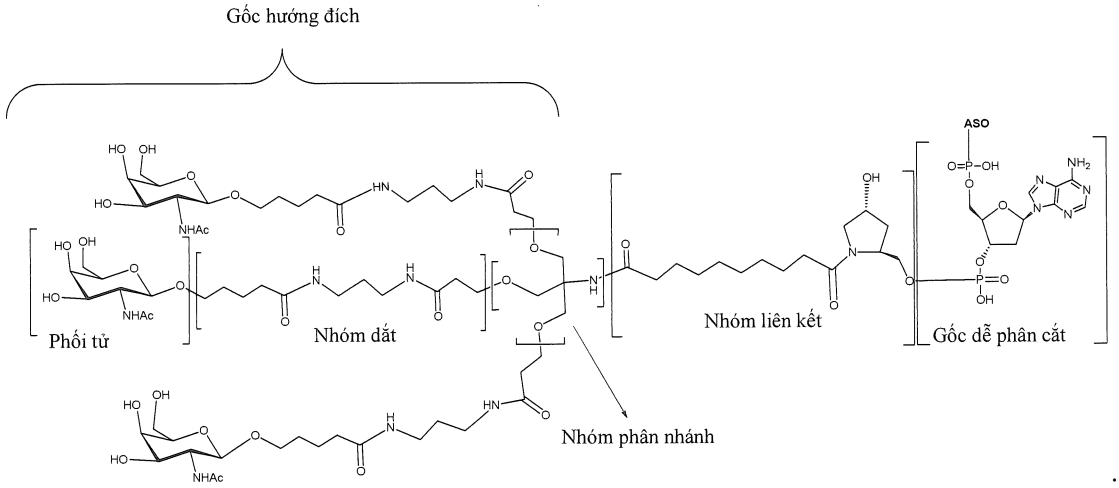
mỗi F là phối tử; và

q là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 5.

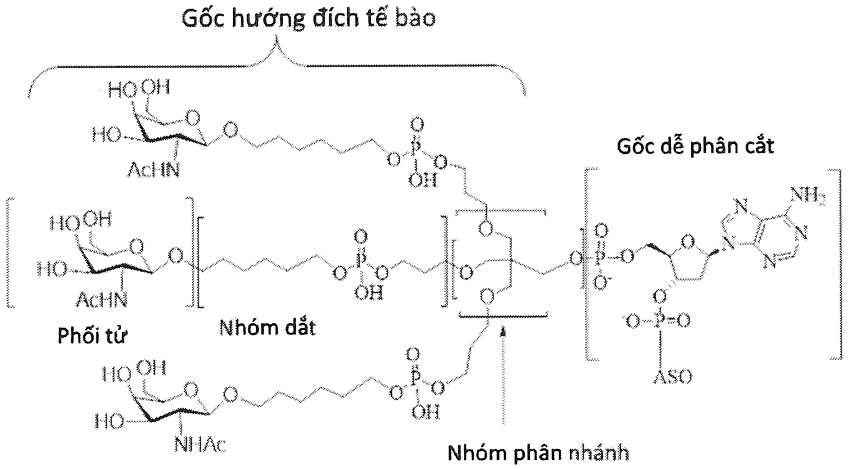
Theo một số phương án nhất định này, nhóm liên kết của thể tiếp hợp chứa ít nhất một liên kết tách được.

Theo các phương án nhất định mỗi nhóm dắt chứa ít nhất một liên kết tách được.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp có cấu trúc được chọn trong số các cấu trúc sau:

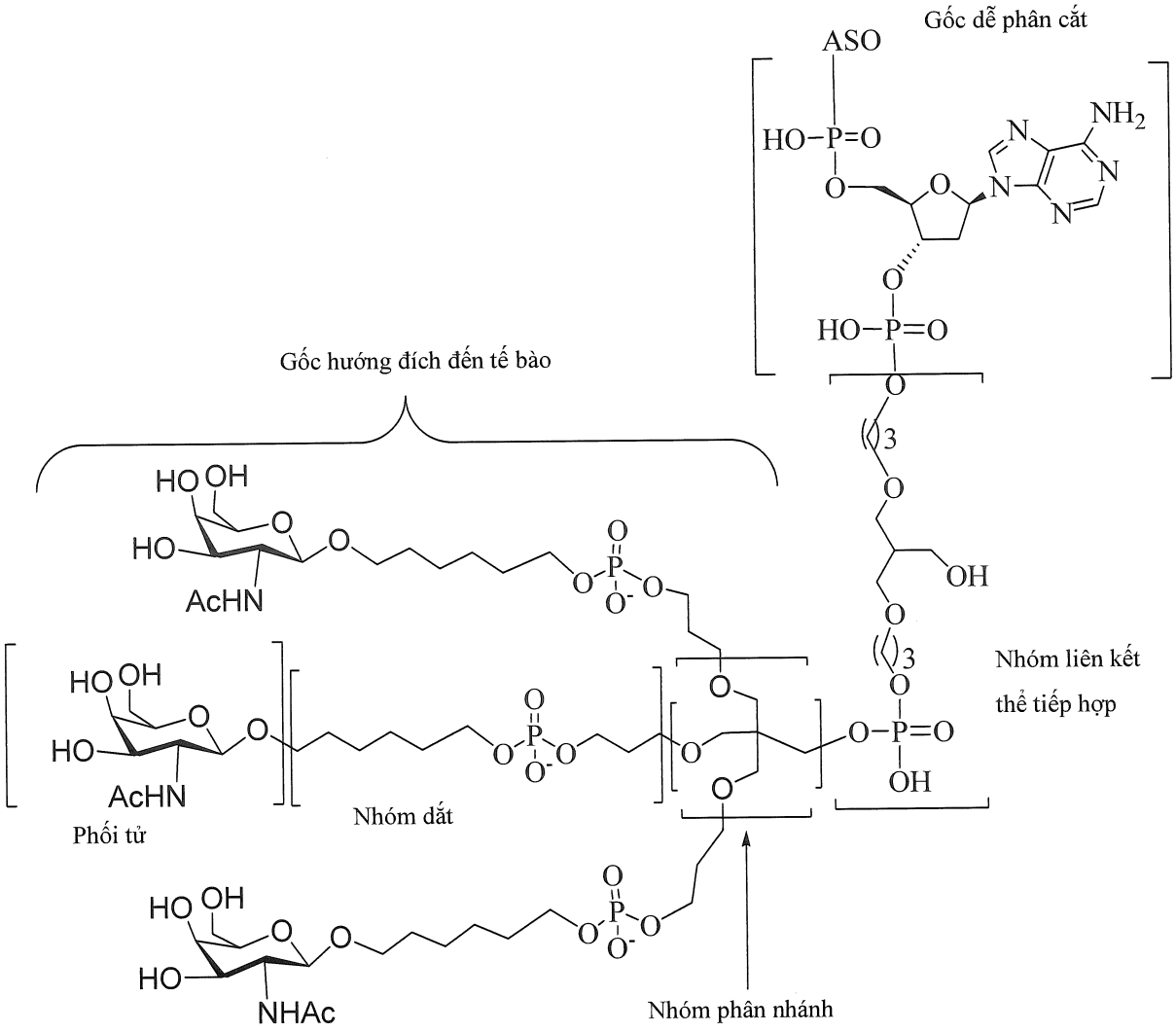


Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp có cấu trúc được chọn trong số các cấu trúc sau:



Nhóm phân nhánh

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp có cấu trúc được chọn trong số các cấu trúc sau:



Các patent Mỹ, công bố đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ, công bố đơn Quốc tế được lấy làm ví dụ đều chỉ ra việc điều chế nhất định của các thể tiếp hợp, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp, các tether, các nhóm liên kết, các nhóm phân nhánh, các phối tử, các gốc tách được cũng như các cải biến khác nêu trên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, US 5,994,517, US 6,300,319, US 6,660,720, US 6,906,182, US 7,262,177, US 7,491,805, US 8,106,022, US 7,723,509, US 2006/0148740, US 2011/0123520, WO 2013/033230

và WO 2012/037254, tất cả các tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn.

Các công bố được lấy làm ví dụ đều chỉ ra việc điều chế nhất định của các thể tiếp hợp, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp, các nhóm dắt, các nhóm liên kết, các nhóm phân nhánh, các phối tử, các gốc tách được cũng như các cải biến khác nêu trên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, BIESSEN *et al.*, "The Cholesteol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor: a Potent Cholesteol Lowering Agent" *J. Med. Chem.* (1995) 38:1846-1852, BIESSEN *et al.*, "Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" *J. Med. Chem.* (1995) 38:1538-1546, LEE *et al.*, "New and more efficient mulivalent glyco-ligands for asialoglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2011) 19:2494-2500, RENSEN *et al.*, "Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Logands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo" *J. Biol. Chem.* (2001) 276(40):37577-37584, RENSEN *et al.*, "Design and Synthesis Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoprotein to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" *J. Med. Chem.* (2004) 47:5798-5808, SLIEDREGT *et al.*, "Design and Synthesis Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" *J. Med. Chem.* (1999) 42:609-618, và Valentijn *et al.*, "Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the Asialoglycoprotein Receptor" *Tetrahedron,* 1997, *53(2),* 759-770, tất cả các tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn.

Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp bao gồm oligonucleotit trên cơ sở H RNaza (như gapmer) hoặc oligonucleotit điều biến cắt ghép (như oligonucleotit cải biến toàn bộ) và nhóm tiếp hợp bất kỳ chứa ít nhất một, hai, hoặc ba GalNAc các nhóm. Theo các phương án nhất định hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp chứa nhóm tiếp hợp bất kỳ tìm thấy ở tài liệu bất kỳ trong số các tài liệu viện dẫn sau: Lee, *Carbohydr Res*, 1978, 67, 509-514; Connolly *et al.*, *J Biol Chem*, 1982, 257, 939-945; Pavia *et al.*, *Int J Pep Protein Res*, 1983, 22, 539-548; Lee *et al.*, *Biochem*, 1984, 23, 4255-4261; Lee *et al.*, *Glycothể tiếp hợp J*, 1987, 4, 317-328; Toyokuni *et al.*,

Tetrahedron Lett, 1990, 31, 2673-2676; Biessen *et al.*, *J Med Chem*, 1995, 38, 1538-1546; Valentijn *et al.*, *Tetrahedron*, 1997, 53, 759-770; Kim *et al.*, *Tetrahedron Lett*, 1997, 38, 3487-3490; Lee *et al.*, *Bioconjug Chem*, 1997, 8, 762-765; Kato *et al.*, *Glycobiol*, 2001, 11, 821-829; Rensen *et al.*, *J Biol Chem*, 2001, 276, 37577-37584; Lee *et al.*, *Methods Enzymol*, 2003, 362, 38-43; Westerlind *et al.*, *Glycoconj J*, 2004, 21, 227-241; Lee *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(19), 5132-5135; Maierhofer *et al.*, *Bioorg Med Chem*, 2007, 15, 7661-7676; Khorev *et al.*, *Bioorg Med Chem*, 2008, 16, 5216-5231; Lee *et al.*, *Bioorg Med Chem*, 2011, 19, 2494-2500; Kornilova *et al.*, *Analyt Biochem*, 2012, 425, 43-46; Pujol *et al.*, *Angew Chemie Int Ed Engl*, 2012, 51, 7445-7448; Biessen *et al.*, *J Med Chem*, 1995, 38, 1846-1852; Sliedregt *et al.*, *J Med Chem*, 1999, 42, 609-618; Rensen *et al.*, *J Med Chem*, 2004, 47, 5798-5808; Rensen *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26, 169-175; van Rossenberg *et al.*, *Gene Ther*, 2004, 11, 457-464; Sato *et al.*, *J Am Chem Soc*, 2004, 126, 14013-14022; Lee *et al.*, *J Org Chem*, 2012, 77, 7564-7571; Biessen *et al.*, *FASEB J*, 2000, 14, 1784-1792; Rajur *et al.*, *Bioconjug Chem*, 1997, 8, 935-940; Duff *et al.*, *Methods Enzymol*, 2000, 313, 297-321; Maier *et al.*, *Bioconjug Chem*, 2003, 14, 18-29; Jayaprakash *et al.*, *Org Lett*, 2010, 12, 5410-5413; Manoharan, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2002, 12, 103-128; Merwin *et al.*, *Bioconjug Chem*, 1994, 5, 612-620; Tomiya *et al.*, *Bioorg Med Chem*, 2013, 21, 5275-5281; đơn yêu cầu cấp patent quốc tế có số công bố WO1998/013381; WO2011/038356; WO1997/046098; WO2008/098788; WO2004/101619; WO2012/037254; WO2011/120053; WO2011/100131; WO2011/163121; WO2012/177947; WO2013/033230; WO2013/075035; WO2012/083185; WO2012/083046; WO2009/082607; WO2009/134487; WO2010/144740; WO2010/148013; WO1997/020563; WO2010/088537; WO2002/043771; WO2010/129709; WO2012/068187; WO2009/126933; WO2004/024757; WO2010/054406; WO2012/089352; WO2012/089602; WO2013/166121; WO2013/165816; các patent Mỹ số 4,751,219; 8,552,163; 6,908,903; 7,262,177; 5,994,517; 6,300,319; 8,106,022; 7,491,805; 7,491,805; 7,582,744; 8,137,695; 6,383,812; 6,525,031; 6,660,720; 7,723,509; 8,541,548; 8,344,125; 8,313,772; 8,349,308; 8,450,467; 8,501,930; 8,158,601; 7,262,177; 6,906,182; 6,620,916; 8,435,491; 8,404,862; 7,851,615;

đơn yêu cầu cấp patent Mỹ đã công bố số US2011/0097264; US2011/0097265; US2013/0004427; US2005/0164235; US2006/0148740; US2008/0281044; US2010/0240730; US2003/0119724; US2006/0183886; US2008/0206869; US2011/0269814; US2009/0286973; US2011/0207799; US2012/0136042; US2012/0165393; US2008/0281041; US2009/0203135; US2012/0035115; US2012/0095075; US2012/0101148; US2012/0128760; US2012/0157509; US2012/0230938; US2013/0109817; US2013/0121954; US2013/0178512; US2013/0236968; US2011/0123520; US2003/0077829; US2008/0108801; và US2009/0203132; tất cả các tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn.

C. Sử dụng và các dấu hiệu nhất định

Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp thể hiện mức giảm ARN đích hiệu nghiệm *in vivo*. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa không tiếp hợp tích tụ ở thận. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp tích tụ ở gan. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được dung nạp tốt. Cụ thể là, các tính chất này làm cho các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp là hữu dụng để ức chế nhiều ARN đích, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các loại liên quan đến chuyển hóa, tim mạch và các bệnh, các rối loạn hoặc các tình trạng bệnh lý khác. Do đó, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị các bệnh, các rối loạn hoặc các tình trạng này bằng cách cho tiếp xúc mô gan với các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến các ARN liên quan đến các bệnh, các rối loạn hoặc các tình trạng này. Do đó, sáng chế còn đề xuất phương pháp để cải thiện tình trạng bất kỳ trong số chuyển hóa, tim mạch và các bệnh khác, các rối loạn hoặc các tình trạng này bằng các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp theo sáng chế.

Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp hiệu nghiệm hơn so với bản sao không tiếp hợp ở nồng độ cụ thể ở mô. Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết hoặc cơ chế, trong các phương án nhất định, thể tiếp hợp có thể cho phép hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được đi vào tế bào hiệu quả hơn hoặc được đi vào tế bào có ích hơn. Ví dụ, theo các phương án nhất định các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp có thể thể hiện mức độ giảm đích lớn hơn so với bản sao không tiếp hợp của nó trong đó cả hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp và bản sao không tiếp hợp của nó đều có mặt trong mô ở cùng

nồng độ. Ví dụ, theo các phương án nhất định các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp có thể thể hiện mức độ giảm đích lớn hơn so với bản sao không tiếp hợp của nó trong đó cả hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp và bản sao không tiếp hợp của nó đều có mặt ở gan ở cùng nồng độ.

Sự hấp thu có năng suất và không có năng suất của các oligonucleotit đã được tranh luận trước đây (xem chẳng hạn Geary, R. S., E. Wancewicz, *et al.* (2009). "Effect of Dose and Plasma Concentration on Liver Uptake and Pharmacologic Activity of a 2'-Methoxyethyl Modified Chimeric Antisense Oligonucleotid Targeting PTEN". *Biochem. Pharmacol.* 78(3): 284-91; & Koller, E., T. M. Vincent, *et al.* (2011). "Mechanisms of single-stranded phosphorothioate modified antisense oligonucleotide accumulation in hepatocytes". *Nucleic Acids Res.* 39(11): 4795-807). Các nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể cải thiện sự hấp thu năng suất.

Theo các phương án nhất định, các nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể cải thiện hiệu lực hơn nữa bằng cách tăng ái lực của hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp đối với loại tế bào hoặc mô cụ thể. Theo các phương án nhất định, các nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể cải thiện hiệu lực hơn nữa bằng cách tăng nhận dạng của hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp bằng một hoặc nhiều thụ thể bề mặt tế bào. Theo các phương án nhất định, các nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể cải thiện hiệu lực hơn nữa bằng cách tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tiêu hóa vật lạ của tế bào của hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp.

Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được có thể cải thiện hiệu lực hơn nữa bằng cách cho phép thể tiếp hợp tách ra khỏi oligonucleotit đối nghĩa sau khi hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp đã đi vào tế bào. Do đó, theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp có thể được dùng ở các liều lượng thấp hơn so với mức cần thiết đối với các oligonucleotit đối nghĩa không tiếp hợp.

Các liên kết phosphorothioat đã được kết hợp vào các oligonucleotit đối nghĩa trên đây. Các liên kết phosphorothioat này là các kháng nucleaza và cũng cải thiện tính ổn định của oligonucleotit. Ngoài ra, các liên kết phosphorothioat cũng liên kết các protein nhất định, mà dẫn đến sự tích tụ của oligonucleotit đối nghĩa ở gan. Các oligonucleotit có các liên kết phosphorothioat ít hơn thì tích tụ ít hơn ở gan và nhiều hơn

ở thận (xem, ví dụ: Geary, R., "Pharmacokinetic Properties of 2'-O-(2-metoxyetyl)-Oligonucleotide Analogs in Rats", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 296, No. 3, 890-897; *&Pharmacological Properties of 2'-O-Methoxyethyl Modified Oligonucleotides* trong: Antisense a Drug Technology, Chapter 10, Crooke, S.T., ed., 2008). Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit có các liên kết giữa nucleosit phosphorothioat ít hơn và nhiều liên kết giữa nucleosit phosphođieste hơn thì tích tụ ít hơn ở gan và nhiều hơn thận. Khi điều trị các bệnh ở gan, điều này là không mong muốn vì các lý do (1) ít thuốc đạt đến vị trí tác động mong muốn (liver); (2) thuốc thoát vào nước tiểu; và (3) thận được tiếp xúc với nồng độ thuốc tương đối cao mà có thể gây ra nhiễm độc ở thận. Do đó, đối với bệnh gan, các liên kết phosphorothioat đem lại các lợi ích quan trọng.

Tuy nhiên, theo các phương án nhất định, việc dùng các oligonucleotit một cách đồng đều được liên kết nhờ liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit ảnh hưởng đến một hoặc nhiều phản ứng gây viêm. (xem làm ví dụ: *J Lab Clin Med.* 1996 Sep;128(3):329-38. "Amplification of antibody production by phosphorothioate oligodeoxynucleotides". Branda *et al.*; và xem cả, ví dụ: *Toxicologic Properties* in Antisense a Drug Technology, Chapter 12, pages 342-351, Crooke, S.T., ed., 2008). Theo các phương án nhất định, việc dùng các oligonucleotit trong đó hầu hết liên kết giữa các nucleosit bao gồm liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit ảnh hưởng đến một hoặc nhiều phản ứng gây viêm.

Theo các phương án nhất định, mức độ tác động gây viêm có thể phụ thuộc vào một số biến (ví dụ, cải biến khung, các hiệu ứng đích lạ, các cải biến nucleobazơ, và/hoặc các cải biến nucleosit) ví dụ xem: *Toxicologic Properties* in Antisense a Drug Technology, Chapter 12, pages 342-351, Crooke, S.T., ed., 2008). Theo các phương án nhất định, mức độ tác động gây viêm có thể được giảm nhẹ bằng cách điều chỉnh một hoặc nhiều biến. Ví dụ, mức độ tiền viêm của oligonucleotit đã định có thể là được giảm nhẹ bằng cách thay thế số lượng bất kỳ của liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit bằng các liên kết phosphođieste giữa nucleosit và bằng cách đó làm giảm tổng số liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit.

Theo các phương án nhất định, mong muốn để làm giảm số lượng của các liên kết phosphorothioat, nếu điều này được thực hiện, có thể không làm mất tính ổn định và không dịch chuyển sự phân bố từ gan đến thận. Ví dụ, theo các phương án nhất định, số lượng của các liên kết phosphorothioat có thể được giảm bằng cách thay thế các liên kết phosphorothioat bằng các liên kết phosphođieste. Theo phương án này, hợp chất đối nghĩa có ít liên kết phosphorothioat và nhiều liên kết phosphođieste có thể ít gây ra phản ứng gây viêm hoặc không có phản ứng gây viêm. Mặc dù hợp chất đối nghĩa có ít liên kết phosphorothioat và nhiều liên kết phosphođieste ít có thể gây ra các phản ứng gây viêm, hợp chất đối nghĩa có ít liên kết phosphorothioat và nhiều liên kết phosphođieste có thể không tích tụ ở gan và có thể kém hiệu quả hơn ở cùng hoặc ở liều lượng tương tự so với hợp chất đối nghĩa có nhiều liên kết phosphorothioat. Do đó, theo các phương án nhất định, mong muốn để thiết kế hợp chất đối nghĩa mà có nhiều liên kết phosphođieste và nhiều liên kết phosphorothioat song còn có tính ổn định và phân bố tốt đến gan.

Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp tích tụ nhiều ở gan và ít ở thận hơn các bản sao không tiếp hợp, thậm chí khi một vài trong số các các liên kết phosporothioat được thay bằng các liên kết phosphođieste giữa nucleosit ít gây viêm. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp tích tụ nhiều ở gan và là không bài tiết nhiều như vậy trong nước tiểu so với các bản sao không tiếp hợp của nó, thậm chí khi một vài trong số các các liên kết phosporothioat được thay bằng các liên kết phosphođieste giữa nucleosit ít gây viêm. Theo các phương án nhất định, việc sử dụng thể tiếp hợp cho phép thiết kế thuốc đối nghĩa được dung nạp tốt hơn và hiệu quả hơn. Thực vậy, theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp có các chỉ số điều trị bệnh lớn hơn so với các bản sao không tiếp hợp. Điều này cho phép hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp sẽ được dùng ở liều lượng tuyệt đối cao hơn, vì có ít nguy cơ phản ứng gây viêm và ít nguy cơ gây độc tính thận. Liều cao hơn này, cho phép dùng liều ít thường xuyên hơn, do sự làm sạch (chuyển hóa) được mong đợi là tương tự. Ngoài ra, vì hợp chất này là hiệu quả hơn, như trên, có thể cho phép nồng độ được dùng thấp hơn trước khi liều lượng tiếp theo mà không làm mất hoạt tính chữa bệnh, cho phép khoảng thời gian dài hơn giữa các lần cấp liều.

Theo các phương án nhất định, vẫn mong muốn đưa vào một vài liên kết phosphorothioat. Ví dụ, các liên kết đầu tận cùng dễ bị tác động bởi exonucleoaza và như vậy theo các phương án nhất định, các liên kết này là phosphorothioat hoặc liên kết được cải biến khác. Liên kết giữa các nucleosit liên kết hai đeoxynucleosit dễ bị phân cắt bởi endonucleaza và như vậy theo các phương án nhất định các liên kết này là phosphorothioat hoặc liên kết được cải biến khác. Liên kết giữa các nucleosit giữa nucleosit được cải biến và đeoxynucleosit, trong đó đeoxynucleosit ở đầu 5' của liên kết đeoxynucleosit dễ bị phân cắt bởi các enđonucleaza và như vậy theo các phương án nhất định các liên kết là phosphorothioat hoặc liên kết được cải biến khác. Liên kết giữa các nucleosit giữa hai nucleosit được cải biến theo một loại nhất định và giữa đeoxynucleosit và nucleosit được cải biến theo một số loại nhất định, trong đó nucleosit được cải biến ở đầu 5' của liên kết là đủ khả năng kháng tác dụng phân cắt của nucleaza, mà liên kết có thể là phosphođieste.

Theo các phương án nhất định, oligonucleotit đối nghĩa của hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp chứa ít hơn 16 liên kết phosphorthioat. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit đối nghĩa của hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp chứa ít hơn 15 liên kết phosphorthioat. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit đối nghĩa của hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp chứa ít hơn 14 liên kết phosphorthioat. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit đối nghĩa của hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp chứa ít hơn 13 liên kết phosphorthioat. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit đối nghĩa của hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp chứa ít hơn 12 liên kết phosphorthioat. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit đối nghĩa của hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp chứa ít hơn 11 liên kết phosphorthioat. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit đối nghĩa của hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp chứa ít hơn 10 liên kết phosphorthioat. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit đối nghĩa của hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp chứa ít hơn 9 liên kết phosphorthioat. Theo các phương án nhất định, oligonucleotit đối nghĩa của hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp chứa ít hơn 8 liên kết phosphorthioat.

Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa chứa một hoặc nhiều nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có hoạt tính và/hoặc hiệu lực và/hoặc khả năng dung nạp tốt hơn so với gốc hợp chất đối nghĩa không có một hoặc nhiều nhóm tiếp

hợp đó. Do đó, theo các phương án nhất định, mong muốn gắn nhóm tiếp hợp đó vào oligonucleotit. Các nhóm tiếp hợp này có thể được gắn ở đầu tận cùng 5', và/hoặc 3' của oligonucleotit. Trong một số trường hợp nhất định, việc gắn ở đầu tận cùng 5' là mong muốn theo cách tổng hợp. Nói chung, các oligonucleotit được tổng hợp bằng cách gắn nucleosit ở đầu tận cùng 3' vào nền rắn và ngẫu hợp liên tục các nucleosit từ 3' đến 5' bằng cách áp dụng các kỹ thuật mà đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo đó, nếu nhóm tiếp hợp được mong muốn ở đầu tận cùng 3', thì có thể (1) gắn nhóm tiếp hợp vào nucleosit ở đầu tận cùng 3' và gắn nucleosit đã tiếp hợp đó vào nền rắn để điều chế tiếp oligonucleotit hoặc (2) gắn nhóm tiếp hợp vào nucleosit ở đầu tận cùng 3' của oligonucleotit hoàn chỉnh sau quy trình tổng hợp. Không cách nào trong số các cách này là đủ hữu hiệu và do đó cả hai cách đều tốn kém. Cụ thể, việc gắn nucleosit đã tiếp hợp vào nền rắn, như thể hiện trong các ví dụ trong bản mô tả này, là quy trình không hiệu quả. Theo các phương án nhất định, việc gắn nhóm tiếp hợp vào nucleosit ở đầu tận cùng 5' là dễ hơn về mặt tổng hợp so với việc gắn ở đầu tận cùng 3'. Có thể gắn nucleosit không tiếp hợp ở đầu tận cùng 3' vào nền rắn và điều chế oligonucleotit bằng cách áp dụng các phản ứng chuẩn và đã được biết rõ. Lúc đó chỉ cần gắn nucleosit 5' có nhóm tiếp hợp ở bước liên hợp cuối cùng. Theo các phương án nhất định, việc này là hiệu quả hơn việc gắn trực tiếp nucleosit đã tiếp hợp vào nền rắn như thường thực hiện để điều chế oligonucleotit 3' đã tiếp hợp. Các ví dụ này thể hiện việc gắn ở đầu tận cùng 5'. Ngoài ra, các nhóm tiếp hợp nhất định có ưu điểm về mặt tổng hợp. Ví dụ, các nhóm tiếp hợp nhất định chứa các nhóm liên kết phospho là đơn giản hơn về mặt tổng hợp và được điều chế hiệu quả hơn các nhóm tiếp hợp khác, kể cả các nhóm tiếp hợp đã thông báo trên đây (ví dụ, WO/2012/037254).

Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được dùng cho đối tượng. Theo các phương án này, các hợp chất đối nghĩa chứa một hoặc nhiều nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có hoạt tính và/hoặc hiệu lực và/hoặc độ dung nạp tốt hơn so với gốc hợp chất đối nghĩa không có một hoặc nhiều nhóm tiếp hợp này. Không bị ràng buộc bởi cơ chế, tin rằng nhóm tiếp hợp giúp phân phối phân bổ, phân phối, và/hoặc hấp thu vào tế bào đích hoặc mô đích. Theo các phương án nhất định, sau khi vào trong tế bào đích hoặc mô đích, mong muốn rằng toàn bộ hoặc một phần của

nhóm tiếp hợp được phân cắt để giải phóng oligonucleotit hoạt tính. Theo các phương án nhất định, không cần toàn bộ nhóm tiếp hợp được phân cắt khỏi oligonucleotit. Ví dụ, theo Ví dụ 20a oligonucleotit đã tiếp hợp được dùng cho chuột nhắt và nhiều loại hợp chất, mỗi loại chứa phần khác nhau của nhóm tiếp hợp còn lại trên oligonucleotit, được phát hiện (Bảng 10a). Hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp này thể hiện hiệu lực tốt (Bảng 10). Do đó, theo các phương án nhất định, biên dạng chuyển hóa của nhiều phân cắt từng phần của nhóm tiếp hợp không cản trở hoạt tính/hiệu lực. Tuy nhiên, theo các phương án nhất định mong muốn rằng tiền dược chất (oligonucleotit đã tiếp hợp) tạo ra một hoạt chất. Trong một số trường hợp nhất định, nếu thấy nhiều dạng hoạt chất, có thể cần xác định lượng tương đối và hoạt tính đối với mỗi loại. Theo các phương án nhất định, khi cần xem xét về mặt cấp phép (ví dụ, USFDA hoặc dạng tương đương) mong muốn có một (hoặc chủ yếu một) dạng hoạt tính. Theo một số phương án nhất định, mong muốn rằng dạng hoạt tính này là oligonucleotit đối nghĩa không có phần bất kỳ nào của nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, các nhóm tiếp hợp ở đầu tận cùng 5' có thể gây chuyển hóa hoàn toàn nhóm tiếp hợp. Không muốn bị ràng buộc bởi cơ chế, có thể các enzym nội sinh chịu trách nhiệm về chuyển hóa ở đầu tận cùng 5' (ví dụ, các nucleaza 5') có hoạt tính/hiệu quả hơn dạng 3'. Theo các phương án nhất định, các nhóm tiếp hợp cụ thể dễ bị chuyển hóa hơn thành một dạng hoạt tính. Theo các phương án nhất định, các nhóm tiếp hợp nhất định dễ bị chuyển hóa hơn thành oligonucleotit.

D. Đối nghĩa

Theo các phương án nhất định, các hợp chất oligome theo sáng chế là các hợp chất đối nghĩa. Theo các phương án này, hợp chất oligome bổ trợ cho axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, axit nucleic đích là ARN. Theo các phương án nhất định, axit nucleic đích là ARN không mã hóa. Theo các phương án nhất định, axit nucleic đích mã hóa protein. Theo các phương án nhất định, axit nucleic đích được chọn từ ARN thông tin, tiền ARN thông tin, vi ARN, ARN không mã hóa, kể cả ARN không mã hóa nhỏ, và ARN định hướng gen khởi đầu. Theo các phương án nhất định, các hợp chất oligome are ít nhất một phần bổ trợ cho nhiều hơn một axit nucleic đích. Ví dụ, các hợp chất oligome theo sáng chế có thể là các chất tương tự vi ARN, mà thường liên kết với nhiều đích.

Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa bao gồm phần có trình tự nucleobazơ bổ trợ ít nhất 70% cho trình tự nucleobazơ của axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa bao gồm phần có trình tự nucleobazơ bổ trợ ít nhất 80% cho trình tự nucleobazơ của axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa bao gồm phần có trình tự nucleobazơ bổ trợ ít nhất 90% cho trình tự nucleobazơ của axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa bao gồm phần có trình tự nucleobazơ bổ trợ ít nhất 95% cho trình tự nucleobazơ của axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa bao gồm phần có trình tự nucleobazơ bổ trợ ít nhất 98% cho trình tự nucleobazơ của axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa bao gồm phần có trình tự nucleobazơ mà bổ trợ 100% cho trình tự nucleobazơ của axit nucleic đích. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa bổ trợ ít nhất 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, hoặc 100% cho trình tự nucleobazơ của axit nucleic đích trên toàn bộ chiều dài của hợp chất đối nghĩa.

Các cơ chế đối nghĩa bao gồm cơ chế nhất định liên quan đến mức độ lai của hợp chất oligome với axit nucleic đích, trong đó mức độ lai dẫn đến hiệu quả sinh học. Theo các phương án nhất định, mức độ lai này dẫn đến sự thoái biến axit nucleic đích hoặc chiếm chỗ bằng sự ức chế đồng phát hoặc kích thích của tổ chức tế bào liên quan đến, ví dụ, dịch mã, phiên mã, hoặc polyadenyl hóa của axit nucleic đích hoặc của axit nucleic mà axit nucleic đích có thể tương tác với nó theo cách khác.

Một loại cơ chế đối nghĩa liên quan đến thoái biến của ARN đích là gen đối nghĩa gián tiếp H RNaza. H RNaza là endonucleaza tế bào mà phân cắt sợi ARN của cặp ARN:ADN. Trong lĩnh vực kỹ thuật này, đã biết rằng các hợp chất đối nghĩa sợi đơn mà là "kiểu ADN" thể hiện hoạt tính H RNaza ở tế bào của động vật có vú. Do đó, hoạt hóa của H RNaza, dẫn đến mức độ phân cắt đích ARN, nhờ đó làm gia tăng đáng kể hiệu quả của việc ức chế gián tiếp oligonucleotit kiểu ADN trong mức độ biểu hiện gen.

Các cơ chế đối nghĩa còn bao gồm, mà không giới hạn ở các cơ chế can thiệp ARN, mà áp dụng chu trình RISC. Các cơ chế can thiệp ARN này bao gồm, mà không giới hạn ở cơ chế can thiệp ngắn ARN, ARN sợi đơn và vi ARN. Các cơ chế này bao gồm việc tạo ra chất tương tự vi ARN và/hoặc kháng vi ARN.

Các cơ chế đối nghĩa còn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các cơ chế mà lai hoặc ARN không mã hóa bắt chước khác với vi ARN hoặc ARN thông tin. ARN không mã hóa này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, RNA định hướng gen khởi đầu và RNA ngắn và dài mà thực hiện phiên mã hoặc dịch mã một hoặc nhiều axit nucleic.

Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit chứa các thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này là các hợp chất can thiệp ARN. Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit oligome chứa các thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này là các hợp chất ARN sợi đơn. Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit chứa các thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này được ghép cặp với hợp chất oligome thứ hai để tạo ra ARN can thiệp nhỏ. Theo một số phương án nhất định, hợp chất oligome thứ hai còn chứa thể tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, hợp chất oligome thứ hai là axit nucleic được cải biến hoặc không được cải biến bất kỳ. Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit chứa các thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này là sợi gen đối nghĩa trong hợp chất can thiệp ngắn ARN. Theo các phương án nhất định, các oligonucleotit chứa các thể tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này là sợi có nghĩa trong hợp chất can thiệp ngắn ARN. Trong các phương án trong đó hợp chất oligome đã tiếp hợp là sợi đôi ARN can thiệp nhỏ, thể tiếp hợp có thể là trên sợi có nghĩa, sợi gen đối nghĩa hoặc cả sợi có nghĩa và sợi gen đối nghĩa.

D. Axit nucleic đích, các vùng và các phân đoạn

Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp hướng đích đến axit nucleic bất kỳ. Theo các phương án nhất định, axit nucleic đích ghi mã protein đích mà có liên quan về lâm sàng. Theo các phương án này, việc điều biến axit nucleic đích dẫn đến lợi ích về mặt lâm sàng. Các axit nucleic đích nhất định bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đích các axit nucleic được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1: Các axit nucleic đích nhất định

Đích	Các loài	Số truy cập GENBANK®	SEQ ID NO
HBV	Người	U95551.1	1
Transthyretin (TTR)	Người	NM_000371.3	2

Quy trình hướng đích thường bao gồm việc xác định ít nhất một vị trí, phân đoạn, vùng đích bên trong axit nucleic đích đối với tương tác đối nghĩa cần xuất hiện sao cho sẽ thu được tác dụng mong muốn.

Theo các phương án nhất định, vùng đích là vùng đã định về mặt kết cấu của axit nucleic. Ví dụ, theo một số phương án nhất định này, vùng đích có thể bao gồm vùng dịch mã ở đầu tận cùng 3', 5' UTR, exon, intron, vùng mã hóa, vùng bắt đầu dịch, vùng kết thúc dịch, hoặc phân đoạn đích hoặc vùng axit nucleic đã định khác.

Theo các phương án nhất định, phân đoạn đích ít nhất là khoảng phần 8 nucleobazơ của vùng đích mà hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến đó. Các phân đoạn đích có thể bao gồm các trình tự ADN hoặc ARN mà bao gồm ít nhất 8 nucleobazơ liên tục từ điểm cuối 5' của một trong số các phân đoạn đích (các nucleobazơ còn lại là duỗi thẳng liên tục của cùng ADN hoặc ARN bắt đầu ngay lập tức trước đầu tận cùng 5' của phân đoạn đích và tiếp tục cho đến khi ADN hoặc ARN chứa khoảng 8 đến 30 nucleobazơ). Các phân đoạn đích còn được thể hiện bởi các trình tự ADN hoặc ARN mà bao gồm ít nhất 8 nucleobazơ liên tiếp từ đầu tận cùng 3' của một trong số các phân đoạn đích (các nucleobazơ còn lại là đoạn duỗi thẳng liên tục của cùng ADN hoặc ARN bắt đầu ngay lập tức sau đầu tận cùng 3' của phân đoạn đích và tiếp tục cho đến khi ADN hoặc ARN chứa khoảng 8 đến 30 nucleobazơ). Các phân đoạn đích cũng có thể được thể hiện bởi các trình tự ADN hoặc ARN mà bao gồm ít nhất 8 nucleobazơ liên tiếp từ phần trình tự bên trong của phân đoạn đích, và có thể kéo dài theo một hoặc cả hai chiều cho đến khi hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp chứa khoảng 8 đến 30 nucleobazơ.

Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa được hướng đích đến các axit nucleic liệt kê trong Bảng 1 có thể được cải biến như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa có thể có gốc đường được cải biến, gốc đường không được cải biến hoặc hỗn hợp gồm gốc đường được cải biến và không được cải biến như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa có thể có liên kết giữa nucleosit được cải biến, liên kết giữa nucleosit không được cải biến hoặc hỗn hợp gồm các liên kết giữa nucleosit được cải biến và không được cải biến như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa có thể có nucleobazơ được cải biến, nucleobazơ không

được cải biến hoặc hỗn hợp gồm các nucleobazơ được cải biến và không được cải biến như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa có thể có kiểu như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa được hướng đích đến các axit nucleic liệt kê trong Bảng 1 có thể được tiếp hợp như được bộc lộ trong bản mô tả này.

1. Bệnh viêm gan B (HBV)

Bệnh viêm gan B là bệnh do virut lâu truyền ngoài đường tiêu hóa bởi nguyên liệu nhiễm như máu và các sản phẩm máu, kim nhiễm, qua đường tình dục và trực tiếp từ mẹ đã nhiễm bệnh hoặc mẹ mang bệnh sang con của nó. Tổ chức Y tế Thế giới dự tính rằng hơn 2 tỷ người đã mắc bệnh này trên toàn thế giới, trong đó có khoảng 4 triệu ca cấp tính mỗi năm, 1 triệu ca tử vong mỗi năm, và 350 đến 400 triệu bệnh nhân mắc bệnh mạn tính (World Health Organization: Geographic Prevalence of Hepatitis B Prevalence, 2004. http://www.who.int/vaccines-surveillance/graphics/htmls/hepbprev.htm).

Virut HBV là virut sợi đôi ở gan mà nó chỉ lây nhiễm người và các động vật linh trưởng không phải là người. Quá trình sao chép virut chủ yếu xảy ra ở gan và, ở mức độ thấp hơn, ở thận, tụy, tủy xương và lá lách (Hepatitis B virus biology. Microbiol Mol Biol Rev. 64: 2000; 51-68.). Chất đánh dấu virut và chất đánh dấu miễn dịch có thể phát hiện được ở máu và kiểu hình kháng nguyên-kháng nguyên đặc trưng phát triển sau một khoảng thời gian. Chất đánh dấu virut có thể phát hiện được đầu tiên là HBsAg, tiếp theo kháng nguyên của bệnh viêm gan B e (HBeAg) và ADN của HBV. Chuẩn độ có thể là cao trong giai đoạn ủ, nhưng mức ADN của HBV và HBeAg bắt đầu giảm khi phát bệnh và có thể xác định được tại đỉnh điểm bệnh về mặt lâm sàng (Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. N Engl J Med.. 350: 2004; 1118-1129). HBeAg là chất đánh dấu virut có thể phát hiện được trong máu và tương quan với sự sao chép virut tích cực, và do đó lượng và mức nhiễm virut cao (Hepatitis B e antigen—the dangerous end game of hepatitis B. N Engl J Med. 347: 2002; 208-210). Sự có mặt của kháng-HBsAb và kháng-HBcAb (IgG) biểu thị sự hồi phục và miễn dịch ở cá thể đã nhiễm.

Các phép điều trị hiện được Hiệp hội Nghiên cứu các Bệnh ở Gan của Mỹ (American Association for the Study of Liver Diseases - AASLD và Hiệp hội Nghiên cứu Gan của Châu Âu (European Association for the Study of Liver - EASL)) đề xuất cho tình trạng nhiễm HBV mạn tính bao gồm interferon alpha (INFα), được gắn gốc glycol bằng cách hóa học interferon alpha-2a (Peg-IFN2a), entecavir, và tenofovir. Các liệu pháp điều trị dùng nucleosit và nucleobazơ, entecavir và tenofovir, thành công trong việc làm giảm lượng virut, nhưng tỷ lệ sự chuyển đổi huyết thanh HBeAg và hao hụt HBsAg vẫn thấp hơn mức đạt được bằng cách áp dụng điều trị IFNα. Các phép điều trị tương tự khác, bao gồm lamivudine (3TC), telbivudine (LdT), và adefovir cũng được áp dụng, nhưng đối với các phép điều trị nucleosit/nucleobazơ nói chung, sự hình thành tính kháng hạn chế hiệu quả điều trị.

Do đó, trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phát hiện và phát triển các phép điều trị mới kháng virut. Ngoài ra, cần đến các phép điều trị mới kháng HBV có khả năng tăng tỷ lệ chuyển đổi huyết thanh HBeAg và HBsAg. Nghiên cứu lâm sàng gần đây đã phát hiện mối tương quan giữa sự chuyển đổi huyết thanh và mức giảm HBeAg (Fried et al (2008) Hepatology 47:428) và giảm HBsAg (Moucari et al (2009) Hepatology 49:1151). Hiện tượng giảm lượng kháng nguyên có thể cho phép kiểm soát nhiễm HBV về mặt miễn dịch học vì lượng kháng nguyên cao được xem là gây ra tính dung nạp về mặt miễn dịch học. Các phép điều trị hiện tại bằng nucleosit đối với HBV có khả năng làm giảm đáng kể lượng HBV trong huyết thanh nhưng có tác động không đáng kể đến mức HBeAg và HBsAg.

Đối nghĩa các hợp chất hướng đích HBV đã được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO2011/047312, WO2012/145674, và WO2012/145697, tất cả được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn. Các nghiên cứu lâm sàng được lên kế hoạch để đánh giá tác động của các hợp chất đối nghĩa hướng đích HBV ở bệnh nhân. Tuy nhiên, vẫn cần cung cấp cho bệnh nhân các phương án điều trị khác và hiệu quả hơn.

Các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp nhất định được hướng đích đến axit nucleic HBV

Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic HBV có trình tự của GENBANK® số truy cập U95551.1, được kết

hợp vào bản mô tả này là SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 bổ trợ ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc 100% cho trình tự SEQ ID NO: 1.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 3. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 3.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 4. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 4.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 5. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 5.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 6. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 6.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 7. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 7.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 8. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 8.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO:

9. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 9.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 10. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 10.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 11. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 11.

Bảng 2: Các hợp chất đối nghĩa được hướng đích đến HBV SEQ ID NO: 1

Số ISIS	Vị trí bắt đầu đích	Trình tự (5'-3')	Kiểu	SEQ ID NO
505358	1583	GCAGAGGTGAAGCGAAGTGC	eeeeeddddddddddeeeee	3
509934	1780	CCAATTTATGCCTACAGCCT	eeeeeddddddddddeeeee	4
510100	411	GGCATAGCAGCAGGATG	eeeddddddddddeeee	5
552023	1266	AGGAGTTCCGCAGTATGGAT	eeeeeeddddddddddeeee	6
552024	1577	GTGAAGCGAAGTGCACACGG	eeeeeeddddddddddeeee	7
552032	1585	GTGCAGAGGTGAAGCGAAGT	eeeeeeddddddddddeeee	8
552859	1583	AGGTGAAGCGAAGTGC	ekkddddddddddkke	9
552925	1264	TCCGCAGTATGGATCG	ekddddddddddkeke	10
577119	1780	AATTTATGCCTACAGCCT	kdkdkddddddddeeeee	11

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 505358 và nhóm tiếp hợp. ISIS 505358 là oligonucleotit cải biến có công thức sau: Ges mCes Aes Ges Aes Gds Gds Tds Gds Ads Ads Gds mCds Gds Ads Aes Ges Tes Ges mCe, trong đó:

A = adenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 509934 và nhóm tiếp hợp. ISIS 509934 là oligonucleotit cải biến có công thức sau: mCes mCes Aes Aes Tes Tds Tds Ads Tds Gds mCds mCds Tds Ads mCds Aes Ges mCes mCes Te, trong đó:

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 510100 và nhóm tiếp hợp. ISIS 510100 là oligonucleotit cải biến có công thức sau: Ges Ges mCes Ads Tds Ads Gds mCds Ads Gds mCds Ads Gds Ges Aes Tes Ge, trong đó,

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 552023 và nhóm tiếp hợp. ISIS 552023 là oligonucleotit cải biến có công thức sau:Aes Ges Ges Aes Ges Tes Tds mCds mCds Gds mCds Ads Gds Tds Ads Tds Ges Ges Aes Te, trong đó,

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 552024 và nhóm tiếp hợp. ISIS 552024 là oligonucleotit cải biến có công thức sau: Ges Tes Ges Aes Aes Ges mCds Gds Ads Ads Gds Tds Gds mCds Ads mCds Aes mCes Ges Ge, trong đó,

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 552032 và nhóm tiếp hợp. ISIS 552032 là oligonucleotit cải biến có công thức sau: Ges Tes Ges mCes Aes Ges Ads Gds Gds Tds Gds Ads Ads Gds mCds Gds Aes Aes Ges Te, trong đó,

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 552859 và nhóm tiếp hợp. ISIS 552859 là oligonucleotit cải biến có công thức sau: Aes Gks Gks Tds Gds Ads Ads Gds mCds Gds Ads Ads Gds Tks Gks mCe, trong đó,

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

k = cEt nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 552925 và nhóm tiếp hợp. ISIS 552925 là oligonucleotit cải biến có công thức sau: Tes mCks mCds Gds mCds Ads Gds Tds Ads Tds Gds Gds Aks Tes mCks Ge, trong đó:

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

k = cEt nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 577119 và nhóm tiếp hợp. ISIS 577119 là oligonucleotit cải biến có công thức sau: Aks Ads Tks Tds Tks Ads Tds Gds mCds mCds Tds Ads mCds Aes Ges mCes mCes Te, trong đó:

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

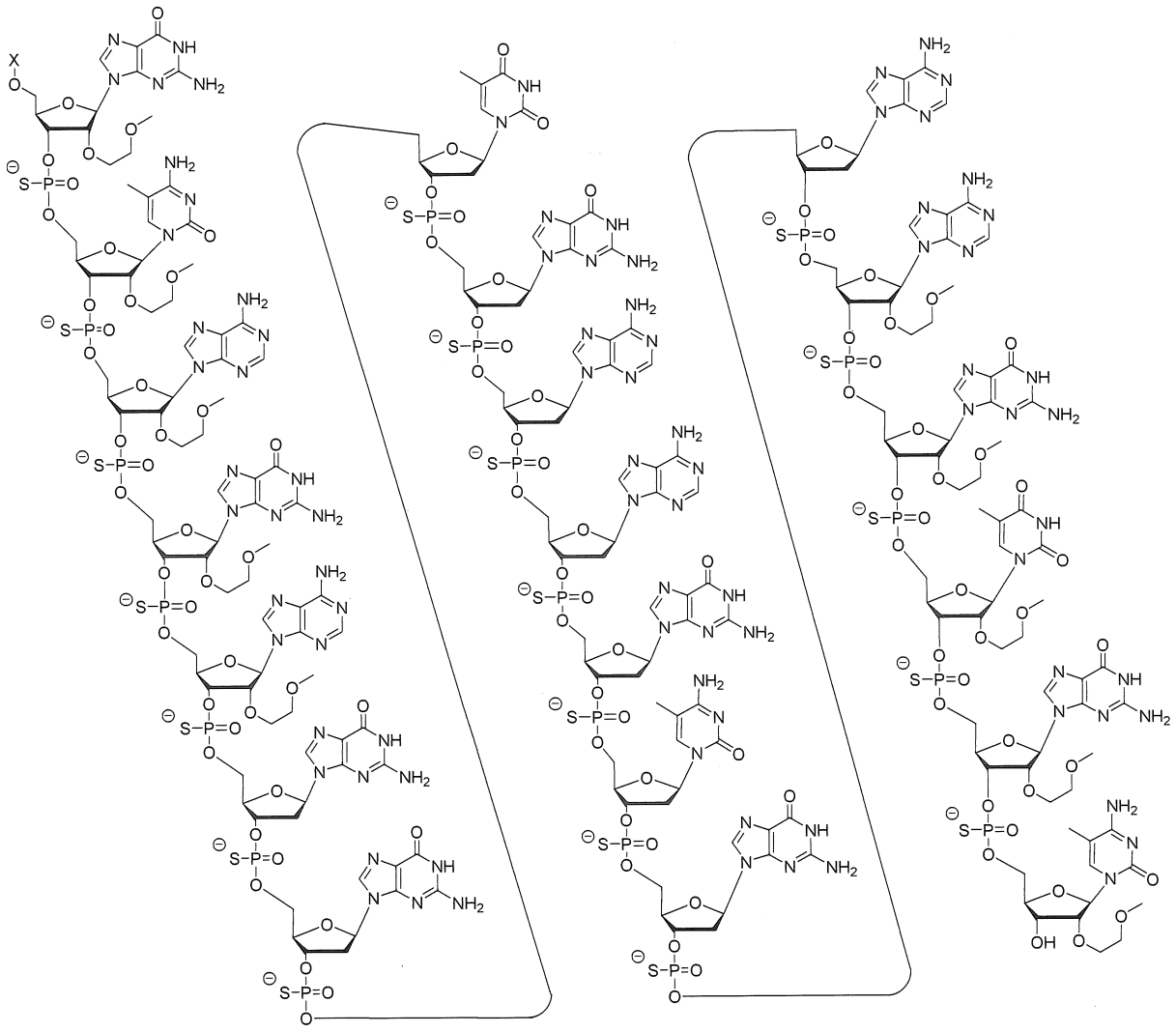
e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

k = cEt nucleosit được cải biến,

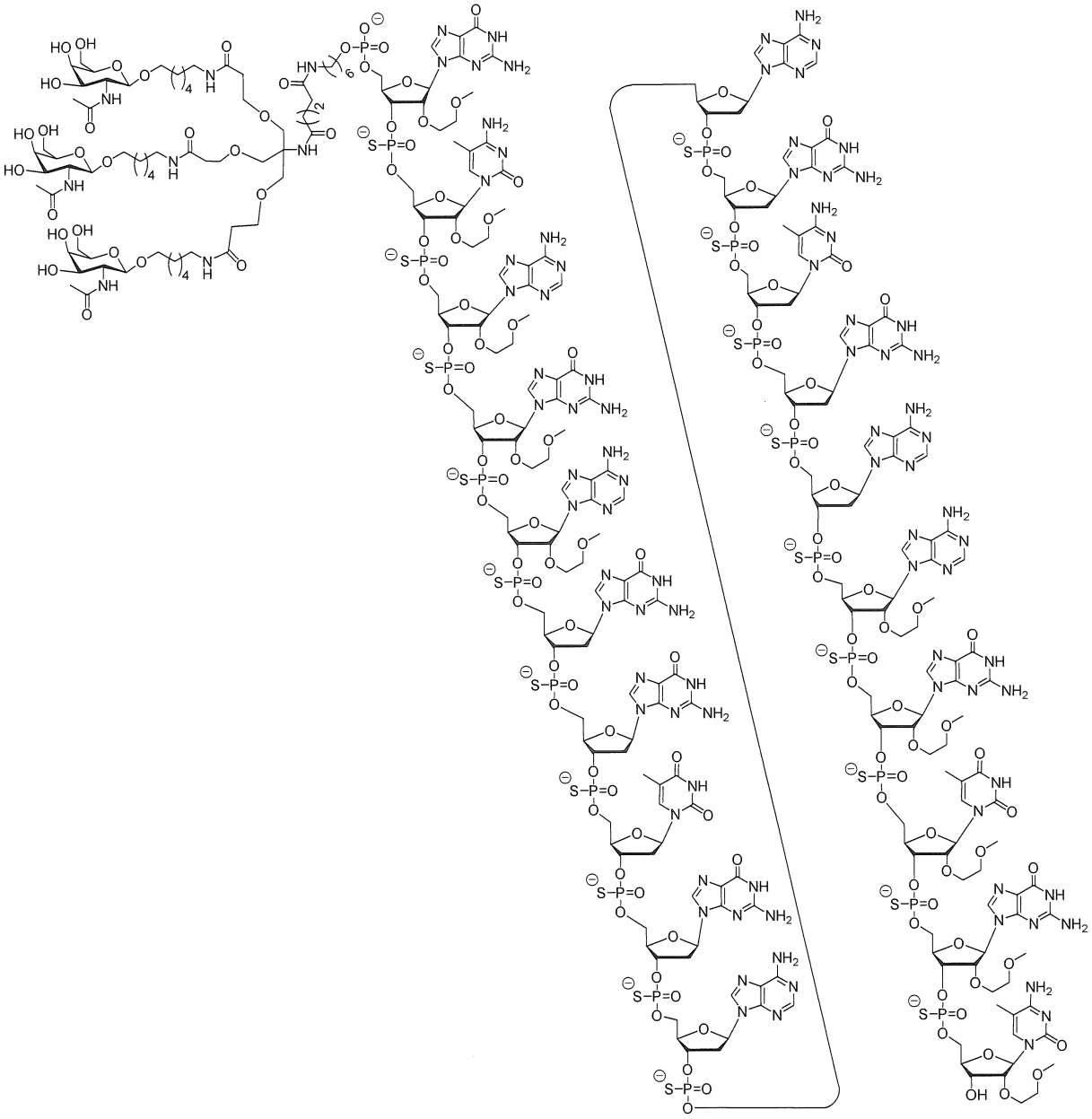
d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

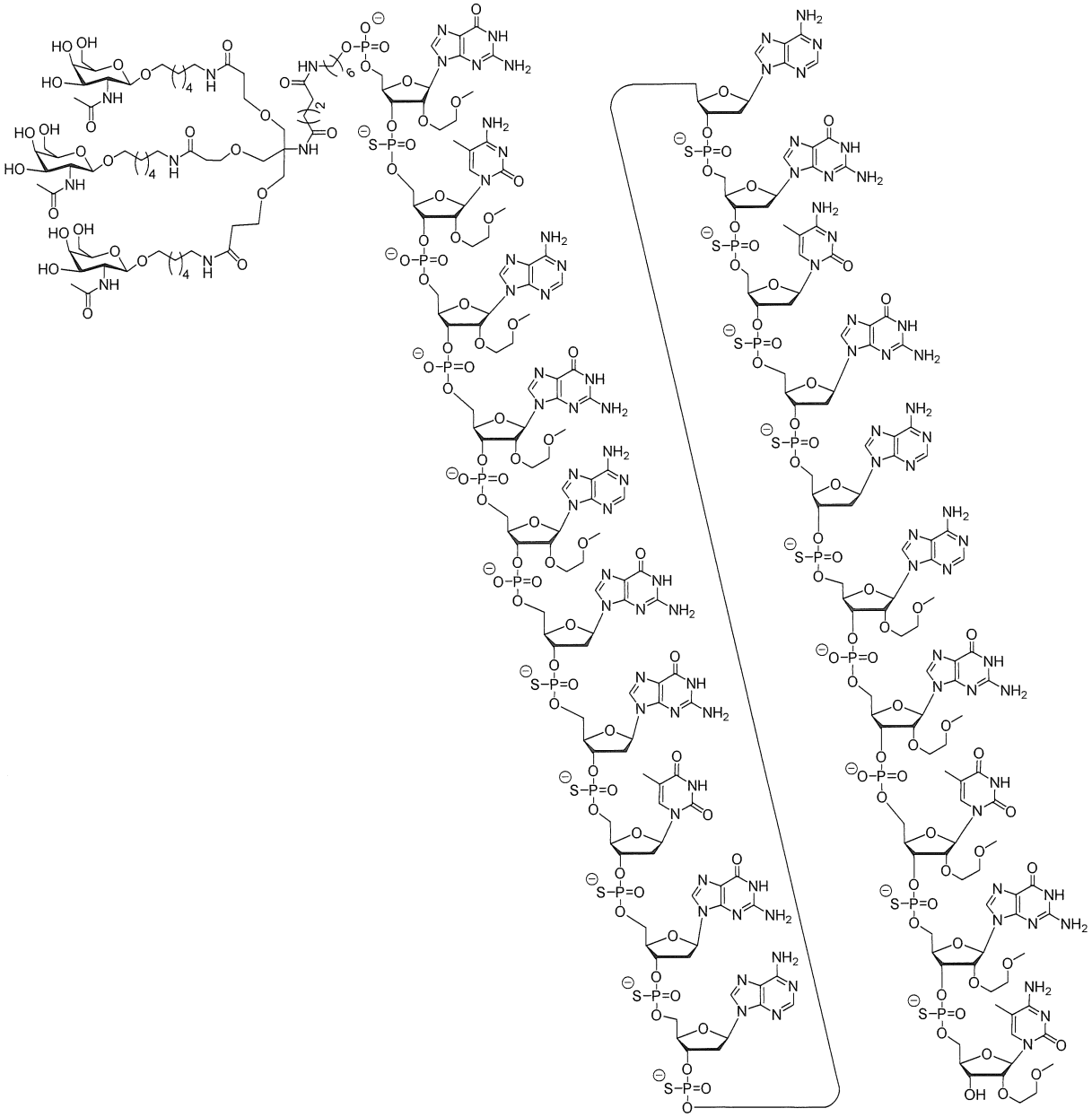
Theo các phương án nhất định, hợp chất có công thức hóa học sau chứa hoặc bao gồm ISIS 505358 có X ở vị trí 5', trong đó X là nhóm tiếp hợp như được bộc lộ trong bản mô tả này:



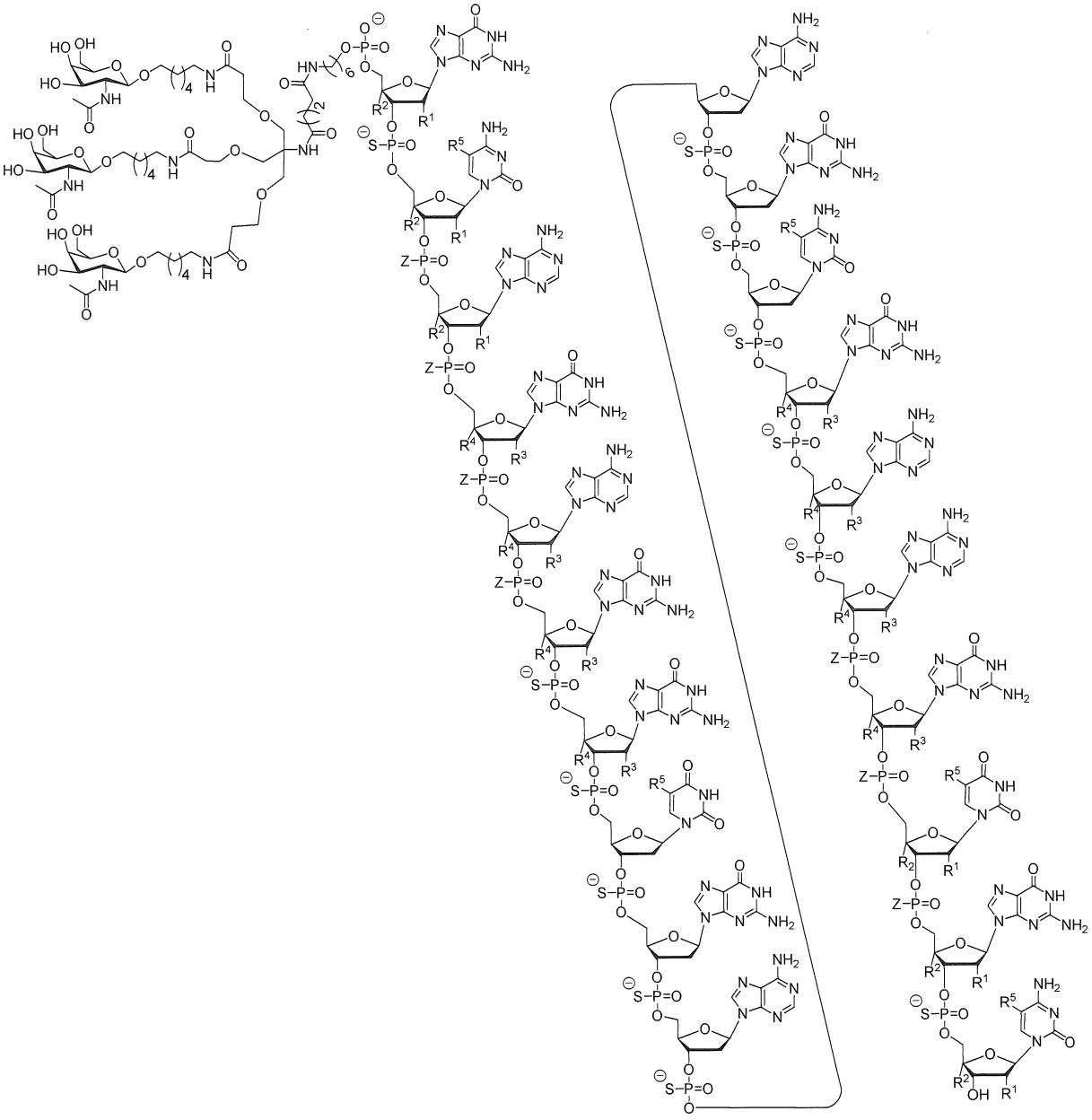
Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 712408 có công thức hóa học sau:



Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 695324 có công thức hóa học sau:



Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO: 3, 5'-GalNAc, và các cải biến hóa học như được thể hiện bởi công thức hóa học sau:



trong đó R^1 là $–OCH_2CH_2OCH_3$ (MOE) và R^2 là H; hoặc R^1 và R^2 cùng nhau tạo ra cầu, trong đó R^1 là –O- và R^2 là $–CH_2$-, $-CH(CH_3)$-, hoặc $-CH_2CH_2$-, và R^1 và R^2 được nối trực tiếp sao cho cầu thu được được chọn từ: $-O-CH_2$-, $-O-CH(CH_3)$-, và $–O-CH_2CH_2$-;

và đối với mỗi cặp R^3 và R^4 trên cùng nhân, một cách độc lập đối với mỗi nhân: R^3 được chọn từ H và $-OCH_2CH_2OCH_3$ và R^4 là H; hoặc R^3 và R^4 cùng nhau tạo ra cầu,

trong đó R^3 là –O-, và R^4 là $–CH_2$-, $-CH(CH_3)$-, hoặc $-CH_2CH_2$- và R^3 và R^4 được nối trực tiếp sao cho cầu thu được được chọn từ: $-O-CH_2$-, $-O-CH(CH_3)$-, và $–O-CH_2CH_2$-;

và R^5 được chọn từ H và $–CH_3$;

và Z được chọn từ S^- và O^-.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa đã bộc lộ trong WO 2012/145697, mà được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn, và nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa có trình tự nucleobazơ trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO 5 đến 310, 321 đến 802, 804 đến 1272, 1288 đến 1350, 1364 đến 1372, 1375, 1376, và 1379 đã bộc lộ trong WO 2012/145697 và nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa đã bộc lộ trong WO 2011/047312, mà được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn, và nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa có trình tự nucleobazơ trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO 14 đến 22 đã bộc lộ trong WO 2011/047312 và nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa đã bộc lộ trong WO 2012/145674, mà được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn, và nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa có trình tự nucleobazơ trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO 18 đến 35 đã bộc lộ trong WO 2012/145674. Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa sợi đôi oligonucleotit đã bộc lộ trong WO 2013/159109, mà được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn, và nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa sợi đôi oligonucleotit trong đó một sợi có trình tự nucleobazơ trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO 30 đến 125 đã bộc lộ trong WO 2013/159109. Các trình tự nucleobazơ của tất cả trong SEQ ID NO trình tự nêu trên được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các chỉ định điều trị bệnh HBV

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic HBV để điều biến mức độ biểu

hiện HBV ở đối tượng. Theo các phương án nhất định, sự thể hiện HBV được giảm.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic HBV trong dược phẩm để điều trị bệnh cho đối tượng. Theo các phương án nhất định, đối tượng có bệnh liên quan đến HBV. Theo các phương án nhất định, bệnh liên quan đến HBV bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhiễm HBV mạn tính, bệnh viêm, chứng xơ hóa, bệnh xơ gan, bệnh ung thư gan, bệnh viêm gan huyết thanh, bệnh vàng da, bệnh ung thư gan, gan viêm, chứng xơ hóa gan, bệnh xơ gan, gan suy nhược, bệnh viêm gan tế bào khuyếch tán, hội chứng thực huyết, bệnh viêm gan huyết thanh, và virut huyết HBV. Theo các phương án nhất định, bệnh liên quan đến HBV có thể có các triệu chứng có thể bao gồm triệu chứng bất kỳ hoặc toàn bộ các triệu chứng sau: trạng thái đau ốm dạng cúm, thể trạng yếu, các cơn đau, bệnh đau đầu, sốt, mất ngon, bệnh tiêu chảy, bệnh vàng da, chứng buồn nôn và nôn, đau toàn bộ diện tích gan của cơ thể, đi ngoài phân màu đất sét hoặc màu xám, ngứa toàn thân, và nước tiểu màu sẫm, khi được liên hợp với thử nghiệm dương tính đối với sự có mặt của virut gây bệnh viêm gan B, kháng nguyên virut bệnh viêm gan B, hoặc thử nghiệm dương tính đối với sự có mặt của kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên virut bệnh viêm gan B. Theo các phương án nhất định, đối tượng gặp nguy cơ đối với bệnh liên quan đến HBV. Đối tương này bao gồm đối tượng có một hoặc nhiều yếu tố nguy cơ để phát triển bệnh liên quan đến HBV, bao gồm tiếp xúc tình dục với cá thể đã nhiễm virut gây bệnh viêm gan B, sống trong cùng nhà như cá thể có nhiễm virut gây bệnh viêm gan B suốt đời, tiếp xúc với người máu đã nhiễm virut gây bệnh viêm gan B, tiêm các thuốc không hợp pháp, là người mắc bệnh máu loãng khó đông, và thăm viếng vùng mà bệnh viêm gan B là phổ biến. Theo các phương án nhất định, đối tượng đã được xác định là đối tượng có nhu cầu điều trị bệnh liên quan đến HBV.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp giảm ADN của HBV và/hoặc lượng kháng nguyên HBV ở động vật đã được chuyển nhiễm với HBV bao gồm việc dùng cho động vật hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic HBV. Theo các phương án nhất định, kháng nguyên là HBsAG hoặc HBeAG. Theo các phương án nhất định, lượng kháng nguyên HBV có thể được giảm đủ để gây ra sự chuyển đổi huyết thanh.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic HBV trong việc bào chế thuốc.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic HBV, hoặc muối dược dụng của chúng, để dùng trong điều trị.

Các phương án nhất định, sáng chế đề xuất hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic HBV để dùng trong việc điều trị bệnh liên quan đến HBV. Bệnh liên quan đến HBV bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhiễm HBV mạn tính, bệnh viêm, chứng xơ hóa, bệnh xơ gan, bệnh ung thư gan, bệnh viêm gan huyết thanh, bệnh vàng da, bệnh ung thư gan, gan viêm, chứng xơ hóa gan, bệnh xơ gan, gan suy nhược, bệnh viêm gan tế bào khuyếch tán, hội chứng thực huyết, bệnh viêm gan huyết thanh, và huyết virut HBV.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic HBVđể dùng trong làm giảm ADN của HBV và/hoặc lượng kháng nguyên HBV ở động vật đã được chuyển nhiễm với HBV bao gồm việc dùng cho động vật hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic HBV. Theo các phương án nhất định, kháng nguyên là HBsAG hoặc HBeAG. Theo các phương án nhất định, lượng kháng nguyên HBV có thể được giảm đủ để gây ra sự chuyển đổi huyết thanh.

Cần phải hiểu rằng hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng trong các phương pháp và việc sử dụng nêu trên. Ví dụ, theo các phương án nhất định hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic HBV trong các phương pháp và việc sử dụng nêu trên có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 11; hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 1 chứa trình tự nucleobazơ trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 11; hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 505358, ISIS 509934, ISIS 510100, ISIS 552023, ISIS 552024, ISIS 552032, ISIS 552859, ISIS 552925, hoặc ISIS 577119 và nhóm tiếp hợp; hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa đã bộc lộ trong WO 2012/145697, mà được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách

viện dẫn, và nhóm tiếp hợp; hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa có trình tự nucleobazơ trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO 5 đến 310, 321 đến 802, 804 đến 1272, 1288 đến 1350, 1364 đến 1372, 1375, 1376, và 1379 đã bộc lộ trong WO 2012/145697 và nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này; hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa có trình tự nucleobazơ trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO 14 đến 22 đã bộc lộ trong WO 2011/047312 và nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này; hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa có trình tự nucleobazơ trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO 18 đến 35 đã bộc lộ trong WO 2012/145674; hoặc hợp chất chứa sợi đôi oligonucleotit trong đó một sợi có trình tự nucleobazơ trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO 30 đến 125 đã bộc lộ trong WO 2013/159109.

2. Transthyretin (TTR)

TTR (còn được gọi là tiền albumin, tăng thytoxin huyết, rối loạn tiền albumin huyết, thyroxin; chứng thoái hóa dạng tinh bột đường nội hấp lão suy, bệnh đa thần kinh amyloit, chứng thoái hóa dạng tinh bột I, PALB; rối loạn transthyretin huyết, HST2651; TBPA; rối loạn tiền albumin huyết tăng thyroxin huyết tuyến giáp) là protein trong huyết thanh/huyết tương và dịch não tủy chịu trách nhiệm về việc vận chuyển thyroxin và retinol (Sakaki et al, Mol Biol Med. 1989, 6:161-8). Về mặt cấu trúc, TTR là homotetrame; đột biến điểm và gập lỗi protein nên dẫn đến lắng đọng sợi amyloit và đến các rối loạn bệnh lý liên quan, như chứng thoái hóa dạng tinh bột qua đường nội hấp lão suy (SSA), bệnh đa thần kinh amyloit di truyền (FAP), và bệnh tim amyloit di truyền (FAC).

TTR chủ yếu được tổng hợp ở gan và dây đám rối màng mạch não và, ở mức độ thấp hơn, bởi võng mạc ở người (Palha, *Clin Chem Lab Med,* 2002, *40*, 1292-1300). Transthyretin mà được tổng hợp ở gan được tiết vào máu, trong khi transthyretin bắt nguồn từ dây đám rối màng mạch được để dành riêng cho CSF. Trong dây đám rối màng mạch, transthyretin tổng hợp thể hiện khoảng 20% tổng quy trình tổng hợp protein tại chỗ và nhiều đến 25% tổng CSF (đickson *et al.*, *J Biol Chem,* 1986, *261*, 3475-3478).

Với sự sẵn có của các thử nghiệm chẩn đoán theo cách di truyền và hóa miễn dịch mô, các bệnh nhân mắc chứng thoái hóa dạng tinh bột TTR đã được thấy ở nhiều dân tộc

trên thế giới. Các nghiên cứu gần đây cho thấy rằng TTR chứng thoái hóa dạng tinh bột không phải là bệnh dịch hiểm trên đây, và có thể tác động đến 25% dân cư cao tuổi (Tanskanen et al, Ann Med. 2008;40(3):232-9).

Ở mức độ sinh hóa, TTR được xác định là thành phần protein chính trong các lớp lắng đọng dạng tinh bột của các bệnh nhân FAP (Costa et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978, **75**:4499–4503) và sau đó, thế methionin đối với valin ở vị trí 30 protein được phát hiện là lỗi phân tử phổ biến nhất gây ra bệnh này (Saraiva et al, *J. Clin. Invest.* 1984, **74**: 104–119). Ở FAP, đường nội hấp TTR nhiều lắng đọng ngoại bào, kết tụ và sợi amyloit xảy ra trong toàn bộ mô liên kết, đặc biệt là ở hệ thần kinh ngoại biên (Sousa and Saraiva, *Prog. Neurobiol.* 2003, **71**: 385–400). Sau khi biểu hiện TTR, xảy ra quá trình thoái biến, bắt đầu ở các sợi không myelin hóa và sợi đã được myelin hóa có đường kính bé, và cuối cùng dẫn đến mất nơron ở nhiều vị trị.

TTR hướng đích các hợp chất đối nghĩa đã nêu trên đã được bộc lộ trong US2005/0244869, WO2010/017509, và WO2011/139917, mỗi được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn. TTR hướng đích gen đối nghĩa oligonucleobazơ, ISIS-TTR_{Rx}, hiện có trong thử nghiệm lâm sàng pha 2/3 để nghiên cứu tác dụng của nó trong việc điều trị đối tượng mắc bệnh đa thần kinh amyloit di truyền. Tuy nhiên, cần cung cấp thêm cho bệnh nhân một hoặc nhiều phương án điều trị bệnh hiệu quả.

Các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp nhất định được hướng đích đến axit nucleic TTR

Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic TTR có trình tự của GENBANK® số truy cập NM_000371.3, được đưa vào bản mô tả này như SEQ ID NO: 2. Theo một số phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 bổ trợ ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc cho trình tự SEQ ID NO: 2.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 12 đến 19. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa

đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa trình tự nucleobazơ của một trong số trình tự SEQ ID NO: 12 đến 19.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 12. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 12.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 13. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 13.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 14. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 14.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 15. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 15.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 16 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 78. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 16 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 78.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 17. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 17.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 18. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 18.

Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự SEQ ID NO: 19. Theo các phương án nhất định, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa trình tự nucleobazơ của trình tự SEQ ID NO: 19.

Bảng 3: Các hợp chất đối nghĩa được hướng đích đến TTR SEQ ID NO: 2

Số ISIS	Vị trí bắt đầu đích	Trình tự (5'-3')	Kiểu	SEQ ID NO
420915	508	TCTTGGTTACATGAAATCCC	eeeeeddddddddddeeeee	12
304299	507	CTTGGTTACATGAAATCCCA	eeeeeddddddddddeeeee	13
420921	515	GGAATACTCTTGGTTACATG	eeeeeddddddddddeeeee	14
420922	516	TGGAATACTCTTGGTTACAT	eeeeeddddddddddeeeee	15
420950	580	TTTTATTGTCTCTGCCTGGA	eeeeeddddddddddeeeee	16
420955	585	GAATGTTTTATTGTCTCTGC	eeeeeddddddddddeeeee	17
420957	587	AGGAATGTTTTATTGTCTCT	eeeeeddddddddddeeeee	18
420959	589	ACAGGAATGTTTTATTGTCT	eeeeeddddddddddeeeee	19

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 420915 và nhóm tiếp hợp. ISIS 420915 là oligonucleotit cải biến có công thức sau: Tes mCes Tes Tes Ges Gds Tds Tds Ads mCds Ads Tds Gds Ads Ads Aes Tes mCes mCes mCe, trong đó:

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 304299 và nhóm tiếp hợp. ISIS 304299 là oligonucleotit cải biến có công thức sau: mCes Tes Tes

Ges Ges Tds Tds Ads mCds Ads Tds Gds Ads Ads Ads Tes mCes mCes mCes Ae, trong đó:

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 420921 và nhóm tiếp hợp. ISIS 420921 là oligonucleotit cải biến có công thức sau: Ges Ges Aes Aes Tes Ads mCds Tds mCds Tds Tds Gds Gds Tds Tds Aes mCes Aes Tes Ge, trong đó:

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 420922 và nhóm tiếp hợp. ISIS 420922 là oligonucleotit cải biến có công thức sau: Tes Ges Ges Aes Aes Tds Ads mCds Tds mCds Tds Tds Gds Gds Tds Tes Aes mCes Aes Te, trong đó:

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 420950 và nhóm tiếp hợp. ISIS 420950 là oligonucleotit cải biến có công thức sau: Tes Tes Tes Tes Aes Tds Tds Gds Tds mCds Tds mCds Tds Gds mCds mCes Tes Ges Ges Ae, trong đó:

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 420955 và nhóm tiếp hợp. ISIS 420955 là oligonucleotit cải biến có công thức sau: Ges Aes Aes Tes Ges Tds Tds Tds Tds Ads Tds Tds Gds Tds mCds Tes mCes Tes Ges mCe, trong đó:

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 420957 và nhóm tiếp hợp. ISIS 420957 là oligonucleotit cải biến có công thức sau:Aes Ges Ges Aes Aes Tds Gds Tds Tds Tds Tds Ads Tds Tds Gds Tes mCes Tes mCes Te, trong đó:

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 420959 và nhóm tiếp hợp. ISIS 420959 là oligonucleotit cải biến có công thức sau:Aes mCes Aes Ges Ges Ads Ads Tds Gds Tds Tds Tds Tds Ads Tds Tes Ges Tes mCes Te, trong đó:

A = ađenin,

mC = 5'-metylxytosin

G = guanin,

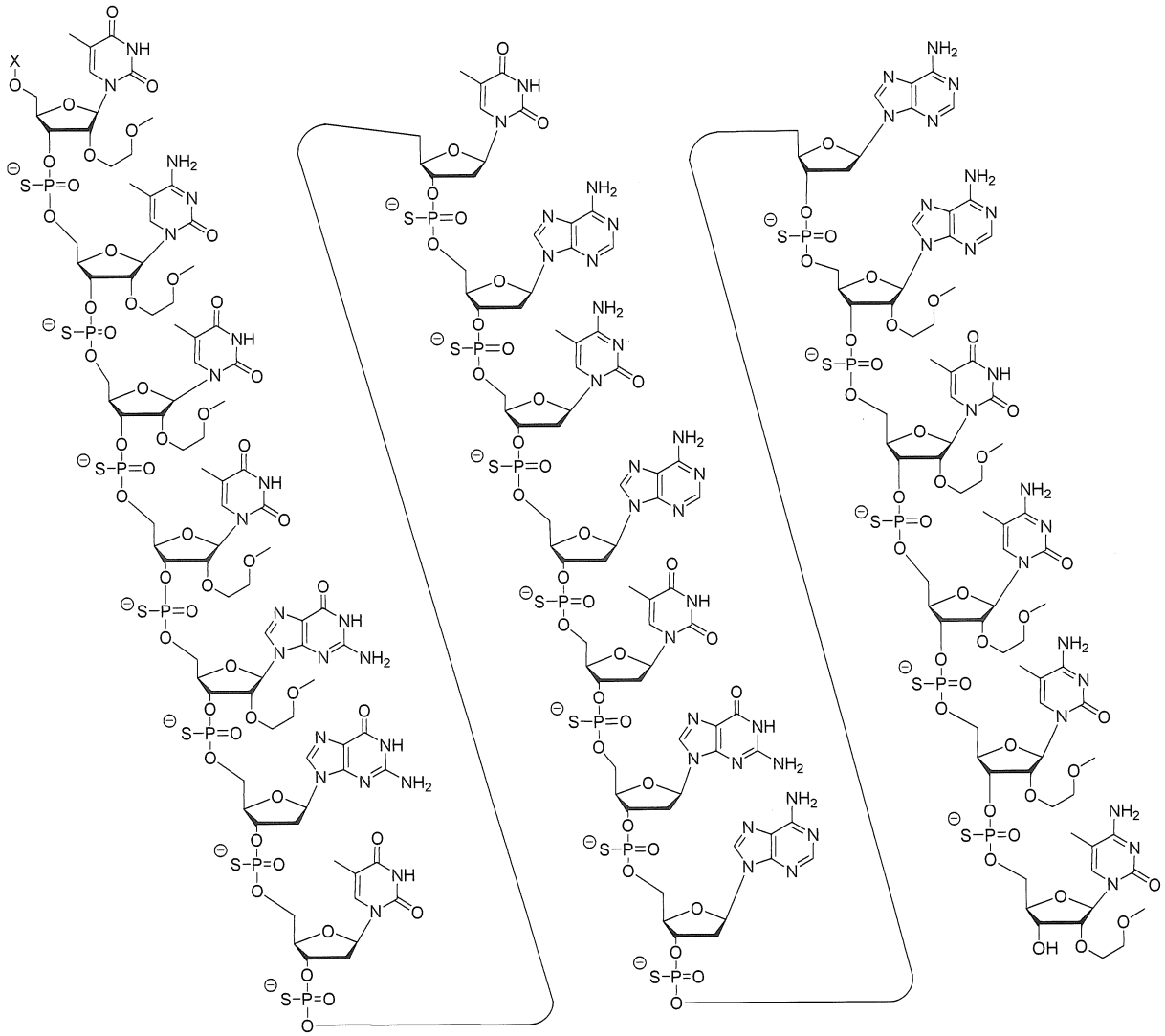
T = thymin,

e = 2'-O-metoxyetyl nucleosit được cải biến,

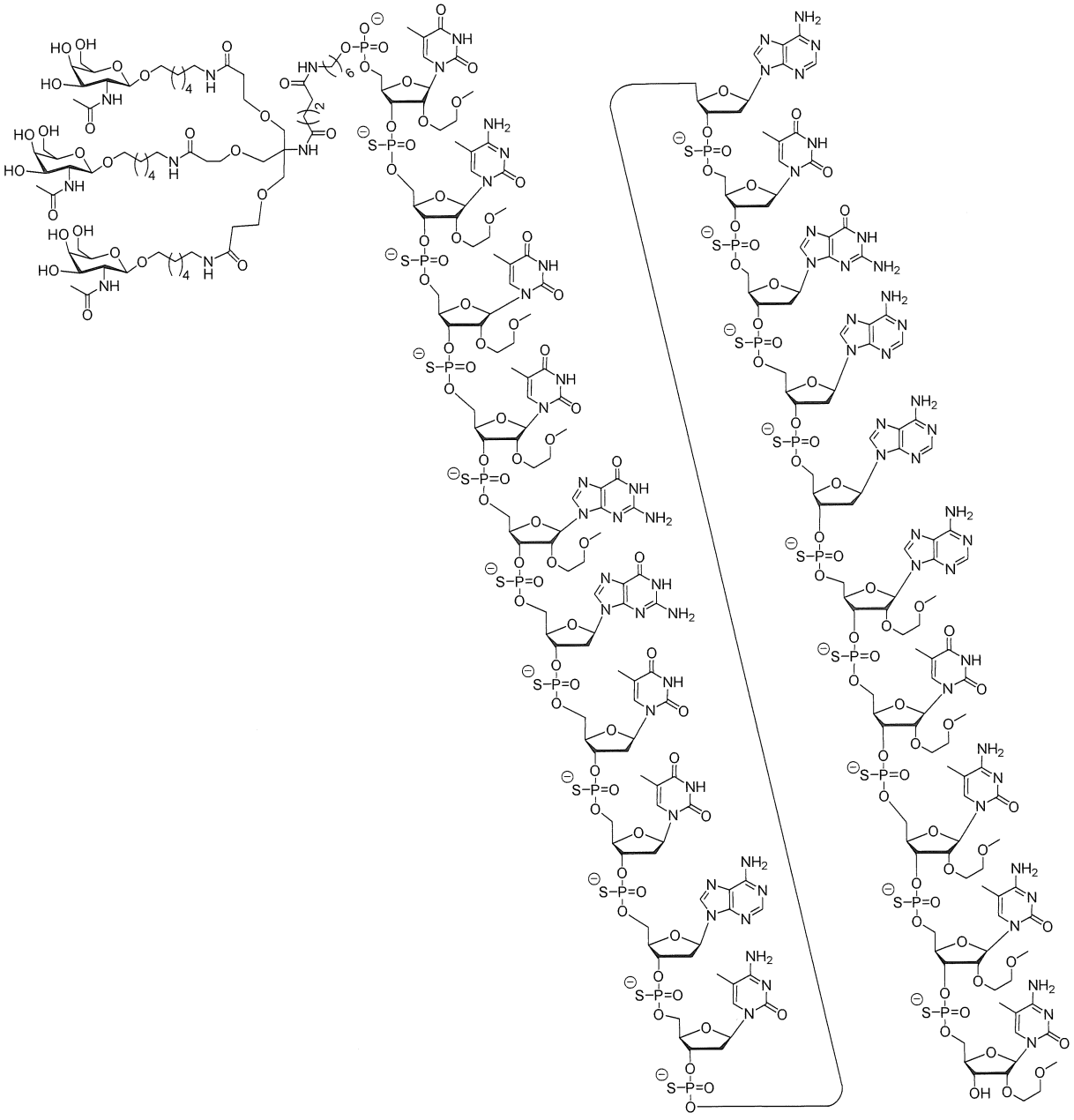
d = đeoxynucleosit 2', và

s = liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

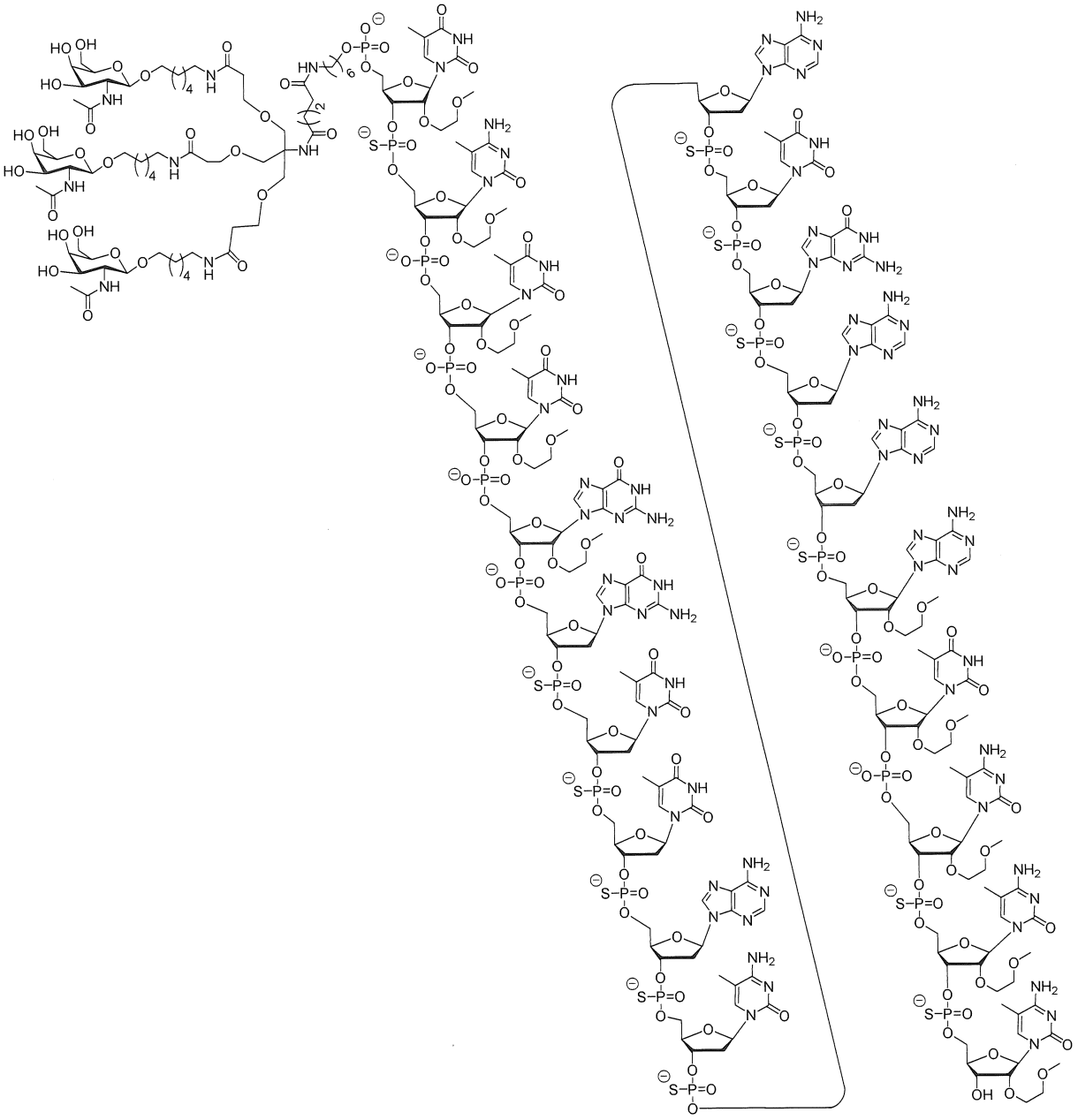
Theo các phương án nhất định, hợp chất có công thức hóa học sau chứa hoặc bao gồm ISIS 420915 có X ở vị trí 5', trong đó X là nhóm tiếp hợp như được bộc lộ trong bản mô tả này:



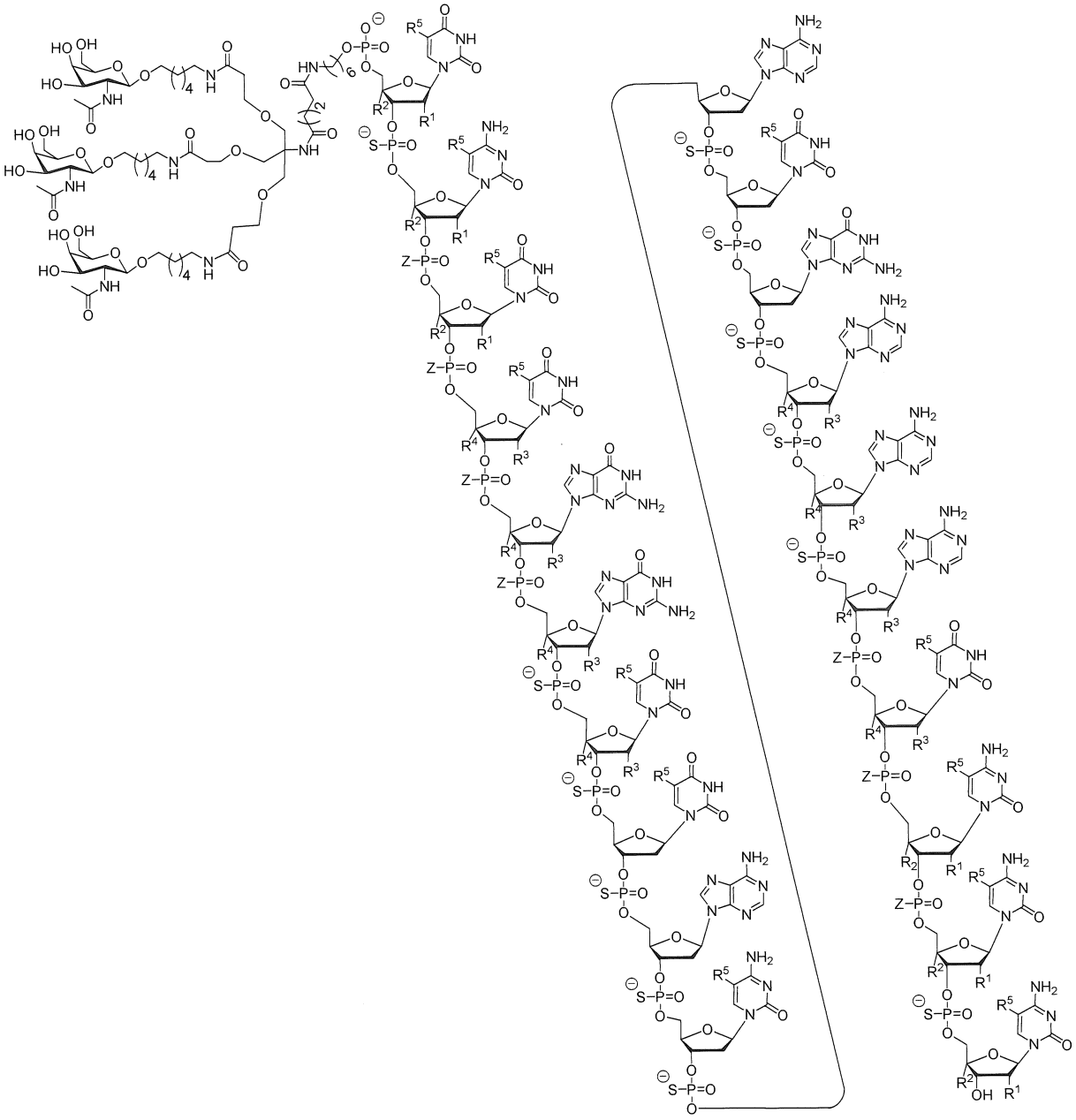
Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 682877 có công thức hóa học sau:



Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 682884 có công thức hóa học sau:



Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO: 12, 5'-GalNAc, và các cải biến hóa học như được thể hiện bởi công thức hóa học sau:



trong đó R^1 là $–OCH_2CH_2OCH_3$ (MOE) và R^2 là H; hoặc R^1 và R^2 cùng nhau tạo ra cầu, trong đó R^1 là –O- và R^2 là $–CH_2$-, $-CH(CH_3)$-, hoặc $-CH_2CH_2$-, và R^1 và R^2 được nối trực tiếp sao cho cầu thu được được chọn từ: $-O-CH_2$-, $-O-CH(CH_3)$-, và $–O-CH_2CH_2$-;

và đối với mỗi cặp R^3 và R^4 trên cùng nhân, một cách độc lập đối với mỗi nhân: R^3 được chọn từ H và $-OCH_2CH_2OCH_3$ và R^4 là H; hoặc R^3 và R^4 cùng nhau tạo ra cầu,

trong đó R^3 là –O-, và R^4 là $–CH_2$-, $-CH(CH_3)$-, hoặc $-CH_2CH_2$- và R^3 và R^4 được nối trực tiếp sao cho cầu thu được được chọn từ: $-O-CH_2$-, $-O-CH(CH_3)$-, và $–O-CH_2CH_2$-;

và R^5 được chọn từ H và $–CH_3$;

và Z được chọn từ S^- và O^-.

Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa đã bộc lộ trong WO 2011/139917 hoặc US 8,101,743, mà nội dung của chúng được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn, và nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa có trình tự nucleobazơ trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO 8 đến 160, 170 đến 177 đã bộc lộ trong WO 2011/139917 và nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa có trình tự nucleobazơ trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO 12 đến 89 đã bộc lộ trong patent Mỹ số US 8,101,743 và nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa có trình tự nucleobazơ bổ trợ cho phân đoạn đích được ưu tiên trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO 90 đến 133 đã bộc lộ trong patent Mỹ số US 8,101,743 và nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Các trình tự nucleobazơ của tất cả referenced SEQ ID NO viện dẫn nêu trên được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các chỉ định điều trị bệnh TTR

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp sử dụng hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic TTR để điều biến mức độ biểu hiện TTR ở đối tượng. Theo các phương án nhất định, mức độ biểu hiện TTR giảm.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp sử dụng hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic TTR trong dược phẩm để điều trị bệnh cho đối tượng. Theo các phương án nhất định, đối tượng có bệnh có liên quan transthyretin, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý, hoặc triệu chứng của chúng. Theo các phương án nhất định, bệnh có liên quan transthyretin, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là chứng thoái hóa dạng tinh bột transthyretin. "chứng thoái hóa dạng tinh bột có liên quan đến transthyretin" hoặc "chứng thoái hóa dạng tinh bột transthyretin" hoặc "bệnh amyloit transthyretin", như được dùng trong bản mô tả này, là bệnh lý bất kỳ hoặc bệnh liên quan đến loạn chức năng hoặc rối loạn điều biến của transthyretin mà gây ra hình thành các sợi

amyloit chứa transthyretin. Chứng thoái hóa dạng tinh bột transthyretin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chứng thoái hóa dạng tinh bột TTR di truyền, chứng thoái hóa dạng tinh bột ở màng não tủy, bệnh đa thần kinh amyloit di truyền (familial amyloid polyneuropahy - FAP), bệnh cơ tim amyloit di truyền, bệnh thoái hóa dạng tinh bột mắt não tủy di truyền, chứng thoái hóa dạng tinh bột ở tim do lão suy, hoặc chứng thoái hóa dạng tinh bột qua đường nội hấp lão suy.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp sử dụng hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic TTR trong việc bào chế thuốc.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic TTR, hoặc muối dược dụng của chúng, để dùng trong điều trị.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic TTR để dùng trong việc điều trị bệnh có liên quan transthyretin, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý, hoặc triệu chứng của chúng. Theo các phương án nhất định, bệnh có liên quan transthyretin, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý là chứng thoái hóa dạng tinh bột transthyretin.

Cần phải hiểu rằng hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất theo sáng chế có thể được dùng trong các phương pháp và việc sử dụng nêu trên. Ví dụ, theo các phương án nhất định hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến axit nucleic TTR trong các phương pháp và việc sử dụng nêu trên có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa ít nhất 8 trình tự nucleobazơ liên tục trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 12 đến 19; hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp được hướng đích đến SEQ ID NO: 2 chứa trình tự nucleobazơ của một trong số trình tự SEQ ID NO: 12 đến 19; hợp chất chứa hoặc bao gồm ISIS 420915, ISIS 304299, ISIS 420921, ISIS 420922, ISIS 420950, ISIS 420955, ISIS 420957, hoặc ISIS 420959 và nhóm tiếp hợp; hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa đã bộc lộ trong WO 2011/139917 hoặc US 8,101,743, mà nội dung của chúng được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn, và nhóm tiếp hợp; hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa có trình tự nucleobazơ trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO 8 đến 160,

170 đến 177 đã bộc lộ trong WO 2011/139917 và nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này; oligonucleotit đối nghĩa có trình tự nucleobazơ trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO 12 đến 89 đã bộc lộ trong patent Mỹ số US 8,101,743 và nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này; hoặc hợp chất chứa oligonucleotit đối nghĩa có trình tự nucleobazơ bổ trợ cho phân đoạn đích được ưu tiên trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO 90 đến 133 đã bộc lộ trong patent Mỹ số US 8,101,743 và nhóm tiếp hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Các trình tự nucleobazơ của tất cả các SEQ ID NO nêu trên được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

E. Một số dược phẩm nhất định

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các dược phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất đối nghĩa. Theo các phương án nhất định, dược phẩm này chứa chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng thích hợp. Theo các phương án nhất định, dược phẩm chứa dung dịch nước muối vô trùng và một hoặc nhiều hợp chất đối nghĩa. Theo các phương án nhất định, dược phẩm này bao gồm dung dịch nước muối vô trùng và một hoặc nhiều hợp chất đối nghĩa. Theo các phương án nhất định, nước muối vô trùng là nước muối loại dùng cho dược phẩm. Theo các phương án nhất định, dược phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất đối nghĩa và nước vô trùng. Theo các phương án nhất định, dược phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất đối nghĩa và nước vô trùng. Theo các phương án nhất định, nước muối vô trùng là nước loại dùng cho dược phẩm. Theo các phương án nhất định, dược phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất đối nghĩa và nước muối đệm phosphat (PBS). Theo các phương án nhất định, dược phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất đối nghĩa và nước muối đệm phosphat vô trùng (PBS). Theo các phương án nhất định, nước muối vô trùng là PBS loại dùng cho dược phẩm.

Theo các phương án nhất định, các hợp chất đối nghĩa có thể được trộn với các chất hoạt tính và/hoặc trơ dược dụng để bào chế các dược phẩm hoặc các chế phẩm. Các dược phẩm và các phương pháp để bào chế các dược phẩm phụ thuộc vào nhiều tiêu chí, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đường dùng, mức độ bệnh, hoặc liều lượng sẽ được dùng.

Các dược phẩm chứa các hợp chất đối nghĩa bao gồm các muối dược dụng bất kỳ, các este, hoặc các muối của các este này. Theo các phương án nhất định, các dược phẩm

chứa các hợp chất đối nghĩa bao gồm một hoặc nhiều oligonucleotit mà, sau khi dùng cho động vật, kể cả người, có khả năng tạo ra (trực tiếp hoặc gián tiếp) chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học hoặc cặn của chúng. Do đó, ví dụ, bản mô tả này còn mô tả các muối dược dụng của các hợp chất đối nghĩa, các tiền dược chất, các muối dược dụng của các tiền dược chất này, và chất tương đương về mặt sinh học khác. Các muối dược dụng thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, muối natri và muối kali.

Tiền dược chất có thể bao gồm các nucleosit bổ sung kết hợp ở một hoặc cả hai đầu của oligonucleotit mà được phân cắt bởi các nucleaza nội sinh trong cơ thể, để tạo ra oligonucleotit đối nghĩa hoạt hóa.

Các gốc lipit đã được dùng trong các phép điều trị bằng axit nucleic trong nhiều loại phương pháp. Trong một vài phương pháp này, axit nucleic được đưa vào các liposom đã tạo ra trước hoặc lipoplex tạo ra bởi các hỗn hợp gồm cation lipit và các lipit trung tính. Trong một số phương pháp, các phức ADN có mono hoặc poly cation lipit được tạo ra không có lipit trung tính. Theo các phương án nhất định, gốc lipit được chọn để tăng mức độ phân phối dược chất đến tế bào hoặc mô cụ thể. Theo các phương án nhất định, gốc lipit được chọn để tăng mức độ phân phối dược chất đến mô mỡ. Theo các phương án nhất định, gốc lipit được chọn để tăng mức độ phân phối dược chất mô cơ.

Theo các phương án nhất định, các dược phẩm theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều oligonucleotit cải biến và một hoặc nhiều tá dược. Theo một số phương án nhất định, các tá dược được chọn từ nước, dung dịch muối, rượu, các polyetylen glycol, gelatin, lactoza, amylaza, magie stearat, talc, axit silixic, parafin nhớt, hyđroxymetylxenluloza và polyvinylpyroliđon.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế chứa hệ phân phối. Các ví dụ về hệ phân phối bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các liposom và nhũ tương. Các hệ phân phối nhất định là hữu dụng để bào chế một số dược phẩm bao gồm hệ chứa các hợp chất kỵ nước. Theo các phương án nhất định, các dung môi hữu cơ nhất định như đimetylsulfoxit được sử dụng.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế chứa một hoặc nhiều phân tử phân phối đặc hiệu đối với mô được thiết kế để phân phối một hoặc nhiều dược

chất theo sáng chế đến các loại tế bào hoặc mô cụ thể. Ví dụ, theo các phương án nhất định, các dược phẩm bao gồm các liposom được phủ bằng kháng thể đặc hiệu mô.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế chứa hệ đồng dung môi. Hệ nhất định trong số các hệ đồng dung môi này bao gồm, ví dụ, rượu benzylic, chất hoạt động bề mặt không phân cực, polyme hữu cơ trộn được với nước, và pha nước. Theo các phương án nhất định, hệ đồng dung môi được sử dụng cho các hợp chất kỵ nước. Ví dụ không mang tính giới hạn về như hệ đồng dung môi là hệ đồng dung môi VPD, mà là dung dịch chứa etanol tuyệt đối chứa 3% khối lượng/thể tích rượu benzylic, 8% khối lượng/thể tích không phân cực chất hoạt động bề mặt Polysorbate 80™ và 65% khối lượng/thể tích polyetylen glycol 300. Tỷ phần của các hệ đồng dung môi này có thể thay đổi một cách có tính toàn mà không làm thay đổi một cách đáng kể các tính chất về độ hòa tan và độc tính của chúng. Hơn thế nữa, nhận dạng đồng dung môi các thành phần có thể thay đổi: ví dụ, các chất hoạt động bề mặt khác có thể được sử dụng thay cho Polysorbate 80™; phân đoạn kích thước của polyetylen glycol có thể thay đổi; các polyme tương thích về mặt sinh học khác có thể thế cho polyetylen glycol, ví dụ, polyvinyl pyroliđon; và các đường khác hoặc các polysacarit có thể thế cho đextroza.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được bào chế để dùng qua đường miệng. Theo các phương án nhất định, các dược phẩm được bào chế để dùng theo đường đặt trong má.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm được bào chế để dùng bằng cách tiêm (ví dụ, qua đường tĩnh mạch, dưới da, tiêm bắp, v.v.). Theo các phương án nhất định này, dược phẩm chứa chất mang và được bào chế trong dung dịch nước, như nước hoặc các dung dịch đệm tương thích về mặt sinh lý học như dung dịch Hanks, dung dịch Ringer, hoặc dung dịch đệm nước muối sinh lý. Theo các phương án nhất định, các thành phần khác được bao gồm (ví dụ, các thành phần hỗ trợ trong việc độ hòa tan hoặc có tác dụng ở dạng chất bảo quản). Theo các phương án nhất định, có thể được dùng để tiêm các loại huyền phù được điều chế bằng cách sử dụng các chất mang lỏng, các tác nhân tạo huyền phù và các nhóm tương tự thích hợp. Một số dược phẩm để tiêm được thể hiện trong dạng liều đơn vị, ví dụ, trong ống thuốc tiêm hoặc trong vật chứa đa liều. Một số dược phẩm để tiêm là các loại huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương trong chất dẫn dầu hoặc

chất dẫn nước, và có thể chứa các tác nhân bào chế như tác nhân tạo huyền phù, tác nhân làm ổn định và/hoặc tác nhân phân tán. Một số dung môi thích hợp để dùng trong các dược phẩm để tiêm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ưa chất béo các dung môi và dầu béo, như dầu vừng, tổng hợp este của axit béo, như etyl oleat hoặc triglyxerit, và các liposom. Trong nước tiêm các loại huyền phù có thể chứa các chất mà làm tăng độ nhớt của huyền phù, như natri carboxymetyl xenluloza, sorbitol, hoặc đextran. Tùy ý, các loại huyền phù này còn có thể chứa thích hợp các chất làm ổn định hoặc các tác nhân mà làm tăng độ hòa tan của dược chất để cho phép để điều chế dung dịch có nồng độ cao.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm được bào chế để dùng qua màng nhầy. Theo phương án thực hiện nhất định này, các chất thấm thích hợp với rào cản cần được thấm qua được dùng trong chế phẩm. Nói chung, các chất thấm là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế chứa oligonucleotit với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh. Theo các phương án nhất định, lượng hữu hiệu để điều trị bệnh là đủ để ngăn ngừa, làm thuyên giảm hoặc làm giảm các triệu chứng bệnh hoặc để kéo dài sự sống của đối tượng được điều trị. Việc xác định lượng hữu hiệu để điều trị bệnh là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều oligonucleotit cải biến theo sáng chế được điều chế ở dạng tiền dược chất. Theo các phương án nhất định, khi dùng *in vivo*, tiền dược chất được chuyển hóa thành về mặt hóa học thành dạng hoạt động hơn về mặt chữa bệnh, dược phẩm, sinh hóc của oligonucleotit. Theo các phương án nhất định, các tiền dược chất là hữu ích vì chúng dễ dùng hơn so với các dạng hoạt hóa tương ứng. Ví dụ, trong một số trường hợp nhất định, tiền dược chất có thể khả dụng hơn về mặt sinh học (ví dụ, thông qua dùng qua đường miệng) so với dạng hoạt hóa tương ứng. Trong một số trường hợp nhất định, tiền dược chất có thể có độ hòa tan được cải thiện so với dạng hoạt hóa tương ứng. Theo các phương án nhất định, các tiền dược chất là ít hòa tan trong nước hơn so với dạng hoạt hóa tương ứng. Trong một số trường hợp nhất định, các tiền dược chất này có sự truyền tối ưu ngang qua màng tế bào, khi độ hòa tan trong nước là bất lợi đối với khả năng dịch chuyển. Theo các phương án nhất định, tiền dược chất là este. Theo một số phương án nhất định, este được thủy phân theo kiểu chuyển hóa để axit

carboxylic sau khi dùng. Trong một số trường hợp nhất định axit carboxylic chứa hợp chất ở dạng hoạt hóa tương ứng. Theo các phương án nhất định, tiền dược chất chứa peptit ngắn (polyaminoaxit) liên kết với axit nhóm. Theo các phương án nhất định này, peptit được tách sau khi dùng để tạo ra dạng hoạt hóa tương ứng.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các dược phẩm và các phương pháp giảm lượng hoặc hoạt tính của axit nucleic đích trong tế bào. Theo các phương án nhất định, tế bào nằm ở động vật. Theo các phương án nhất định, động vật là động vật có vú. Theo các phương án nhất định, động vật là động vật gặm nhấm. Theo các phương án nhất định, động vật là động vật linh trưởng. Theo các phương án nhất định, động vật là động vật linh trưởng không là người. Theo các phương án nhất định, động vật là người.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp dùng dược phẩm chứa oligonucleotit do sáng chế đề xuất cho động vật. Đường dùng thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, qua đường miệng, qua đường trực tràng, qua màng nhầy, qua ruột, trong ruột, khu trú, viên đặt hậu môn, thông qua xông/khí dung, nội tủy mạc, trong não thất, trong khoang màng bụng, trong mũi, trong mắt, trong khối u, và ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, qua đường tĩnh mạch, tiêm bắp, trong tủy sống, và dưới da). Theo các phương án nhất định, nội tủy mạc dược dụng được dùng để đạt được sự tiếp xúc cục bộ chứ không phải tiếp xúc hệ thống. Ví dụ, các dược phẩm có thể được tiêm một cách trực tiếp vào vùng hiệu quả mong muốn (ví dụ, vào trong gan).

Mô tả không giới hạn và đưa vào bằng cách viện dẫn

Mặc dù một số hợp chất, các dược phẩm và các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này đã được bộc lộ một cách cụ thể theo một số khía cạnh, các ví dụ sau chỉ nhằm minh họa các hợp chất theo sáng chế và không nhằm để giới hạn chúng. Mỗi các tài liệu viện dẫn, số truy cập GenBank , và các tài liệu tương tự trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn.

Một số hợp chất, các dược phẩm, và các phương pháp trong bản mô tả được bộc lộ như "chứa đúng" hoặc "có đúng" số cụ thể, bộ phận hoặc dấu hiệu cụ thể. Phần mô tả này được sử dụng để cho thấy rằng trong khi hợp chất này, dược phẩm, hoặc phương pháp có thể bao gồm các nguyên tố bổ sung khác, số lượng của bộ phận hoặc dấu hiệu cụ thể là số được nhận dạng. Ví dụ, "thể tiếp hợp chứa đúng một GalNAc" là thể tiếp hợp

mà chứa một và chỉ một GalNAc, mặc dù nó có thể chứa các nguyên tố khác ngoài một GalNAc.

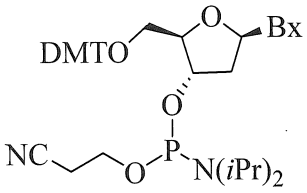
Mặc dù danh mục trình tự kèm theo bản mô tả này nhận dạng mỗi trình tự như "ARN" hoặc "ADN" nếu cần, trên thực tế, các trình tự này có thể được cải biến bằng tổ hợp bất kỳ gồm các biến đổi về mặt hóa học. Rõ ràng rằng, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết tên gọi này như "ARN" hoặc "ADN" để mô tả các oligonucleotit cải biến, trong một số trường hợp nhất định, là tùy ý. Ví dụ, oligonucleotit chứa nucleosit chứa gốc đường 2'-OH và bazơ thymin có thể đã được mô tả là ADN có đường được cải biến (2'-OH đối với 2'-H tự nhiên của ADN) hoặc như ARN có bazơ được cải biến (thymin (uraxil metyl hóa) đối với uraxil tự nhiên của ARN).

Do đó, các trình tự axit nucleic theo sáng chế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự trong danh mục trình tự, được dự định để bao gồm các axit nucleic chứa tổ hợp bất kỳ gồm ARN và/hoặc ADN tự nhiên hoặc được cải biến, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit nucleic có được các nucleobazơ được cải biến. Bằng cách làm ví dụ khác mà không giới hạn ở, oligonucleotit có trình tự nucleobazơ "ATCGATCG" bao hàm các oligonucleotit bất kỳ có trình tự nucleobazơ này, cho dù được cải biến hoặc không được cải biến, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hợp chất chứa các bazơ ARN, như các hợp chất có trình tự "AUCGAUCG" và các hợp chất có một số bazơ ADN và một số bazơ ARN như "AUCGATCG" và các oligonucleotit có các bazơ được cải biến khác, như "AT^{me}CGAUCG, trong đó ^{me}C biểu thị ba zơ xytosin chứa nhóm metyl ở vị trí 5.

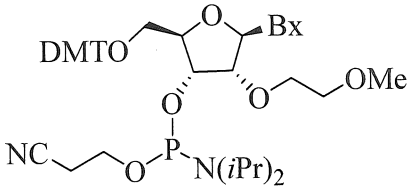
Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau minh họa các phương án nhất định của sáng chế và là không nhằm mục đích giới hạn. Hơn thế nữa, khi các phương án cụ thể được mô tả, các tác giả sáng chế đã dự tính đến việc sử dụng chung của các phương án cụ thể này. Ví dụ, phần mô tả oligonucleotit có kiểu cụ thể đề cập đến sự hỗ trợ hợp lý đối với các oligonucleotit bổ sung có cùng kiểu hoặc kiểu tương tự. Ví dụ, khi cải biến có ái lực cao cụ thể xuất hiện ở vị trí cụ thể, các cải biến có ái lực cao khác ở cùng vị trí được xem là thích hợp, trừ khi có quy định khác.

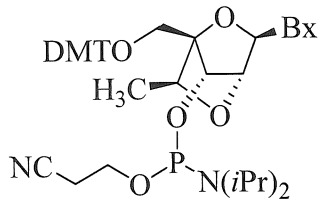
Ví dụ 1: Phương pháp chung để điều chế các phosphoramiđit, các hợp chất có công thức 1, 1a và 2



1



1a

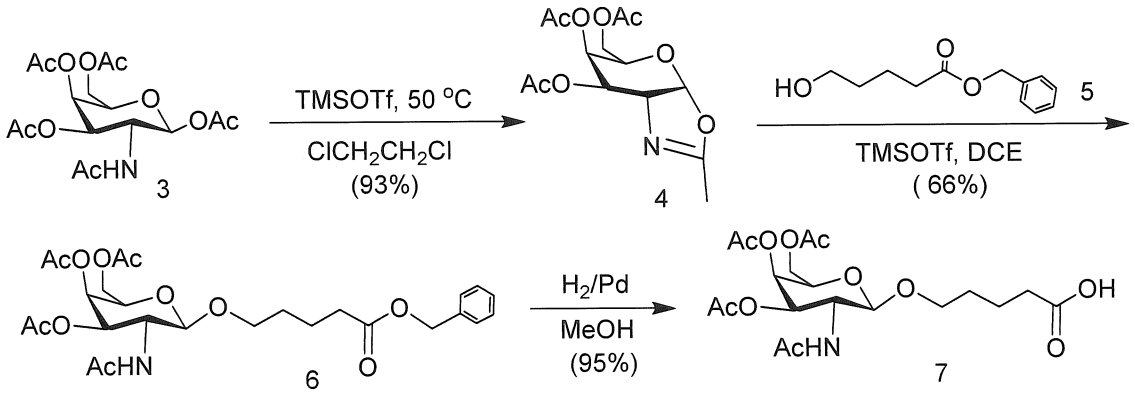


2

Bx là bazơ dị vòng;

Các hợp chất có công thức 1, 1a và 2 được điều chế theo các quy trình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như đã được bộc lộ trong bản mô tả này (xem tài liệu Seth *et al.*, Bioorg. Med. Chem., 2011, 21(4), 1122-1125, *J. Org. Chem.*, 2010, 75(5), 1569 đến 1581, Nucleic Acids Symposium Series, 2008, 52(1), 553-554); và xem các công bố đơn (WO 2011/115818, WO 2010/077578, WO2010/036698, WO2009/143369, WO 2009/006478, và WO 2007/090071), và Patent Mỹ số 7,569,686).

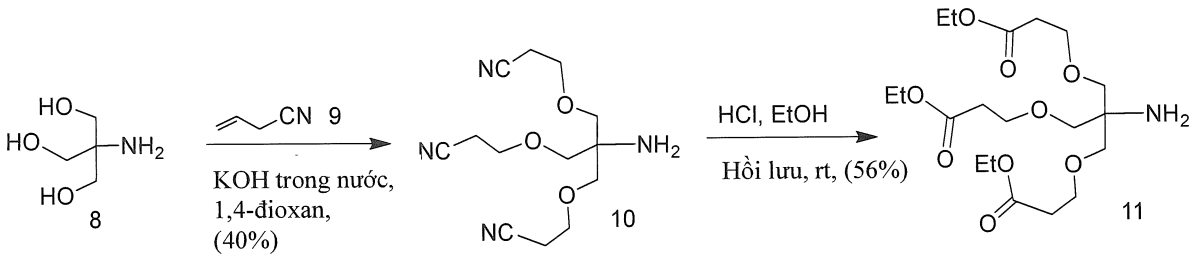
Ví dụ 2: Điều chế hợp chất có công thức 7



3 4 5 6 7

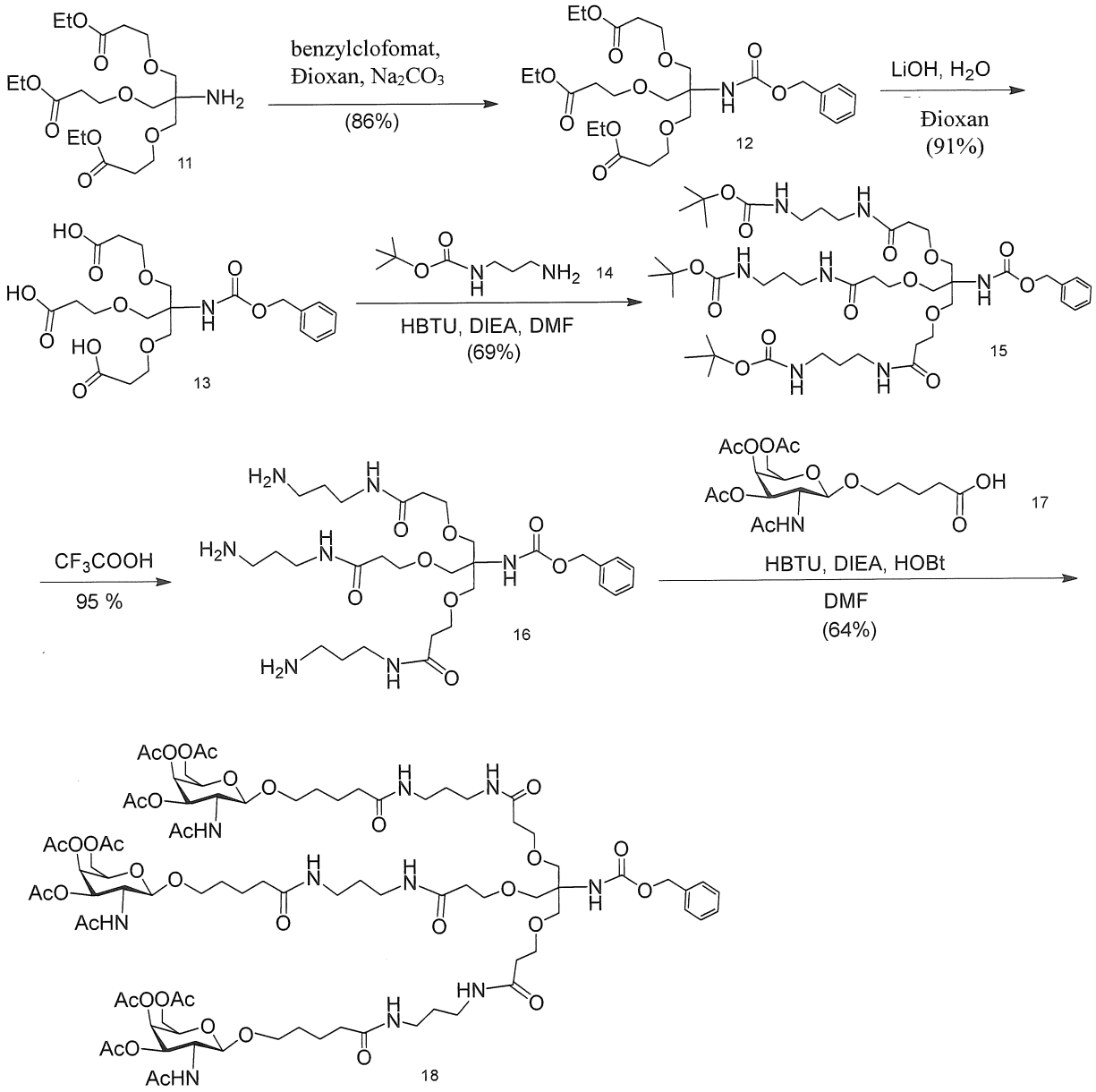
Các hợp chất có công thức 3 (2-axetamiđo-1,3,4,6-tetra-*O*-axetyl-2-đeoxy-β-Dgalactopyranoza hoặc galactosamin pentaaxetat) có bán trên thị trường. Hợp chất có công thức 5 được điều chế theo các quy trình đã được công bố (Weber *et al., J. Med. Chem.*, 1991, *34*, 2692).

Ví dụ 3: Điều chế hợp chất có công thức 11



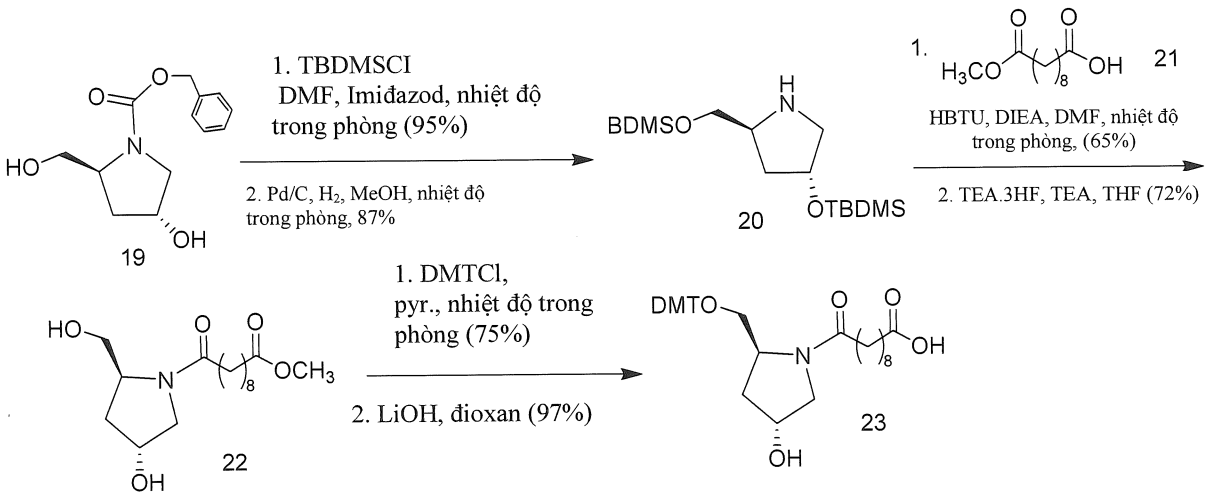
Các hợp chất có công thức 8 và 9 có thể mua được trên thị trường.

Ví dụ 4: Điều chế hợp chất có công thức 18



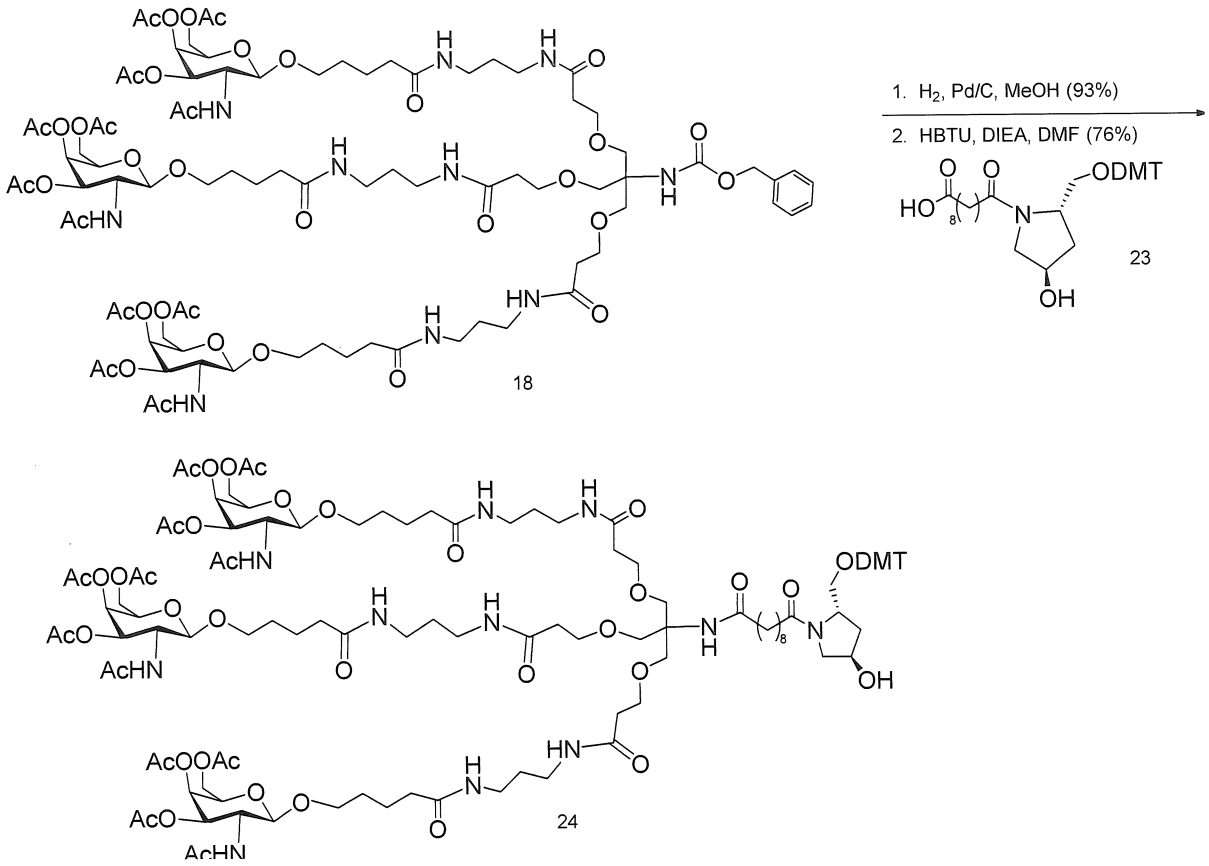
Hợp chất có công thức 11 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 3. Hợp chất có công thức 14 có bán trên thị trường. Hợp chất có công thức 17 được điều chế bằng cách áp dụng các quy trình tương tự được thông báo bởi Rensen *et al., J. Med. Chem.,* 2004, *47,* 5798-5808.

Ví dụ 5: Điều chế hợp chất có công thức 23



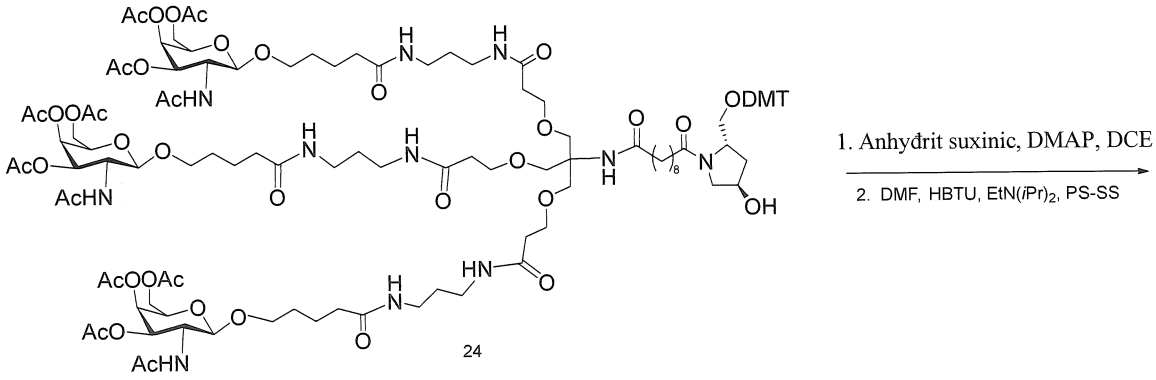
Các hợp chất có công thức 19 và 21 có thể mua được trên thị trường.

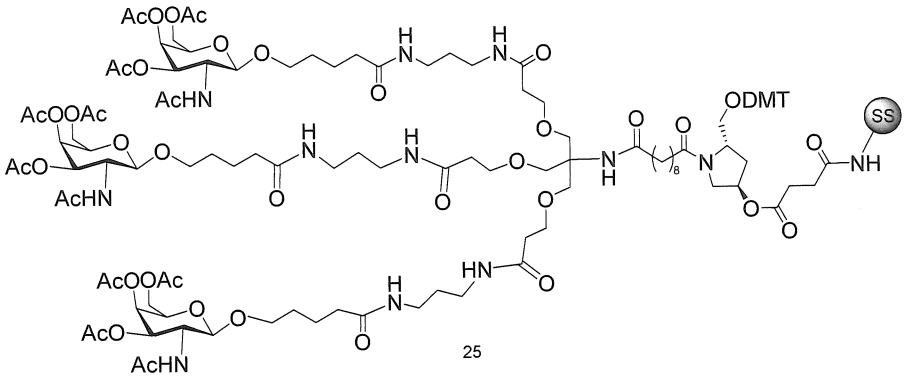
Ví dụ 6: Điều chế hợp chất có công thức 24



Các hợp chất có công thức 18 và 23 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 4 và Ví dụ 5.

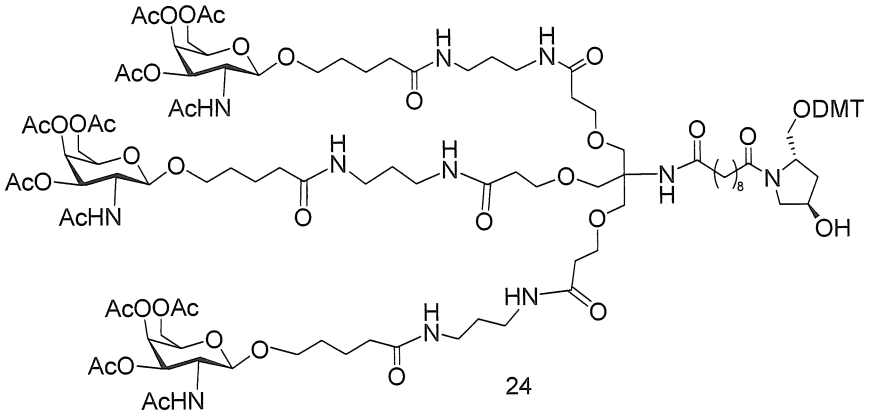
Ví dụ 7: Điều chế hợp chất có công thức 25



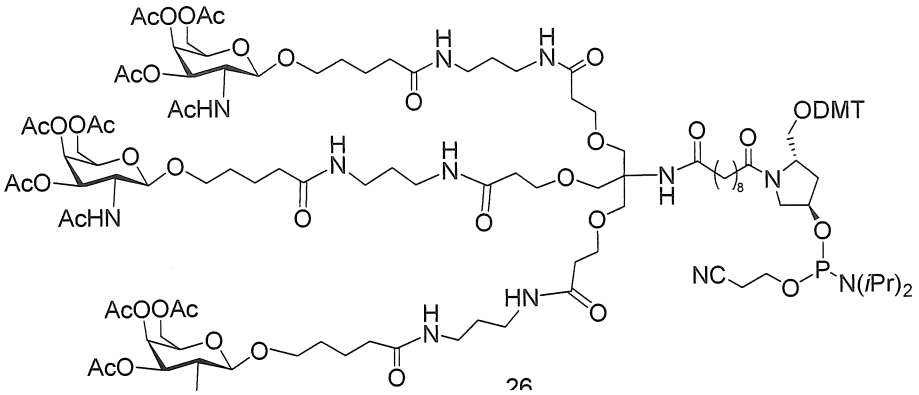


Hợp chất có công thức 24 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 6.

Ví dụ 8: Điều chế hợp chất có công thức 26

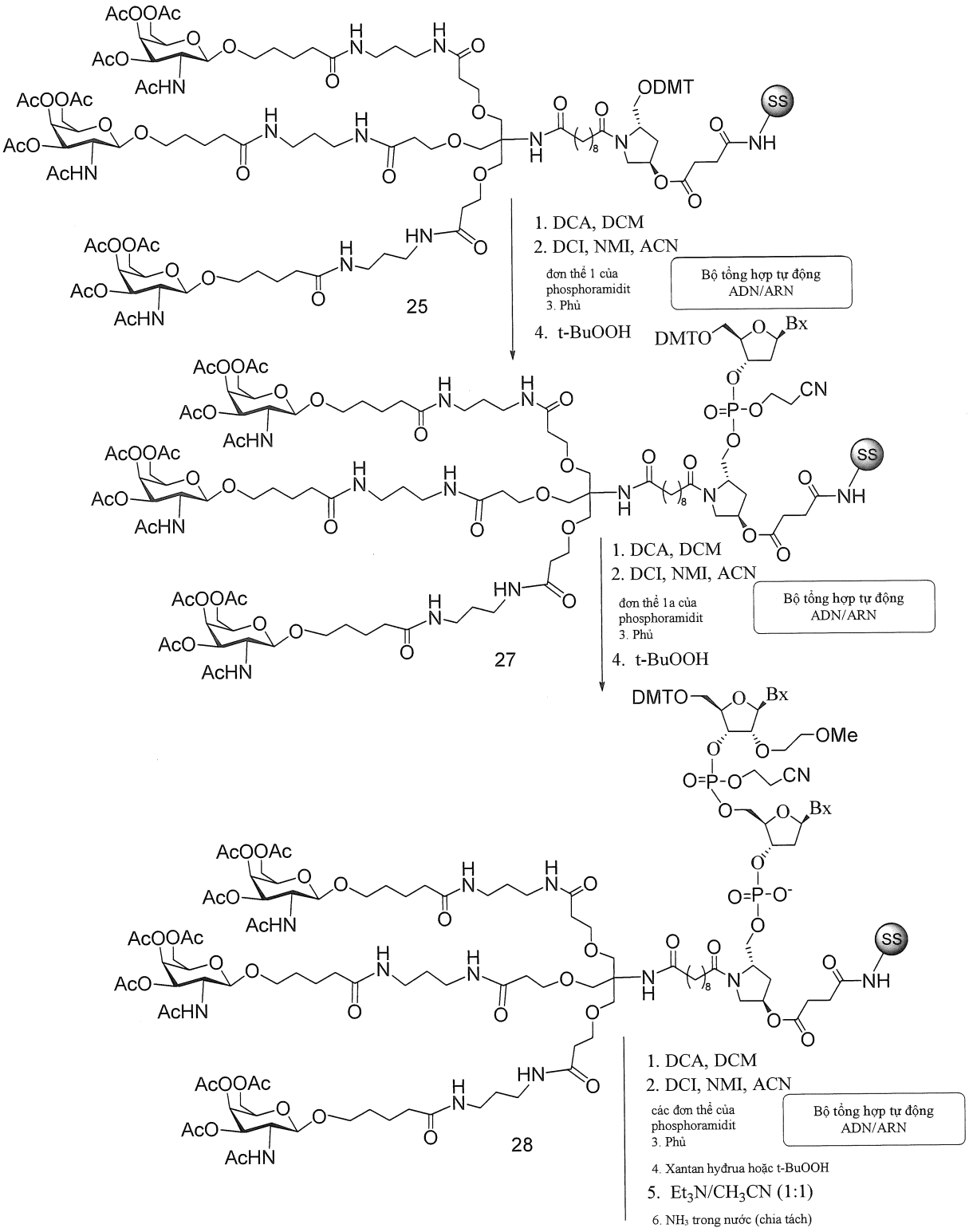


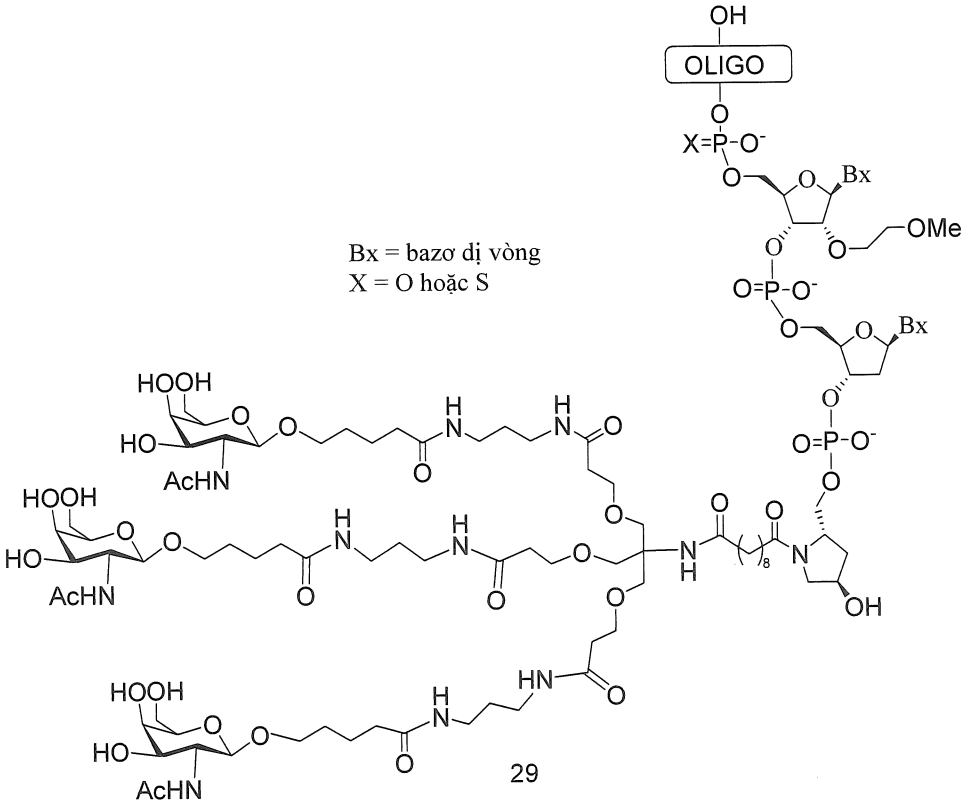
Phosphit hóa



Hợp chất có công thức 24 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 6.

Ví dụ 9: Quy trình chung để điều chế các ASO tiếp hợp chứa $GalNAc_3$-1 ở đầu tận cùng 3', hợp chất có công thức 29

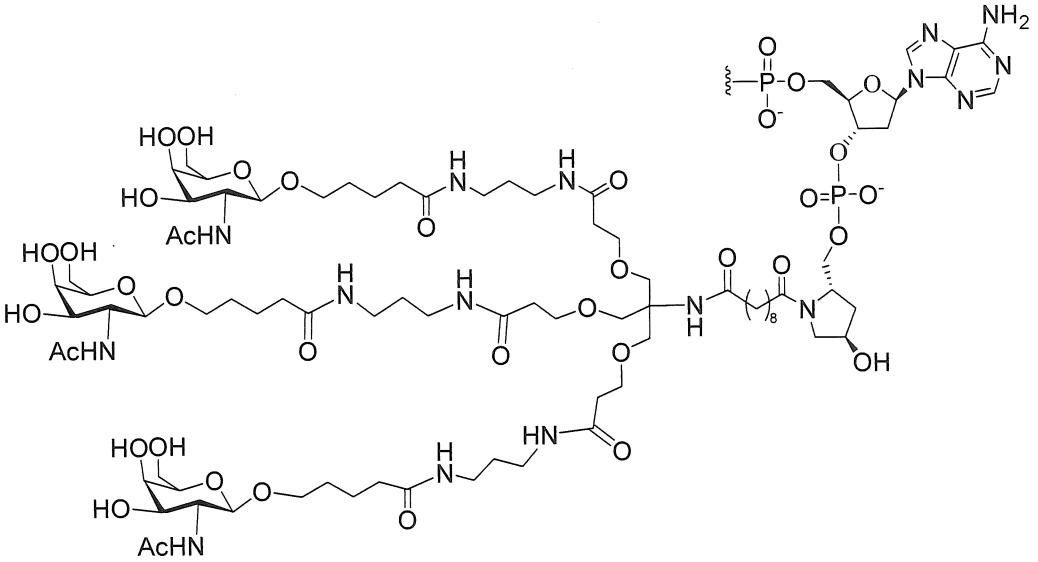

1. DCA, DCM
2. DCI, NMI, ACN
đơn thể 1 của phosphoramidit
3. Phủ
4. t-BuOOH
Bộ tổng hợp tự động ADN/ARN
25
1. DCA, DCM
2. DCI, NMI, ACN
đơn thể 1a của phosphoramidit
3. Phủ
4. t-BuOOH
Bộ tổng hợp tự động ADN/ARN
27
1. DCA, DCM
2. DCI, NMI, ACN
các đơn thể của phosphoramidit
3. Phủ
4. Xantan hyđrua hoặc t-BuOOH
5. Et3N/CH3CN (1:1)
6. NH3 trong nước (chia tách)
Bộ tổng hợp tự động ADN/ARN
28



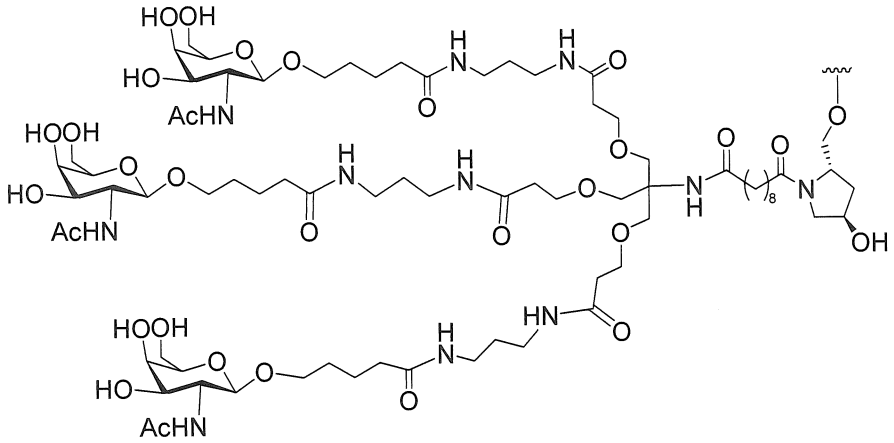
Bx = bazơ dị vòng
X = O hoặc S

29

Trong đó GalNAc$_3$-1 được bảo vệ có cấu trúc:

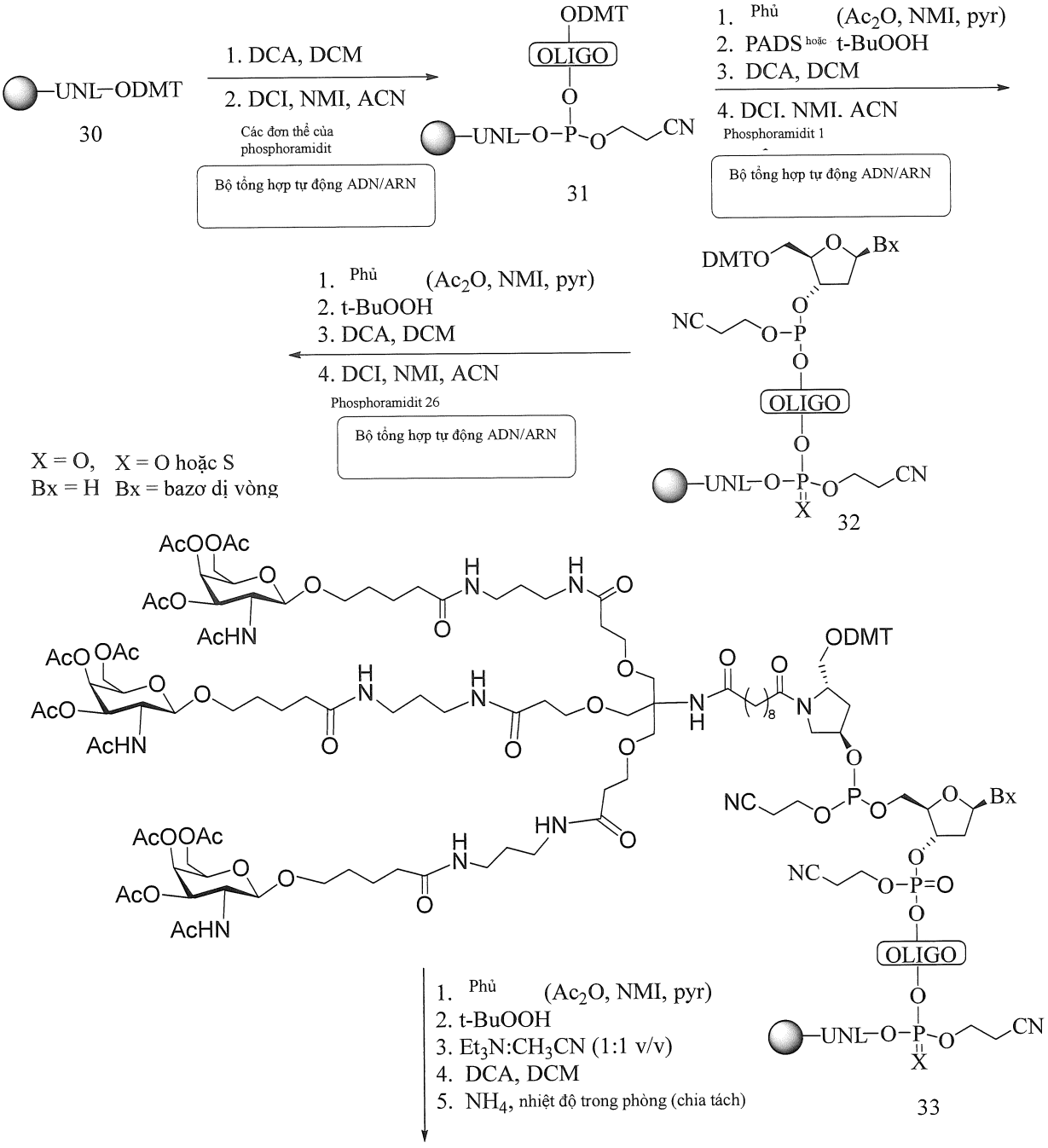


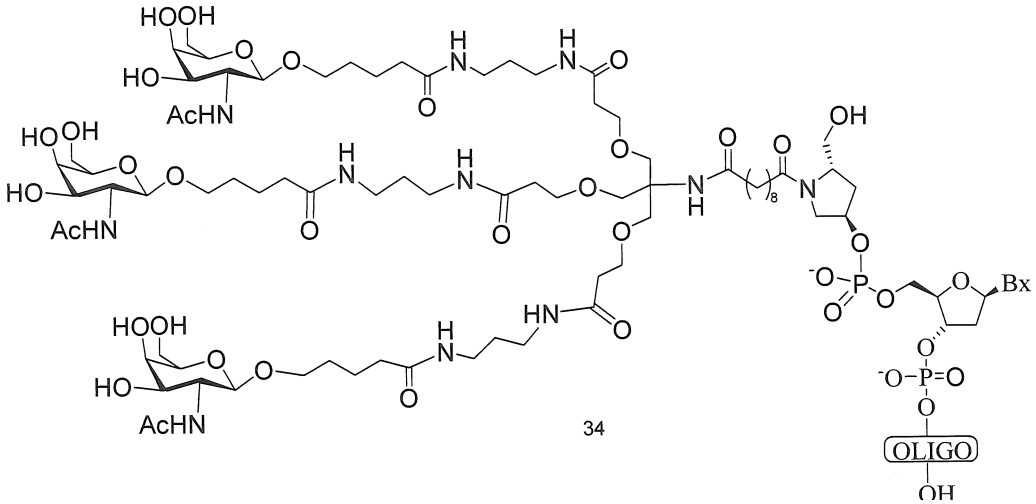
Phần cụm GalNAc$_3$ của nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-1 (GalNAc$_3$-1$_a$) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Trong đó GalNAc$_3$-1$_a$ có công thức sau:



Nền rắn liên kết GalNAc$_3$-**1** được bảo vệ, hợp chất có công thức 25, được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 7. Hợp chất oligome có công thức 29 chứa GalNAc$_3$-1 ở đầu tận cùng 3' được điều chế bằng cách áp dụng các quy trình chuẩn theo sự tổng hợp ADN/ARN tự động (xem tài liệu: Dupouy *et al., Angew. Chem. Int. Ed.,* 2006, *45,* 3623-3627). Các đơn thể của phosphoramiđit, các hợp chất có công thức 1 và 1a được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 1. Các phosphoramiđit được minh họa nhằm đại diện và không được dự định để giới hạn ở các đơn thể của phosphoramiđit khác có thể được dùng để điều chế các hợp chất oligome có trình tự và thành phần định trước. Thứ tự và số lượng phosphoramiđit được bổ sung vào nền rắn có thể được điều chỉnh để điều chế các hợp chất oligome có khe như được bộc lộ trong bản mô tả này. Các hợp chất oligome có khe này có thể có thành phần và trình tự gốc định trước bị quy định bởi mục tiêu cụ thể bất kỳ.

Ví dụ 10: Quy trình chung để điều chế các ASO tiếp hợp chứa GalNAc$_3$-1 ở đầu tận cùng 5', hợp chất có công thức 34

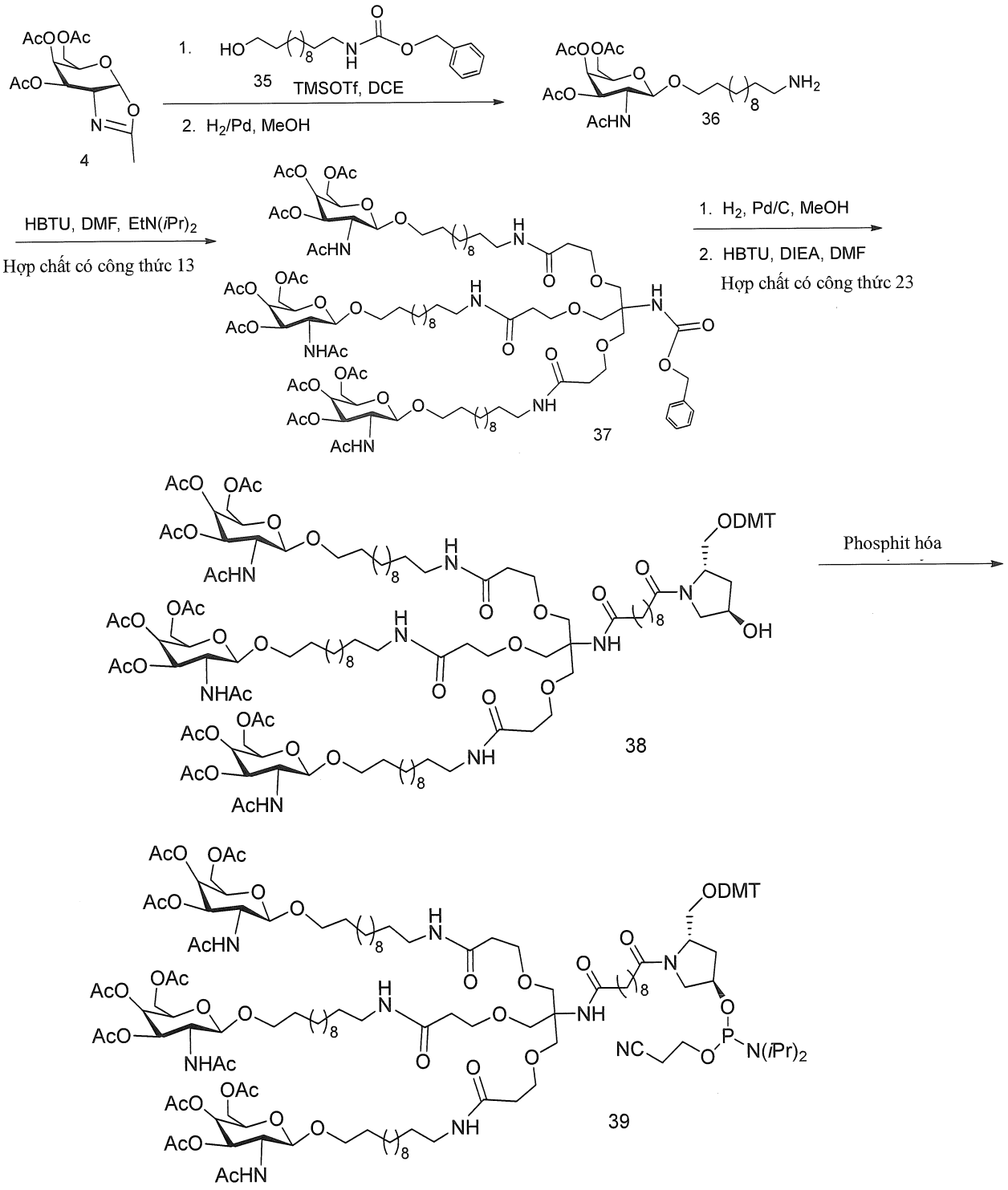




34

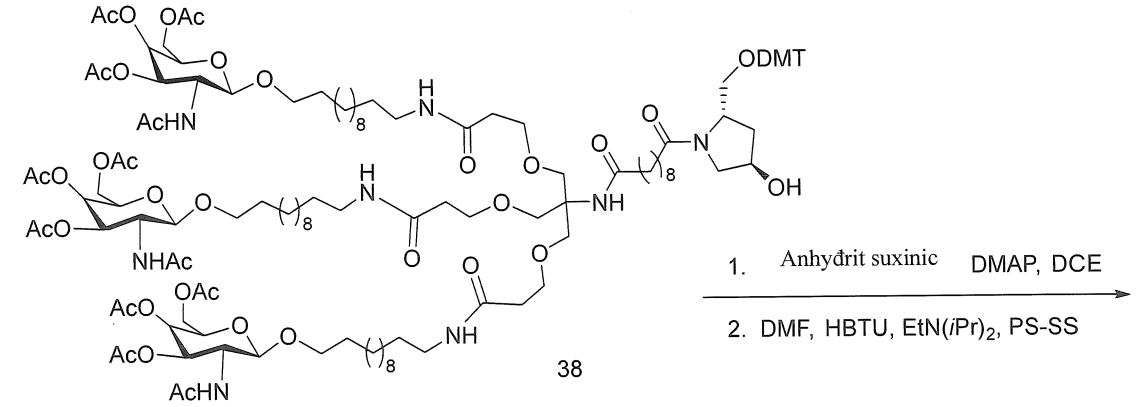
Unylinker™ 30 có bán trên thị trường. Hợp chất oligome có công thức 34 chứa cụm $GalNAc_3$-**1** ở đầu tận cùng 5' được điều chế bằng cách áp dụng các quy trình chuẩn theo sự tổng hợp ADN/ARN tự động (xem tài liệu: Dupouy *et al., Angew. Chem. Int. Ed.,* 2006, *45,* 3623-3627). Các đơn thể của phosphoramiđit, các hợp chất có công thức 1 và 1a được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 1. Các phosphoramiđit được thể hiện nhằm đại diện và không được dự định để giới hạn ở các đơn thể của phosphoramiđit khác có thể được dùng để điều chế hợp chất oligome có trình tự và thành phần định trước. Thứ tự và số lượng của các phosphoramiđit được bổ sung vào nền rắn có thể được điều chỉnh để điều chế các hợp chất oligome có khe như được bộc lộ trong bản mô tả này. Các hợp chất oligome có khe này có thể có thành phần và trình tự gốc định trước được quyết định bởi mục tiêu cụ thể bất kỳ.

Ví dụ 11: Điều chế hợp chất có công thức 39

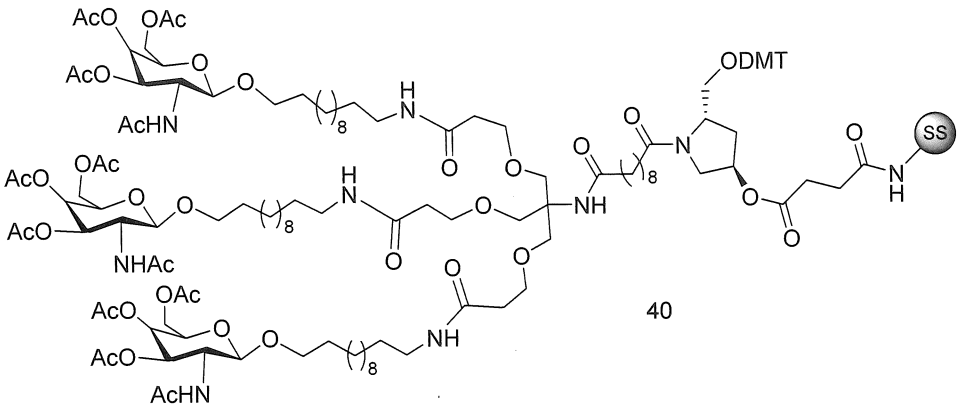


Các hợp chất có công thức 4, 13 và 23 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong các Ví dụ 2, 4, và 5. Hợp chất có công thức 35 được điều chế bằng cách áp dụng các quy trình tương tự được công bố trong tài liệu Rouchaud *et al., Eur. J. Org. Chem.*, 2011, *12*, 2346-2353.

Ví dụ 12: Điều chế hợp chất có công thức 40



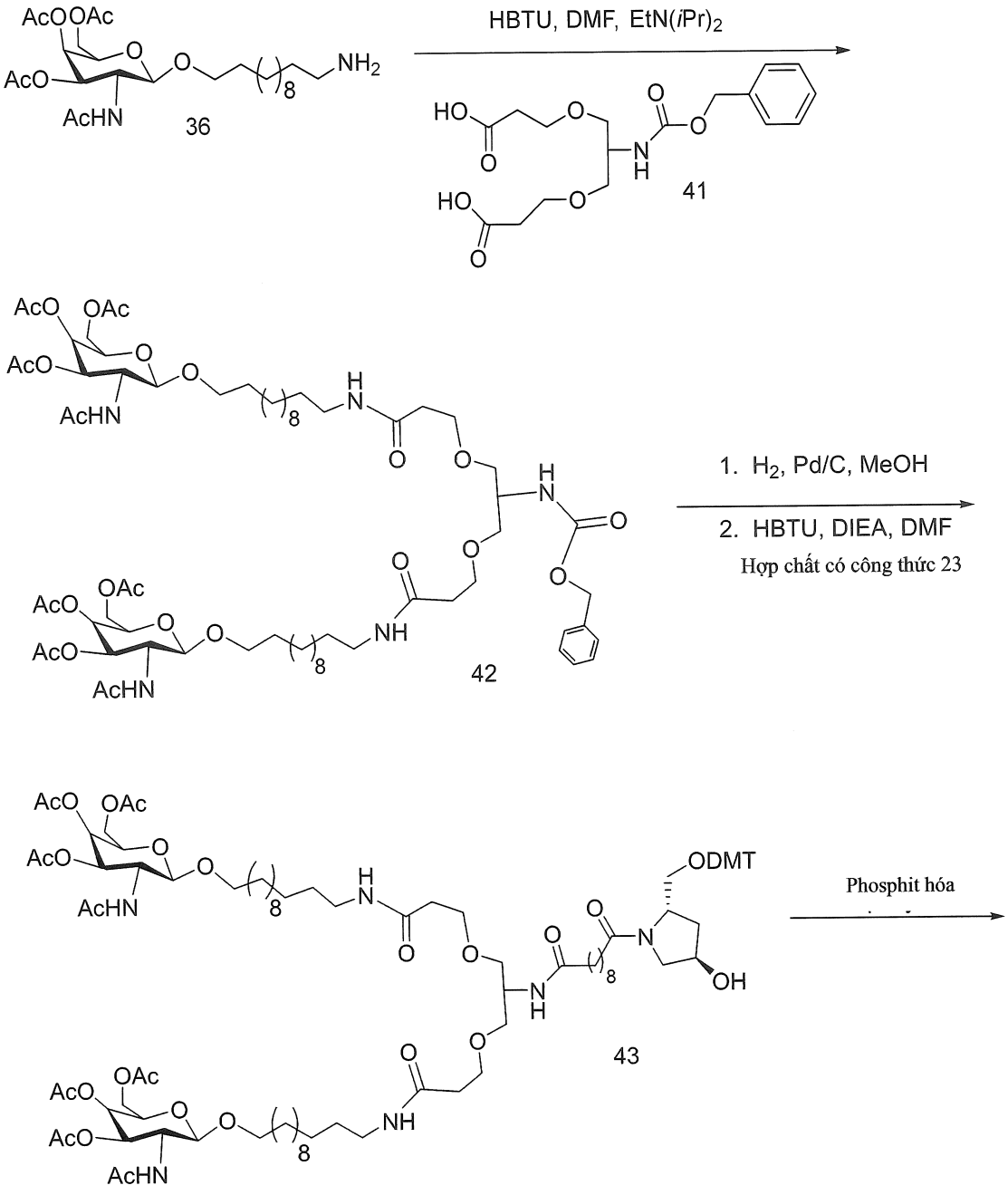
38

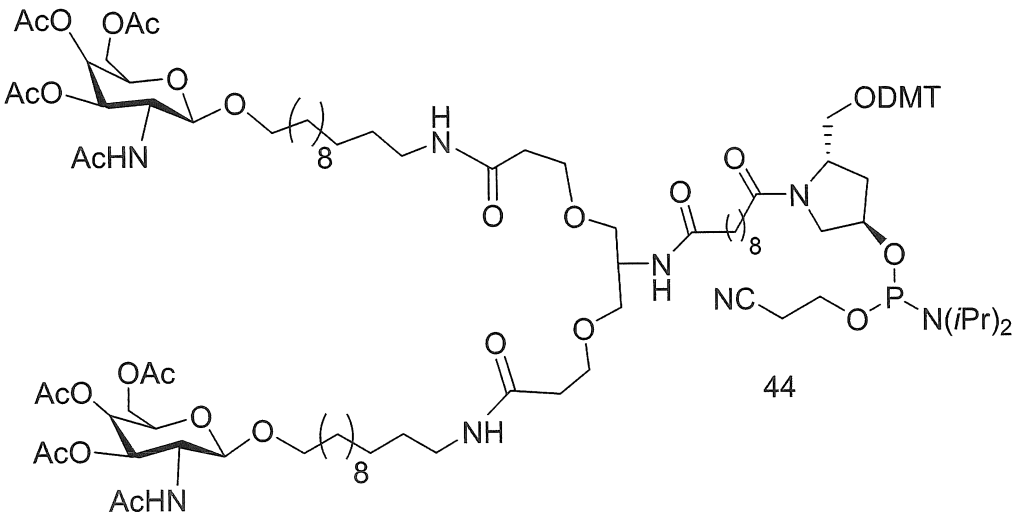


40

Hợp chất có công thức 38 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 11.

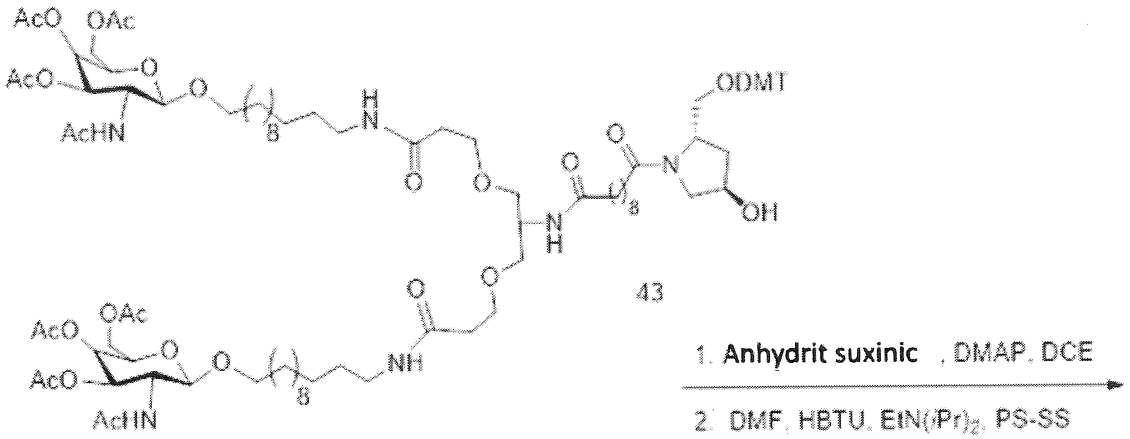
Ví dụ 13: Điều chế hợp chất có công thức 44

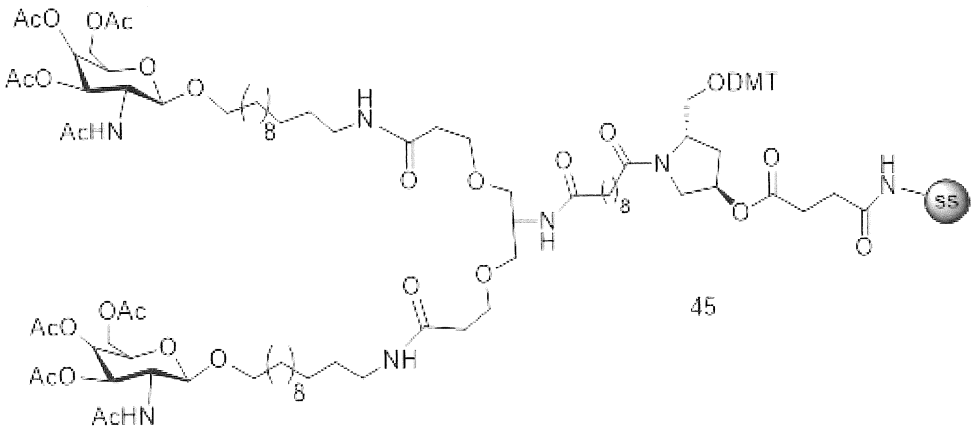




Các hợp chất có công thức 23 và 36 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 5 và Ví dụ 11. Hợp chất có công thức 41 được điều chế bằng cách áp dụng các quy trình tương tự được công bố trong công bố đơn quốc tế số công bố WO 2009082607.

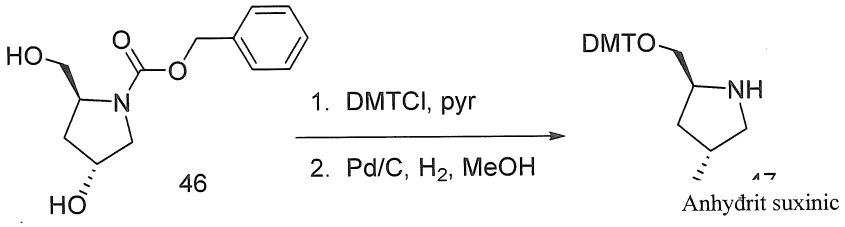
Ví dụ 14: Điều chế hợp chất có công thức 45





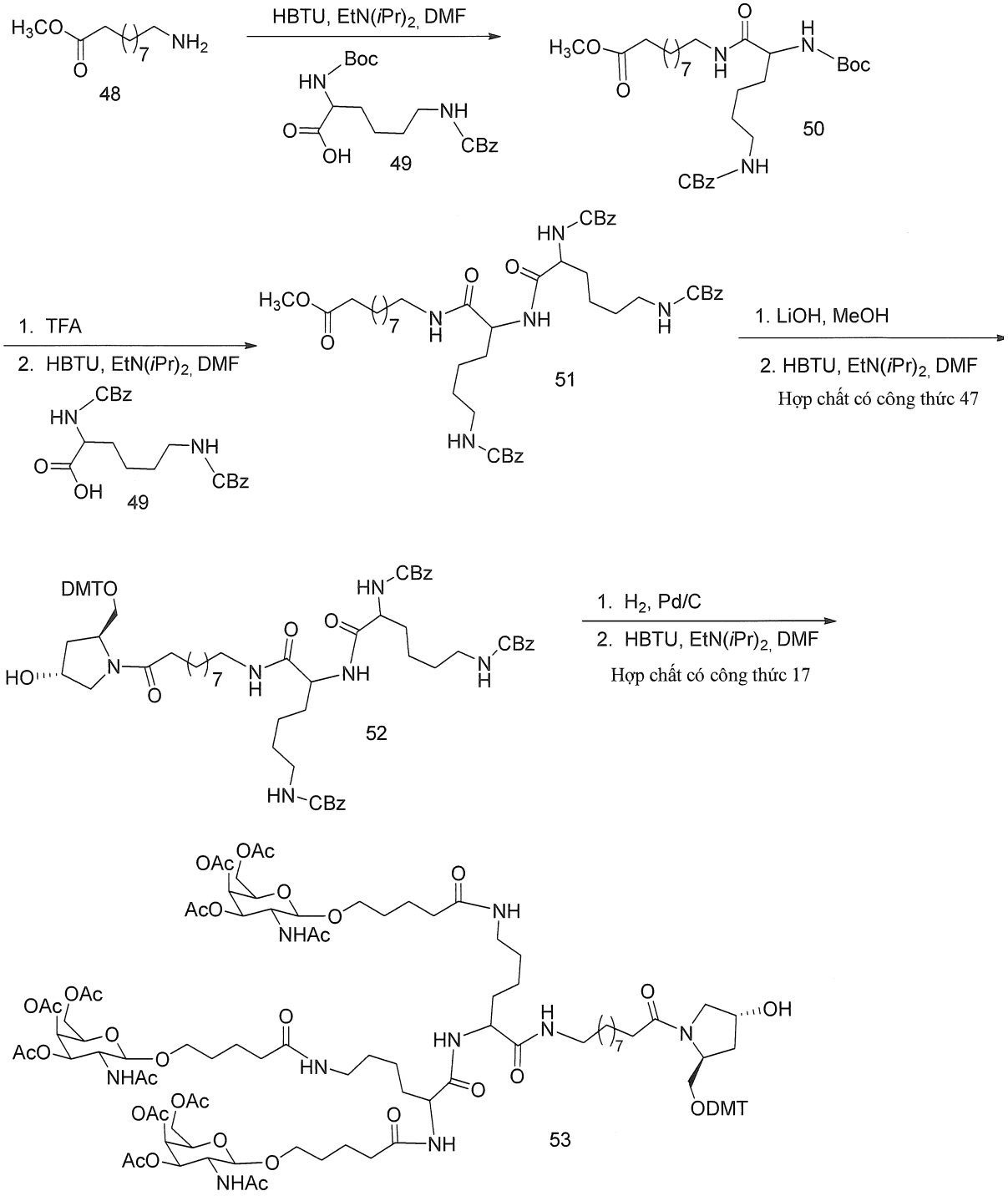
Hợp chất có công thức 43 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 13.

Ví dụ 15: Điều chế hợp chất có công thức 47



Hợp chất có công thức 46 có bán trên thị trường.

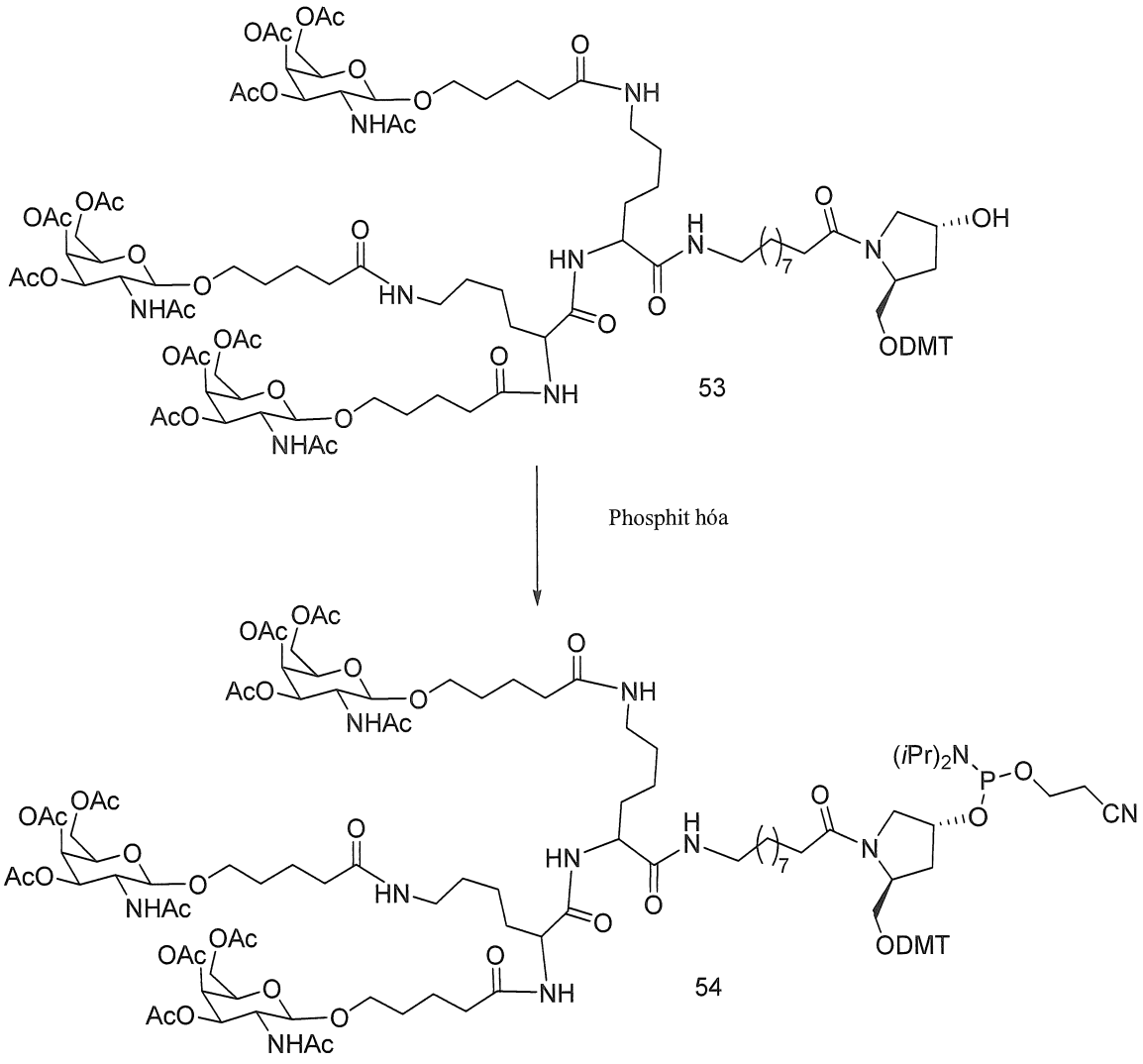
Ví dụ 16: Điều chế hợp chất có công thức 53



Các hợp chất có công thức 48 và 49 có thể mua được trên thị trường. Các hợp chất có công thức 17 và 47 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 4

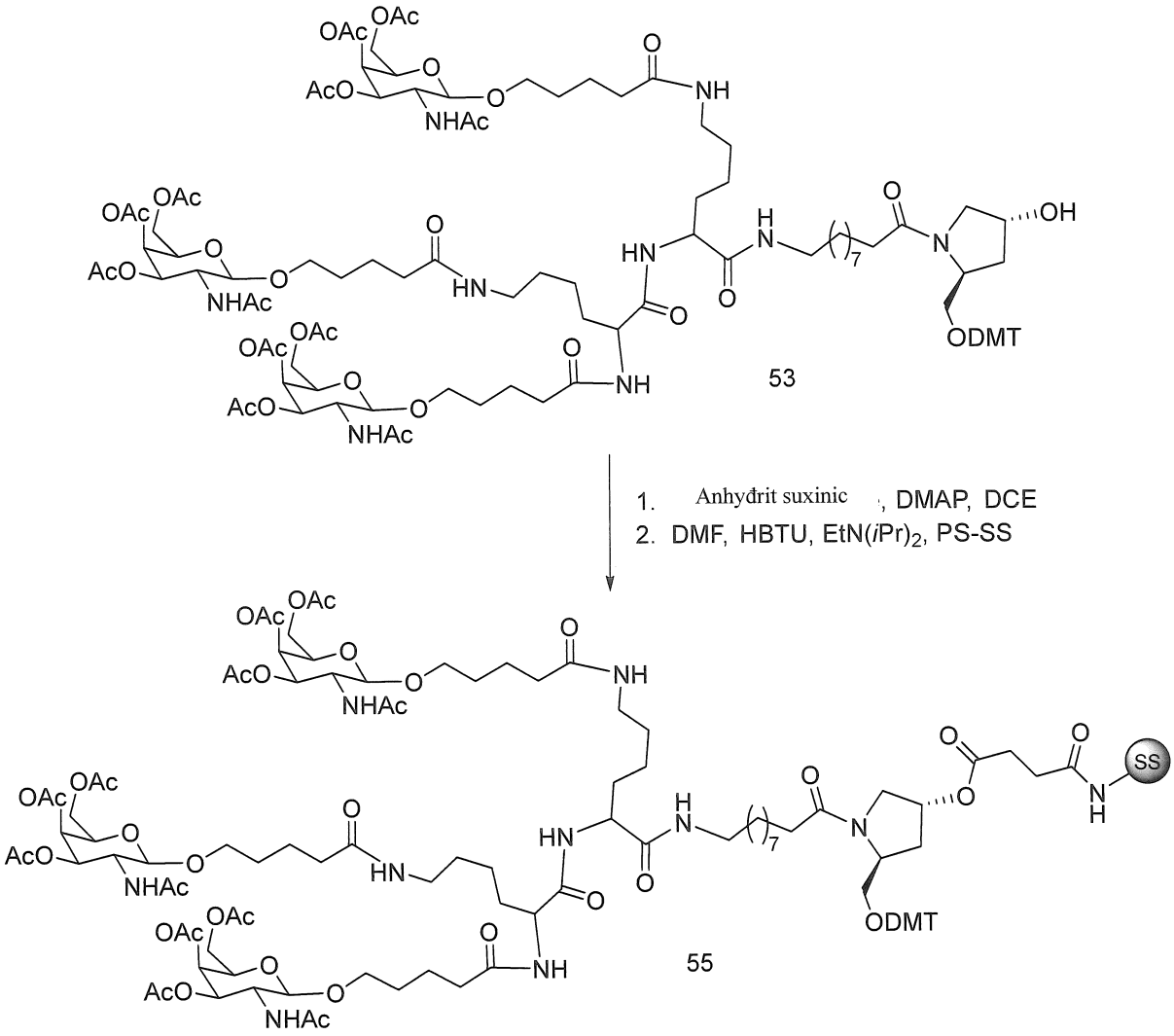
và Ví dụ15.

Ví dụ 17: Điều chế hợp chất có công thức 54



Hợp chất có công thức 53 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 16.

Ví dụ 18: Điều chế hợp chất có công thức 55



Hợp chất có công thức 53 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 16.

Ví dụ 19: Phương pháp chung để điều chế các ASO tiếp hợp chứa $GalNAc_3$-1 ở vị trí 3' thông qua các kỹ thuật pha rắn (điều chế ISIS 647535, 647536 và 651900)

Trừ khi có quy định khác, tất cả các chất phản ứng và dung dịch được sử dụng cho quy trình tổng hợp các hợp chất oligome được mua từ các nguồn thương mại. Các đơn thể của phosphoramiđit tiêu chuẩn và nền rắn được sử dụng cho các gốc nucleosit kết

hợp mà bao gồm ví dụ các gốc T, A, G, và ^{m}C. Dung dịch phosphoramiđit 0,1M trong axetonitril khan được sử dụng cho β-D-2'-đeoxyribonucleosit và 2'-MOE.

Việc tổng hợp ASO được thực hiện trên bộ tổng hợp ABI 394 (quy mô 1μmol đến 2μmol) hoặc trên bộ tổng hợp oligopilot GE Healthcare Bioscience ÄKTA (quy mô 40μmol đến 200μmol) bằng phương pháp liên hợp phosphoramiđit trên nền rắn VIMAD đã nạp $GalNAc_3$-**1** (110μmol/g, Guzaev *et al.*, 2003) được đóng trong cột. Đối với bước liên hợp, các phosphoramiđit được phân phối nhiều hơn 4 lần so với lượng nạp lên nền rắn và việc làm ngưng tụ phosphoramiđit được thực hiện trong thời gian 10 phút. Tất cả các bước khác theo các cách thức chuẩn do nhà sản xuất cung cấp. Dung dịch chứa axit đicloaxetic 6% trong toluen được sử dụng để loại bỏ nhóm đimetoxytrityl (DMT) từ nhóm 5'-hyđroxyl bao gồm tnucleotit. 4,5-đixyanoimiđazol (0,7M) trong CH_3CN khan được dùng làm chất hoạt hóa trong khi bước liên hợp. Các liên kết phosphorothioat được đưa vào bằng cách sulfua hóa với dung dịch 0,1M chứa xantan hyđrua theo tỷ lệ 1:1 pyriđin/CH_3CN trong thời gian tiếp xúc 3 phút. Dung dịch chứa 20% *tert*-butylhyđroperoxit trong CH_3CN chứa nước 6% được dùng làm tác nhân oxy hóa để tạo ra các liên kết phosphođieste giữa nucleosit với thời gian tiếp xúc 12 phút.

Sau khi trình tự mong muốn được tập hợp, các nhóm phosphast xyanoetyl bảo vệ được khử bảo vệ bằng cách sử dụng hỗn hợp theo tỷ lệ 1:1 (thể tích) gồm trietylamin và axetonitril với thời gian tiếp xúc 45 phút. Các ASO đã được liên kết nền rắn được tạo huyền phù trong amoniac trong nước (28% đến 30% khối lượng) và đun nóng ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 6 giờ.

Sau đó, các ASO không liên kết được lọc và amoniac được làm bay hơi. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp trên cột trao đổi anion mạnh (GE Healthcare Bioscience, nguồn 30Q, 30μm, 2,54 x 8cm, A = 100mM amoni axetat trong 30% CH_3CN trong nước, B = 1,5M NaBr trong A, 0% đến 40% B trong thời gian 60 phút, lưu lượng 14ml phút-1, λ = 260nM). Cặn được loại muối theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) trên cột pha đảo để tạo ra các ASO mong muốn với hiệu suất phân tách nằm trong khoảng từ 15% đến 30% trên cơ sở mẻ nạp ban đầu trên nền rắn. Các ASO được đặc trưng bởi hai ion HPLC được liên hợp phân tích MS bằng hệ thống Agilent 1100 MSD.

Các oligonucleotit đối nghĩa không chứa thể tiếp hợp được tổng hợp bằng cách sử dụng các quy trình tổng hợp oligonucleotit tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Bằng cách áp dụng các phương pháp này, ba hợp chất đối nghĩa riêng biệt hướng đích ApoC III được điều chế. Như được tổng kết trong Bảng 4, dưới đây, mỗi hợp chất trong số ba hợp chất đối nghĩa hướng đích ApoC III có cùng trình tự nucleobazơ; ISIS 304801 là 5-10-5 MOE gapmer có tất cả các liên kết phosphorothioat; ISIS 647535 giống như ISIS 304801, chỉ khác nó có GalNAc$_3$-1 đã tiếp hợp ở đầu tận cùng 3' của nó; và ISIS 647536 giống như ISIS 647535 chỉ khác các liên kết giữa nucleosit nhất định của hợp chất đó được các liên kết phosphođieste. Như được tổng kết trong Bảng 4, hai hợp chất đối nghĩa riêng biệt Hướng đích SRB-1 được tổng hợp. ISIS 440762 2 đến 10 đến 2 cEt gapmer với tất cả liên kết phosphorothioat giữa nucleosit; ISIS 651900 giống như ISIS 440762, chỉ khác nó chứa GalNAc$_3$-1 ở đầu tận cùng 3' của nó.

Bảng 4

ASO cải biến hướng đích ApoC III và SRB-1

ASO	Trình tự (5' đến 3')	Đích	Khối lượng tính toán	Khối lượng quan sát	SEQ ID No.
ISIS 304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}\ T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	ApoC III	7165,4	7164,4	20
SIS 647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_3$-**1**$_a$	ApoC III	9239,5	9237,8	21
SIS 647536	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_3$-**1**$_a$	ApoC III	9142,9	9140,8	21
SIS 440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	SRB-1	4647,0	4646,4	22
SIS 651900	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ko}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_3$-**1**$_a$	SRB-1	6721,1	6719,4	23

Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE; "d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "k" biểu thị 6'-(*S*)-CH_3 nucleosit hai vòng (ví dụ, cEt); "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit (PS); "o" biểu thị các liên kết phosphođieste giữa nucleosit (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. Chỉ số trên "m" biểu thị 5-metylxytosin. "GalNAc$_3$-1" biểu thị nhóm tiếp hợp có cấu trúc được thể hiện trên đây

trong Ví dụ 9. Lưu ý rằng, $GalNAc_3$-1 chứa adenosin có thể chia tách mà nối ASO vào phần dư của thể tiếp hợp, mà được chỉ rõ "$GalNAc_3$-1_a". Thuật ngữ này được dùng trong bảng nêu trên để thể hiện toàn bộ trình tự nucleobazơ, bao gồm adenosin, mà là một phần của thể tiếp hợp. Do đó, trong bảng nêu trên, các trình tự này cũng có thể được liệt kê khi kết thúc bằng "$GalNAc_3$-1" với "A_{do}" được bỏ qua. Quy ước sử dụng ký hiệu "a" này để chỉ một phần của nhóm tiếp hợp không có nucleosit tách được hoặc gốc phân cắt được được sử dụng trong toàn bộ các ví dụ này. Một phần của nhóm tiếp hợp này không có gốc phân cắt được được thể hiện trong bản mô tả này là "cụm" hoặc "cụm tiếp hợp" hoặc "cụm $GalNAc_3$". Trong một số trường hợp nhất định, thuận tiện nếu mô tả nhóm tiếp hợp bằng cách đưa ra một cách riêng rẽ chùm của nó và gốc phân cắt được của nó.

Ví dụ 20: Ức chế đối nghĩa phụ thuộc vào liều lượng của ApoC III của người ở chuột nhắt chuyển gen huApoC III

ISIS 304801 và ISIS 647535, mỗi ApoC III hướng đích của người và nêu trên, được thử nghiệm riêng rẽ và được đánh giá trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng về khả năng ức chế của chúng đối với ApoC III của người ở chuột nhắt chuyển gen có ApoC III của người.

Điều trị

Chuột nhắt chuyển gen có ApoCIII của người được duy trì trong 12 giờ chu kỳ sáng/tối và được cung cấp *ad libitum* Teklad lab chow. Chuột được cho hợp thủy thổ trong ít nhất 7 ngày trong phương tiện nghiên cứu trước khi bắt đầu thử nghiệm. Các ASO được điều chế trong PBS và được khử trùng bằng cách lọc thông qua bộ lọc 0,2 micron. Các ASO được hòa tan trong 0,9% PBS dùng để tiêm.

Chuột nhắt chuyển gen có ApoC III của người được tiêm trong khoang màng bụng mỗi tuần một lần trong hai tuần bằng ISIS 304801 hoặc 647535 ở 0,08, 0,25. 0,75, 2,25 hoặc 6,75μmol/kg hoặc bằng PBS làm đối chứng. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 con chuột. Bốn mươi tám giờ sau khi dùng liều lượng cuối cùng, máu được lấy từ mỗi con chuột và chuột nhắt bị giết và mô sẽ được gom.

Phân tích ARN thông tin của ApoC III

Các lượng ARN thông tin của ApoC III ở gan của các con chuột nhắt được xác định bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng RIBOGREEN® RNA (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Các lượng ARN thông tin của ApoC III được xác định so với toàn bộ ARN (bằng cách sử dụng Ribogreen), trước khi chuẩn tắc hóa theo đối chứng đã được điều trị bằng PBS. Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của các lượng ARN thông tin của ApoC III cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa đối chứng đã được xử lý bằng PBS và được biểu thị là "% PBS". Một nửa liều lượng hữu hiệu tối đa (ED_{50}) của mỗi ASO cũng được đưa ra trong Bảng 5, dưới đây.

Như được thể hiện, cả hai hợp chất đối nghĩa đã giảm ARN của ApoC III liên quan đến sự điều khiển bằng PBS. Ngoài ra, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp với $GalNAc_3$-1 (ISIS 647535) gần như có hiệu nghiệm hơn so với hợp chất đối nghĩa không có thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 (ISIS 304801).

Bảng 5

Tác động của việc điều trị bằng ASO trên các lượng ARN thông tin của ApoC III ở chuột nhắt chuyển gen có ApoC III của người

ASO	Liều lượng (μmol/kg)	% PBS	ED_{50} (μmol/kg)	Thể tiếp hợp 3'	Liên kết giữa nucleosit/Chiều dài	SEQ ID No.
PBS	0	100	--	-	--	
ISIS 304801	0,08	95	0,77	Không	PS/20	20
	0,75	42				
	2,25	32				
	6,75	19				
ISIS 647535	0,08	50	0,074	$GalNAc_3$-1	PS/20	21
	0,75	15				
	2,25	17				
	6,75	8				

Phân tích protein của ApoC III (Thử nghiệm độ đục)

Phân tích protein của huyết tương ApoC III được xác định bằng cách áp dụng các quy trình được thông báo bởi Graham *và các đồng tác giả, Circulation Research,* được công bố trên mạng trước khi in ngày 29 tháng 03 năm 2013.

Khoảng 100µl huyết tương phân lập được từ chuột nhắt được phân tích không pha loãng bằng cách sử dụng thiết bị phân tích Olympus Lâm sàng và có bán trên thị trường thử nghiệm độ đục của ApoC III (Kamiya, số danh mục sản phẩm KAI-006, Kamiya Biomedical, Seattle, WA). các thức thử nghiệm được thực hiện như đã được bộc lộ bởi người bán.

Như được thể hiện trong bảng 6 dưới đây, cả các hợp chất đối nghĩa làm giảm protein của ApoC III iên quan đến sự điều khiển bằng PBS. Ngoài ra, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp với $GalNAc_3$-1 (ISIS 647535) gần như có hiệu nghiệm hơn so với hợp chất đối nghĩa không có thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 (ISIS 304801).

Bảng 6

Tác động của việc điều trị bằng ASO trên lượng protein của huyết tương ApoC III ở chuột nhắt chuyển gen có ApoC III của người

ASO	Liều lượng (µmol/kg)	% PBS	ED_{50} (µmol/kg)	Thể tiếp hợp 3'	Liên kết giữa nucleosit /Chiều dài	SEQ ID No.
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0,08	86	0,73	Không	PS/20	20
	0,75	51				
	2,25	23				
	6,75	13				
ISIS 647535	0,08	72	0,19	$GalNAc_3$-**1**	PS/20	21
	0,75	14				
	2,25	12				
	6,75	11				

Triglyxerit huyết tương và cholesteol được chiết theo phương pháp của Bligh và Dyer (Bligh, E. G. và Dyer, W.J. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917, 1959) (Bligh, E and Dyer, W, *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-917, 1959) (Bligh, E and Dyer, W, *Can J Biochem Physiol*, 37, 911-917, 1959) và đo được bằng cách sử dụng thiết bị phân tích lâm sàng Beckmann Coulter và các chất phản ứng có bán trên thị trường.

Lượng triglyxerit đo được liên quan đến PBS được tiêm vào chuột nhắt và được biểu thị là "% PBS". Các kết quả được thể hiện trong Bảng 7. Như được thể hiện, cả hai

hợp chất đối nghĩa có lượng triglyxerit thấp hơn. Ngoài ra, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp với $GalNAc_3$-1 (ISIS 647535) gần như có hiệu nghiệm hơn so với hợp chất đối nghĩa không có thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 (ISIS 304801).

Bảng 7

Tác động của việc điều trị bằng ASO đến lượng triglyxerit ở chuột nhắt chuyển gen

ASO	Liều lượng (µmol/kg)	% PBS	ED_{50} (µmol/kg)	Thể tiếp hợp 3'	Liên kết giữa nucleosit /Chiều dài	SEQ ID No.
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0,08	87	0,63	Không	PS/20	20
	0,75	46				
	2,25	21				
	6,75	12				
ISI 647535	0,08	65	0,13	$GalNAc_3$-**1**	PS/20	21
	0,75	9				
	2,25	8				
	6,75	9				

Các mẫu huyết tương được phân tích theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) để xác định lượng tổng lượng cholesteol và của các phân đoạn khác nhau của cholesteol (HDL và LDL). Các kết quả được thể hiện trong các bảng 8 và bảng 9. Như được thể hiện, cả hai hợp chất đối nghĩa các tổng lượng cholesteol thấp hơn; cả LDL thấp hơn; và cả HDL cao hơn. Ngoài ra, hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp với $GalNAc_3$-1 (ISIS 647535) gần như có hiệu nghiệm hơn so với hợp chất đối nghĩa không có thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 (ISIS 304801). Hiện tượng tăng HDL và giảm lượng LDL là tác động có lợi cho tim mạch trong việc ức chế đối nghĩa của ApoC III.

Bảng 8

Tác động của việc điều trị bằng ASO đến tổng lượng cholesteol ở chuột nhắt chuyển gen

ASO	Liều lượng (µmol/kg)	Tổng lượng cholesteol (mg/dL)	Thể tiếp hợp 3'	Liên kết giữa nucleosit /Chiều dài	SEQ ID No.
PBS	0	257	--	--	
ISIS 304801	0,08	226	Không	PS/20	20
	0,75	164			
	2,25	110			
	6,75	82			
ISIS 647535	0,08	230	$GalNAc_3$-1	PS/20	21
	0,75	82			
	2,25	86			
	6,75	99			

Bảng 9

Tác động của việc điều trị bằng ASO đến lượng cholesteol của HDL và LDL ở chuột nhắt chuyển gen

ASO	Liều lượng (µmol/kg)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	Thể tiếp hợp 3'	Liên kết giữa nucleosit /Chiều dài	SEQ ID No.
PBS	0	17	28	--	--	
IS IS 304801	0,08	17	23	Không	PS/20	32
	0,75	27	12			
	2,25	50	4			
	6,75	45	2			
IS IS 647535	0,08	21	21	$GalNAc_3$-1	PS/20	111
	0,75	44	2			
	2,25	50	2			
	6,75	58	2			

Phân tích dược động học (PK)

PK của các ASO cũng được đánh giá. Các mẫu gan và thận được nghiền và chiết bằng cách sử dụng các cách thức chuẩn. Các mẫu được phân tích trên MSD1 sử dụng IP-HPLC-MS. Lượng mô (μg/g) của ISIS 304801 và 647535 có chiều dài đầy đủ được đo và các kết quả được thể hiện trong Bảng 10. Như được thể hiện, lượng gan của toàn bộ các hợp chất đối nghĩa có chiều dài đầy đủ giống với hai hợp chất đối nghĩa. Do đó, mặc dù hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp $GalNAc_3$-**1** có hiệu nghiệm ở gan (như được thấy rõ bằng dữ liệu ARN và protein nêu trên), nó không có mặt với nồng độ gần như cao hơn ở gan. Thực vậy, EC_{50} đã được tính (được đưa ra trong Bảng 10) xác nhận rằng mức tăng quan sát được về hiệu lực của hợp chất đã tiếp hợp không thể hoàn toàn coi làm tăng sự tích tụ. Kết quả này cho rằng hiệu lực cải thiện của thể tiếp hợp theo cơ chế khác hơn là chỉ riêng tích tụ ở gan, có thể bằng cách cải thiện mức độ hấp thu hữu hiệu của hợp chất đối nghĩa bên trong các tế bào.

Các kết quả cũng cho thấy rằng nồng độ của hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp $GalNAc_3$-**1** trong thận thấp hơn nồng độ của hợp chất đối nghĩa không có thể tiếp hợp GalNAc. Điều này có một số lợi ích liên quan đến cách chữa bệnh. Đối với chỉ dẫn về cách chữa bệnh mà ở đó hoạt tính trong thận is not sought, tiếp xúc với thận có nguy cơ phải chịu độc tính thận không có lợi ích tương ứng. Hơn thế nữa, nồng độ cao trong thận thường dẫn đến mất hợp chất vào nước tiểu tạo ra sự làm sạch nhanh hơn. Do đó, đối với các mục tiêu không tích tụ trong thận, thì sự tích tụ trong thận là điều không mong muốn. Các dữ liệu này ám chỉ rằng thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 làm giảm sự tích tụ trong thận.

Bảng 10

Phân tích PK của việc điều trị bằng ASO ở chuột nhắt chuyển gen

ASO	Liều lượng (μmol/kg)	Gan (μg/g)	Thận (μg/g)	Gan EC_{50} (μg/g)	Thể tiếp hợp 3'	Liên kết giữa nucleosit /Chiều dài	SEQ ID No.
ISIS 304801	0,1	5,2	2,1	53	Không	PS/20	20
	0,8	62,8	119,6				

	2,3	142,3	191,5				
	6,8	202,3	337,7				
ISIS 647535	0,1	3,8	0,7	3,8	$GalNAc_3$-1	PS/20	21
	0,8	72,7	34,3				
	2,3	106,8	111,4				
	6,8	237,2	179,3				

Các chất chuyển hóa của ISIS 647535 cũng được nhận biết và khối lượng của chúng được xác nhận nhờ sự phân tích phân giải phép đo phổ khối cao. Các vị trí phân cắt và các cấu trúc của các chất chuyển hóa được quan sát được thể hiện dưới đây. % tương đối của ASO có chiều dài đầy đủ được tính bằng cách áp dụng các quy trình chuẩn và các kết quả được thể hiện trong Bảng 10a. Chất chuyển hóa chính của ISIS 647535 là ASO có chiều dài đầy đủ không có thể tiếp hợp hoàn toàn (tức là ISIS 304801), mà tạo ra từ sự chia tách tại vị trí phân cắt A, được thể hiện dưới đây. Ngoài ra, các chất chuyển hóa bổ sung tạo ra từ các vị trí phân cắt khác cũng được quan sát thấy. Các kết quả này ám chỉ rằng các liên kết chia tách khác như este, peptit, đisulfua, phosphoramiđat hoặc axyl-hyđrazon giữa đường $GalNAc_3$-1 và ASO, mà có thể được chia tách bằng các enzym trong tế bào, hoặc mà có thể chia tách trong môi trường khử của dung dịch bào tương, hoặc không ổn định với độ pH có tính axit bên trong hạt ở cơ quan nội bào và các lyzosom, cũng có thể là hữu dụng.

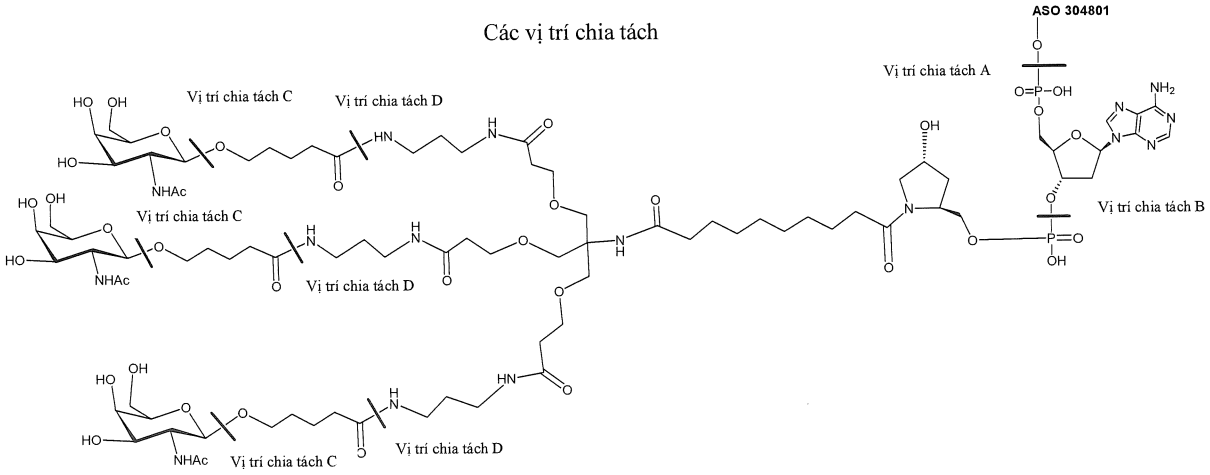
Bảng 10a

Các chất chuyển hóa có chiều dài đầy đủ quan sát được của ISIS 647535

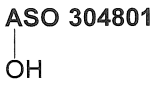
Chất chuyển hóa	ASO	Vị trí chia tách	% tương đối
1	ISIS 304801	A	36,1
2	ISIS 304801 + dA	B	10,5
3	ISIS 647535 âm [3 GalNAc]	C	16,1
4	ISIS 647535 âm [3 GalNAc + nhóm dắt axit 1 5-hyđroxy-pentanoic]	D	17,6

5	ISIS 647535 âm [2 GalNAc + nhóm dắt axit 2 5-hyđroxy-pentanoic]	D	9,9
6	ISIS 647535 âm [nhóm dắt axit 3 GalNAc + 3 5-hyđroxy-pentanoic]	D	9,8

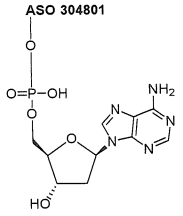
Các vị trí chia tách

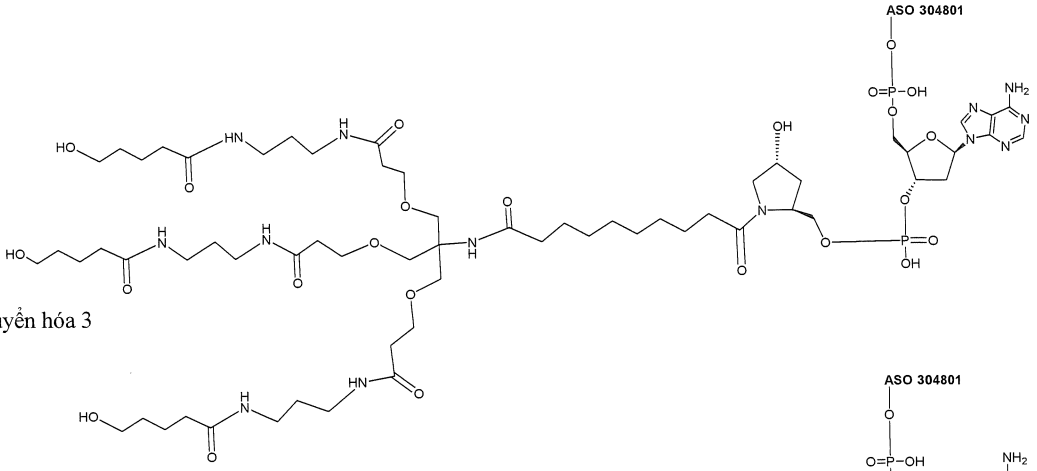


Chất chuyển hóa 1

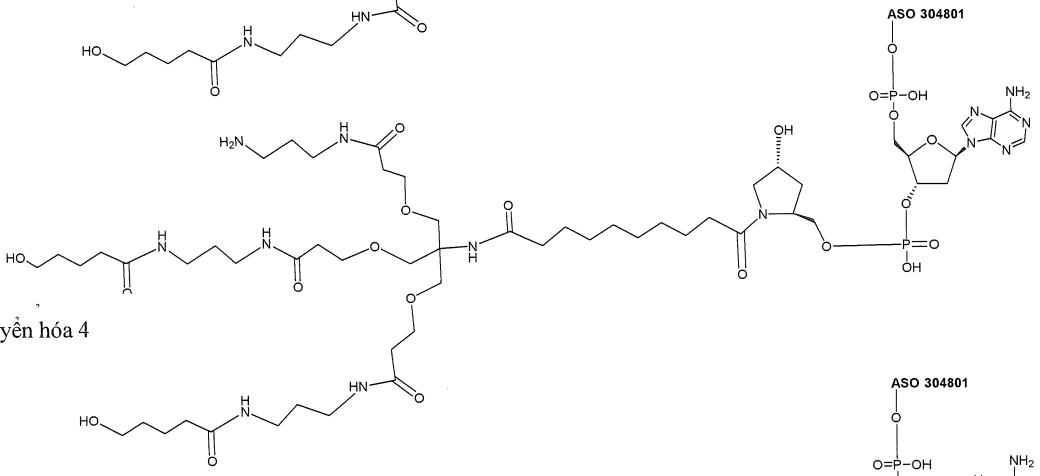


Chất chuyển hóa 2

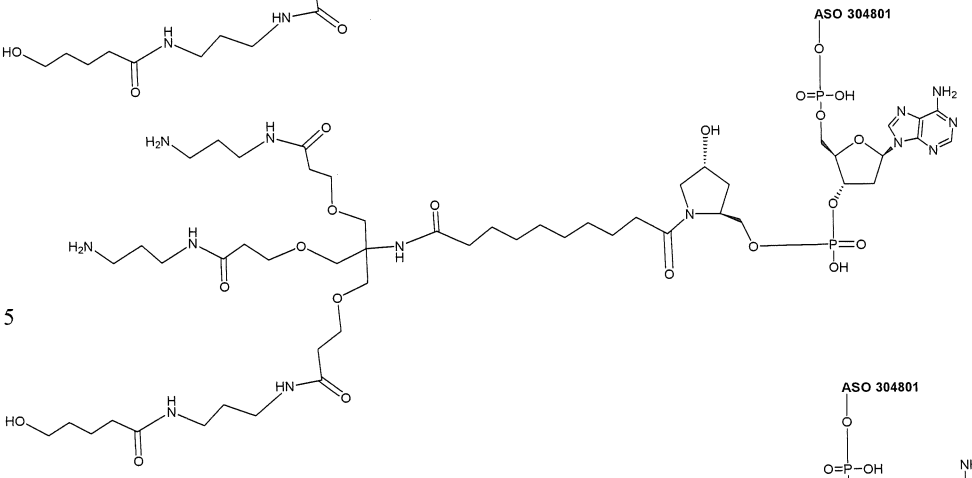




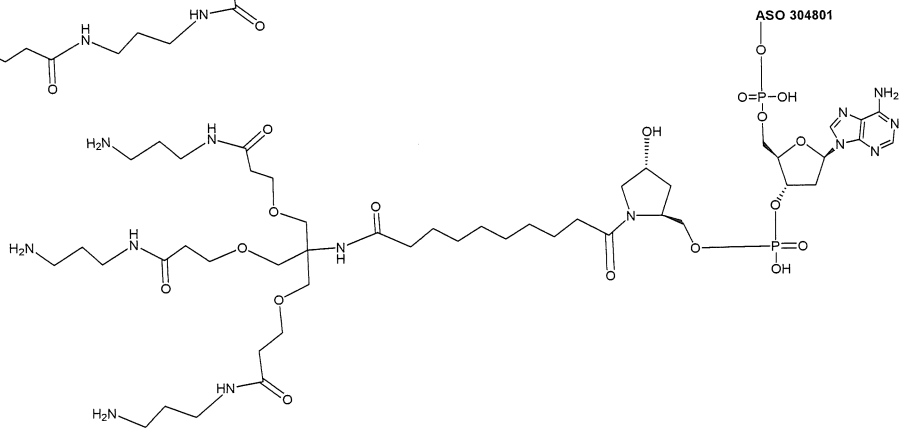
Chất chuyển hóa 3



Chất chuyển hóa 4



Chất chuyển hóa 5



Chất chuyển hóa 6

Ví dụ 21: Ức chế đối nghĩa của ApoC III của người ở chuột nhắt chuyển gen có ApoC III của người trong nghiên cứu dùng một lần

Mỗi ISIS 304801, 647535 và 647536 của ApoC III hướng đích của người và được bộc lộ trong Bảng 4, còn được đánh giá trong trong nghiên cứu dùng một lần về khả năng ức chế của chúng đối với ApoC III của người ở chuột nhắt chuyển gen có ApoC III của người.

Điều trị

Chuột nhắt chuyển gen có ApoCIII của người được duy trì trong 12 giờ chu kỳ sáng/tối và cung cấp *ad libitum* Teklad lab chow. Con chuột được cho hợp thủy thổ trong ít nhất 7 ngày trong phương tiện nghiên cứu trước khi bắt đầu thử nghiệm. Các ASO được điều chế trong PBS và được khử trùng bằng cách lọc thông qua bộ lọc 0,2 micron. Các ASO được hòa tan trong 0,9% PBS dùng để tiêm.

Chuột nhắt chuyển gen có ApoC III của người được tiêm trong khoang màng bụng một lần với liều lượng được thể hiện dưới đây bằng ISIS 304801, 647535 hoặc 647536 (nêu trên) hoặc bằng đối chứng đã được xử lý bằng PBS. Nhóm điều trị bệnh bao gồm 3 con chuột và nhóm đối chứng bao gồm 4 con chuột. Trước khi điều trị bệnh cũng như sau khi dùng liều cuối cùng, máu được lấy từ mỗi con chuột và các mẫu huyết tương được phân tích. Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng.

Các mẫu được gom và phân tích để xác định ARN thông tin của ApoC III và lượng protein ở gan; triglyxerit trong huyết tương; và cholesteol, bao gồm HDL và LDL các phân đoạn được đánh giá như trên (theo Ví dụ 20). Dữ liệu từ các sự phân tích này được thể hiện trong các bảng từ 11 đến 15, dưới đây. Lượng traxaminaza của gan, alanin aminotransferaza (ALT) và aspartat aminotransferaza (AST), trong huyết thanh được đo liên quan đến nước muối đươc tiêm vào chuột nhắt bằng cách sử dụng các cách thức chuẩn. Lượng ALT và AST cho thấy rằng các hợp chất đối nghĩa được dung nạp tốt ở tất cả các liều lượng được dùng.

Các kết quả này sự cải thiện về hiệu lực đối với các hợp chất đối nghĩa chứa thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 ở đầu tận cùng 3' (ISIS 647535 và 647536) so với hợp chất đối nghĩa không có thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 (ISIS 304801). Ngoài ra, ISIS 647536, mà chứa thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 và một số liên kết phosphođieste giống như ISIS 647535, mà chứa cùng

thể tiếp hợp và tất cả liên kết giữa nucleosit bên trong ASO là phosphorothioat.

Bảng 11

Tác động của việc điều trị bằng ASO đến lượng ARN thông tin của ApoC III ở chuột nhắt chuyển gen có ApoC III của người

ASO	Liều lượng (mg/kg)	% PBS	ED_{50} (mg/kg)	Thể tiếp hợp 3'	Liên kết giữa nucleosit/Chiều dài	SEQ ID No.
PBS	0	99	--	-	--	
ISIS 304801	1	104	13,2	Không	PS/20	20
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0,3	98	1,9	$GalNAc_3$-1	PS/20	21
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0,3	103	1,7	$GalNAc_3$-1	PS/PO/20	21
	1	60				
	3	31				
	10	21				

Bảng 12

Tác động của việc điều trị bằng ASO trên lượng protein huyết tương của ApoC III ở chuột nhắt chuyển gen có ApoC III của người

ASO	Liều lượng (mg/kg)	% PBS	ED_{50} (mg/kg)	Thể tiếp hợp 3'	Liên kết giữa nucleosit /Chiều dài	SEQ ID No.
PBS	0	99	--	--	--	
ISIS 304801	1	104	23,2	Không	PS/20	20
	3	92				
	10	71				
	30	40				
IS IS 647535	0,3	98	2,1	$GalNAc_3$-1	PS/20	21
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS	0,3	103	1,8	$GalNAc_3$-1	PS/PO/20	21

647536	1	60				
	3	31				
	10	21				

Bảng 13

Tác động của việc điều trị bằng ASO đến lượng triglyxerit ở chuột nhắt chuyển gen

ASO	Liều lượng (mg/kg)	% PBS	ED_{50} (mg/kg)	Thể tiếp hợp 3’	Liên kết giữa nucleosit /Chiều dài	SEQ ID No.
PBS	0	98	--	--	--	
ISIS 304801	1	80	29,1	Không	PS/20	20
	3	92				
	10	70				
	30	47				
ISIS 647535	0,3	100	2,2	$GalNAc_3$-1	PS/20	21
	1	70				
	3	34				
	10	23				
ISI 647536	0,3	95	1,9	$GalNAc_3$-1	PS/PO/20	21
	1	66				
	3	31				
	10	23				

Bảng 14

Tác động của việc điều trị bằng ASO đến tổng lượng cholesteol ở chuột nhắt chuyển gen

ASO	Liều lượng (mg/kg)	% PBS	Thể tiếp hợp 3’	Liên kết giữa nucleosit /Chiều dài	SEQ ID No.
PBS	0	96	--	--	
ISIS 304801	1	104	Không	PS/20	20
	3	96			
	10	86			
	30	72			
ISIS 647535	0,3	93	$GalNAc_3$-1	PS/20	21
	1	85			
	3	61			
	10	53			

ISIS 647536	0,3	115	$GalNAc_3$-1	PS/PO/20	21
	1	79			
	3	51			
	10	54			

Bảng 15

Tác động của việc điều trị bằng ASO đến lượng cholesteol HDL và LDL ở chuột nhắt chuyển gen

ASO	Liều lượng (mg/kg)	HDL % PBS	LDL % PBS	Thể tiếp hợp 3'	Liên kết giữa nucleosit /Chiều dài	SEQ ID No.
PBS	0	131	90	--	--	
ISIS 304801	1	130	72	Không	PS/20	20
	3	186	79			
	10	226	63			
	30	240	46			
ISIS 647535	0,3	98	86	$GalNAc_3$-1	PS/20	21
	1	214	67			
	3	212	39			
	10	218	35			
ISIS 647536	0,3	143	89	$GalNAc_3$-1	PS/PO/20	21
	1	187	56			
	3	213	33			
	10	221	34			

Các kết quả này xác nhận rằng thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 cải thiện hiệu lực của hợp chất đối nghĩa. Các kết quả cũng thể hiện hiệu lực bằng nhau của các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp $GalNAc_3$-1 mà ở đó oligonucleotit của đối nghĩa được trộn lẫn các liên kết (ISIS 647536 mà có sáu liên kết phosphođieste) và phiên bản phosphorothioat đầy đủ của cùng hợp chất đối nghĩa có công thức (ISIS 647535).

Các liên kết phosphorothioat tạo ra một vài thuộc tính đối với các hợp chất đối nghĩa. Ví dụ, chúng chống lại sự tiêu hóa nucleaza và chúng liên kết các protein tạo ra sự tích tụ của hợp chất ở gan, hơn là trong thận/nước tiểu. Có các thuộc tính mong muốn, đặc biệt là nếu điều trị dấu hiệu ở gan. Tuy nhiên, các liên kết phosphorothioat còn liên quan đến phản ứng viêm. Do đó, làm giảm số lượng của các liên kết phosphorothioat

trong hợp chất được mong đợi để làm giảm nguy cơ viêm, mà còn giảm nồng độ của hợp chất này ở gan, tăng nồng độ trong thận và nước tiểu, làm giảm tính ổn định với sự có mặt của các nucleaza, và giảm toàn bộ hiệu lực. Các kết quả hiện tại cho thấy rằng hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp $GalNAc_3$-1, trong đó các liên kết phosphorothioat cố định được thế bằng các liên kết phosphođieste có hiệu lực chống lại đích ở gan là bản sao có đầy đủ các liên kết phosphorothioat. Các hợp chất này được mong đợi ít gây viêm (xem ví dụ 24 mô tả thử nghiệm thể hiện việc khử PS dẫn đến giảm hiệu quả viêm).

Ví dụ 22: Tác động của ASO cải biến đã tiếp hợp $GalNAc_3$-1 hướng đích đến SRB-1 *in vivo*

ISIS 440762 và 651900, cả hai đều hướng đích đến SRB-1 và được bộc lộ trong Bảng 4, được đánh giá theo sự nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng về khả năng ức chế của chúng đối với SRB-1 ở các con chuột nhắt Balb/c.

Điều trị

Các con chuột đực Balb/c sáu tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được tiêm dưới da một lần ISIS 440762, 651900 với liều lượng được thể hiện dưới đây hoặc bằng đối chứng đã được xử lý bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 con chuột. Chuột nhắt bị giết 48 giờ sau khi dùng liều cuối cùng để xác định lượng ARN thông tin của SRB-1 ở gan bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Lượng ARN thông tin của SRB-1 được xác định so với toàn bộ ARN (bằng cách sử dụng Ribogreen), trước khi chuẩn tắc hóa để điều khiển xử lý bằng PBS. Các kết quả dưới đây được đưa ra dưới dạng phần trăm trung bình của lượng ARN thông tin của SRB-1 cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa theo đối chứng đã đươc xử lý bằng PBS và được biểu thị ở dạng "% PBS".

Như được thể hiện trong Bảng 16, cả hai hợp chất đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của SRB-1. Ngoài ra, hợp chất đối nghĩa chứa thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 (ISIS 651900) gần như có hiệu nghiệm hơn so với hợp chất đối nghĩa không có thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 (ISIS 440762). Các kết quả này thể hiện rằng hiệu lực lợi ích của các thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 được đánh giá bằng cách sử dụng các oligonucleotit đối nghĩa bổ trợ

cho đích khác nhau và có các nucleosit được cải biến về mặt hóa học khác nhau, trong trường hợp này các nucleosit được cải biến bao gồm các gốc đường etyl được ràng buộc (gốc đường hai vòng).

Bảng 16

Tác động của việc điều trị bằng ASO đến lượng ARN thông tin của SRB-1 ở các con chuột nhắt Balb/c

ASO	Liều lượng (mg/kg)	Gan % PBS	ED_{50} (mg/kg)	Thể tiếp hợp 3'		Liên kết giữa nucleosit/ Chiều dài	SEQ ID No.
PBS	0	100		-		--	
ISIS 440762	0,7	85	2,2	Không		PS/14	22
	2	55					
	7	12					
	20	3					
ISIS 651900	0,07	98	0,3	$GalNAc_3$-1		PS/14	23
	0,2	63					
	0,7	20					
	2	6					
	7	5					

Ví dụ 23: Quy trình thử nghiệm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (hPBMC)

Thử nghiệm hPBMC được thực hiện bằng cách áp dụng phương pháp ống BD Vautainer CPT. Mẫu của máu nguyên chất từ các người cho tình nguyện với sự đồng ý ở bệnh viện US HealthWorks (Faraday & El Camino Real, Carlsbad) thu được và gom trong các ống nghiệm 4 đến 15 BD Vacutainer CPT 8ml (VWR Cat.# BD362753). Tổng thể tích máu nguyên chất bắt đầu gần đúng trong các ống nghiệm CPT cho mỗi người cho được ghi nhận bằng cách sử dụng bản dữ liệu thử nghiệm PBMC.

Mẫu máu được trộn lại ngay lập tức trước khi ly tâm bằng cách nghịch chuyển nhẹ nhàng các ống nghiệm từ 8 đến 10 lần. Các ống nghiệm CPT được ly tâm ở nhiệt độ trong phòng (từ 18°C đến 25°C) trong rôto nằm ngang (swing-out) trong thời gian 30 phút ở 1500 đến 1800 RCF được ngừng lại (2700 vòng/phút Beckman Allegra 6R). Các

tế bào được lấy ra khỏi mặt phân cách của các lớp tế bào đơn nhân (giữa Ficoll và các lớp gel của polyme); được chuyển sang ống thử nghiệm hình nón 50ml vô trùng và được gom đến 5 ống nghiệm CPT/ống thử nghiệm hình nón 50ml/người cho. Sau đó, các tế bào được rửa hai lần bằng PBS (Ca^{++}, không có Mg^{++}; GIBCO). Các ống nghiệm được cung cấp đến 50ml và trộn bằng cách lật ngược một vài lần. Sau đó, mẫu này được ly tâm ở 330 x g trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng (1215 vòng/phút trong Beckman Allegra 6R) và hút ra càng nhiều dịch nổi càng tốt ma không làm xáo trộn viên. Viên tế bào được làm rời ra bằng ống thử nghiệm có xoáy nhẹ và các tế bào được tạo huyền phù lại trong RPMI+10% FBS+pen/strep (~1 ml/10ml thể tích máu nguyên chất bắt đầu). 60µl mẫu được pipet vào bình mẫu (Beckman Coulter) với 600µl chất phản ứng VersaLyse (Beckman Coulter Cat# A09777) và được xoáy nhẹ nhàng trong thời gian từ 10 đến 15 giây. Mẫu này được phép ủ trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng và được trộn lại trước khi tiếp tục. Huyền phù của tế bào được đếm trên thiết bị phân tích sức sống của tế bào Vicell XR (Beckman Coulter) bằng cách sử dụng dạng tế bào PBMC (nhân tố pha loãng 1:11 được bảo quản bằng các thông số khác). Tế bào sống/ml và sức sống được ghi nhận. Huyền phù của tế bào được pha loãng đến 1 x 10^7 PBMC sống/ml trong RPMI+ 10% FBS+pen/strep.

Các tế bào được cho vào đĩa ở 5 x 10^5 trong 50µl/lỗ của đĩa nuôi cấy mô có 96 lỗ (Falcon Microtest). 50µl/lỗ chứa 2x nồng độ oligo/đối chứng đã được pha loãng trong RPMI+10% FBS+pen/strep. được bổ sung theo tấm mẫu thử nghiệm (tổng 100µl/lỗ). Các đĩa được đặt lên máy rung và được phép trộn trong khoảng 1 phút. Sau khi được ủ trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 37°C; CO_2 5%, các đĩa này được ly tâm ở 400 x g trong thời gian 10 phút trước khi loại bỏ dịch nổi trong thử nghiệm xytokin MSD (tức là người IL-6, IL-10, IL-8 và MCP-1).

Ví dụ 24: Sự đánh giá về tác động gây viêm trong thử nghiệm hPBMC đối với các ASO tiếp hợp $GalNAc_3$-1

Các oligonucleotit đối nghĩa (ASOs) được liệt kê trong Bảng 17 được đánh giá về tác động gây viêm trong thử nghiệm hPBMC bằng cách sử dụng cách được bộc lộ trong Ví dụ 23. ISIS 353512 là chất chuẩn trong đã biết là bộ đáp ứng cao để giải phóng IL-6

trong thử nghiệm này. hPBMC được phân lập từ người cho tình nguyện mới và xử lý bằng các ASO ở nồng độ 0μM, 0,0128μM, 0,064μM, 0,32μM, 1,6μM, 8μM, 40μM và 200μM. Sau 24 giờ xử lý, lượng xytokin được đo.

Lượng IL-6 được dùng làm dữ liệu đầu tiên. EC_{50} và E_{max} được tính bằng cách áp dụng các quy trình chuẩn. Các kết quả được biểu hiện là tỷ lệ trung bình của E_{max}/EC_{50} từ hai người cho và được biểu thị là "E_{max}/EC_{50}". Tỷ lệ thấp hơn biểu thị mức giảm tương ứng trong phản ứng gây viêm và tỷ lệ cao hơn biểu thị mức tăng tương ứng trong phản ứng gây viêm.

Liên quan đến các hợp chất thử nghiệm, hợp chất gây viêm nhỏ nhất là PS/PO được liên kết ASO (ISIS 616468). ASO đã tiếp hợp $GalNAc_3$-1, ISIS 647535 ít gây viêm hơn so với ISIS 304801 bản sao không tiếp hợp của nó. Các kết quả này cho thấy rằng kết hợp một số liên kết PO làm giảm phản ứng gây viêm và bổ sung thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 không tạo ra hợp chất gây viêm nhiều hơn và có thể giảm phản ứng gây viêm. Do đó, có một mong muốn là hợp chất đối nghĩa chứa cả các liên kết PS/PO hỗn hợp và thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 sẽ gây ra các phản ứng gây viêm thấp hơn so với hợp chất đối nghĩa được liên kết PS đầu đủ có hoặc không có thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1. Các kết quả này cho thấy rằng các hợp chất đối nghĩa đã tiếp hợp $GalNAc_3$-1, cụ thể các hợp chất này có hàm lượng PS giảm sẽ ít gây viêm.

Đồng thời, các kết quả này ám chỉ rằng hợp chất đã tiếp hợp $GalNAc_3$-1, cụ thể hợp chất với hàm lượng PS giảm, có thể được dùng với liều lượng cao hơn so với bản sao của hợp chất đối nghĩa của PS đầy đủ không có thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1. Do thời gian bán tồn không được mong đợi là gần như khác nhau với các hợp chất này, nên việc sử dụng cao hơn sẽ dẫn đến sự định lượng ít hơn. Thực vậy, việc sử dụng này thậm chí có thể là ít hơn, vì các hợp chất đã tiếp hợp $GalNAc_3$-1 có hiệu nghiệm nhiều hơn (xem các Ví dụ từ 20 đến 22) và việc định lượng lại là cần thiết khi nồng độ của hợp chất được giảm xuống dưới mức mong muốn, khi lượng mong muốn là dựa trên cơ sở hiệu nghiệm.

Bảng 17
Các ASO cải biến

ASO	Trình tự (5' đến 3')	Đích	SEQ ID No.
ISIS	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}G_{ds}$	TNFα	24

104838	$A_{ds}G_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$		
ISIS 353512	$T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $G_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}G_{es}G_{e}$	CRP	25
ISIS 304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}\ T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	ApoC III	20
ISIS 647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_{3}-1_{a}$	ApoC III	21
ISIS 616468	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{e}$	ApoC III	20

Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE; "d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "k" biểu thị 6'-(*S*)-CH_3 nucleosit hai vòng (ví dụ, cEt); "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit (PS); "o" biểu thị các liên kết phosphođieste giữa nucleosit (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. Chỉ số trên "m" biểu thị các 5-metylxytosin. "**A$_{do'}$**-GalNAc$_{3}$-**1$_{a}$**" biểu thị thể tiếp hợp có cấu trúc GalNAc$_{3}$-**1** thể hiện trong Ví dụ 9 được gắn vào đầu tận cùng 3' của oligonucleotit đối nghĩa, như nêu trên.

Bảng 18

Tác động gây viêm của các ASO hướng đích ApoC III trong thử nghiệm hPBMC

ASO	C_{50} (μM)	E_{max} (μM)	E_{max}/EC_{50}	Thể tiếp hợp 3'	Liên kết giữa nucleosit/Chiều dài	SEQ ID No.
ISIS 353512 (bộ đáp ứng cao)	0,01	265,9	26,590	Không	PS/20	25
ISIS 304801	0,07	106,55	1,522	Không	PS/20	20
ISIS 647535	0,12	138	1,150	GalNAc$_{3}$-**1**	PS/20	21
ISIS 616468	0,32	71,52	224	Không	PS/PO/20	20

Ví dụ 25: Tác động của ASO cải biến tiếp hợp GalNAc$_{3}$-1 hướng đích ApoC III của người *in vitro*

ISIS 304801 và 647535 nêu trên được thử *in vitro*. Các tế bào gan ban đầu từ chuột nhắt chuyển gen ở mật độ 25.000 tế bào mỗi lỗ được xử lý bằng các oligonucleotit

cải biến với nồng độ 0,03μM, 0,08μM, 0,24μM, 0,74μM, 2,22μM, 6,67μM và 20μM. Sau giai đoạn điều trị trong khoảng thời gian 16 giờ, ARN phân lập được từ các tế bào và lượng ARN thông tin được đo theo PCR thời gian thực và lượng ARN thông tin của hApoC III được điều chỉnh theo tổng hàm lượng ARN, như đo được bởi RIBOGREEN.

IC_{50} được tính bằng cách áp dụng các phương pháp chuẩn và các kết quả được thể hiện trong Bảng 19. Như được thể hiện, hiệu quả tương đương được quan sát thấy ở tế bào đã được xử lý bằng ISIS 647535 so với đối chứng, ISIS 304801.

Bảng 19

ASO được cải biến của ApoC III hướng đích của người ở các tế bào gan ban đầu

ASO	IC_{50} (μM)	Thể tiếp hợp 3'	Liên kết giữa nucleosit/Chiều dài	SEQ ID No.
ISIS 304801	0,44	Không	PS/20	20
ISIS 647535	0,31	$GalNAc_3$-1	PS/20	21

Trong thử nghiệm này, các lợi ích về sự hiệu nghiệm lớn của thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 quan sát được *in vivo* không quan sát được *in vitro*. Các thử nghiệm hấp thu tự do tiếp theo trong các tế bào gan ban đầu *in vitro* không thể hiện mức hiệu nghiệm tăng của các oligonucleotit chứa các thể tiếp hợp GalNAc khác so với các oligonucleotit mà không có thể tiếp hợp GalNAc. (xem các Ví dụ 60, 82, và 92)

Ví dụ 26: Tác động của các liên kết PO/PS đến hoạt tính ASO của ApoC III

Chuột nhắt chuyển gen có ApoC III của người được tiêm trong khoang màng bụng một lần với 25mg/kg ISIS 304801, hoặc ISIS 616468 (cả hai chất nêu trên) hoặc với đối chứng đã được xử lý bằng PBS một lần mỗi tuần trong hai tuần. Nhóm điều trị bệnh bao gồm 3 động vật và nhóm đối chứng bao gồm 4 động vật. Trước khi điều trị cũng như sau khi dùng liều cuối cùng, máu được lấy từ mỗi con chuột và các mẫu huyết tương được phân tích. Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng.

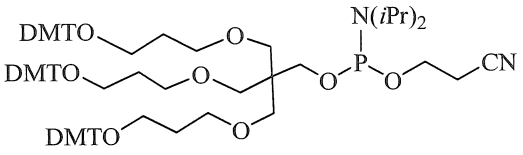
Các mẫu được gom và phân tích để xác định lượng protein của ApoC III ở gan như trên (theo Ví dụ 20). Dữ liệu từ các sự phân tích này được thể hiện trong Bảng 20, dưới đây.

Các kết quả này thể hiện mức giảm về sự hiệu nghiệm đối với các hợp chất đối nghĩa có PO/PS (ISIS 616468) trong các cánh so với PS đầy đủ (ISIS 304801).

Bảng 20
Tác động của việc điều trị bằng ASO trên lượng protein của ApoC III ở chuột nhắt chuyển gen có ApoC III của người

ASO	Liều lượng (mg/kg)	% PBS	Thể tiếp hợp 3'	Liên kết giữa nucleosit/Chiều dài	SEQ ID No.
PBS	0	99	-	--	
ISIS 304801	25mg/kg/tuần trong 2 tuần	24	Không	PH đầy đủ	20
ISIS 616468	25mg/kg/tuần trong 2 tuần	40	Không	14 PS/6 PO	20

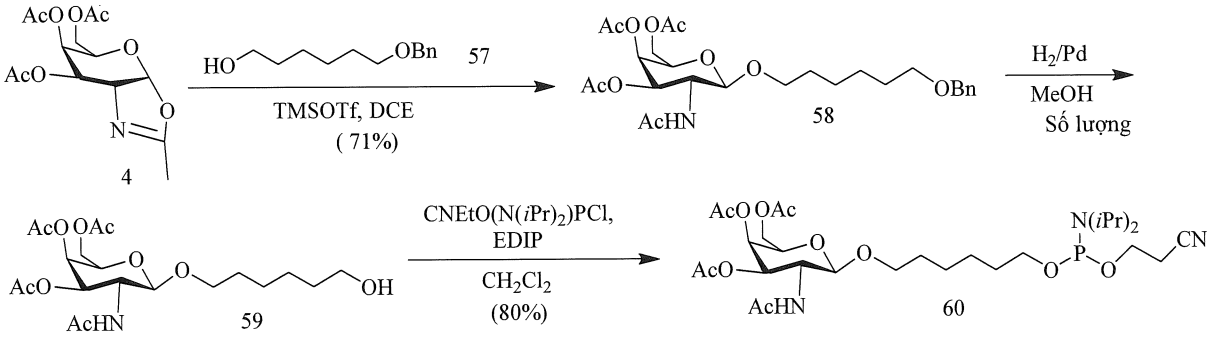
Ví dụ 27: Hợp chất có công thức 56



56

Hợp chất có công thức 56 có thể mua được từ Glen Research hoặc có thể được điều chế theo các quy trình đã được công bố được thông báo bởi Shchepinov *và các đồng tác giả, Nucleic Acids Research,* 1997, *25(22)*, 4447-4454.

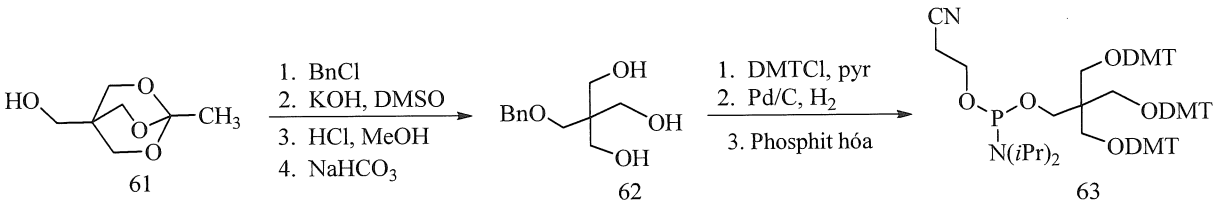
Ví dụ 28: Điều chế hợp chất 60



Hợp chất có công thức 4 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 2. Hợp chất có công thức 57 có bán trên thị trường. Hợp chất 60 được xác nhận theo phân tích cấu trúc.

Hợp chất có công thức 57 được hiểu là đại diện và không được dự định để giới hạn ở điol alkyl được thế hoặc không được thế đơn bảo vệ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các hợp chất được thể hiện trong bản mô tả này có thể được dùng để điều chế các phosphoramiđit có dược phẩm định trước.

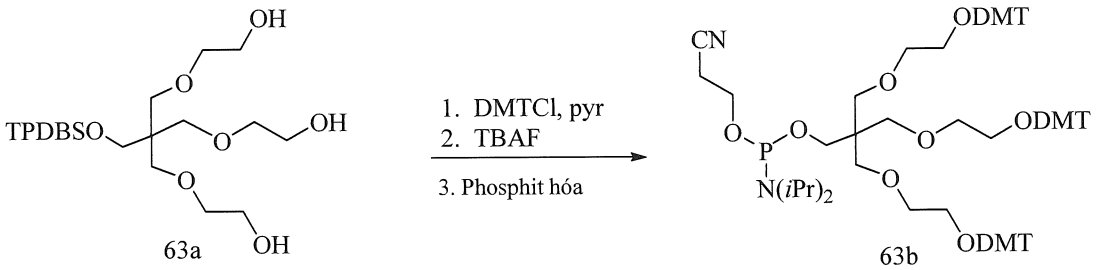
Ví dụ 29: Điều chế hợp chất 63



Các hợp chất 61 và 62 được điều chế bằng cách áp dụng các quy trình tương tự quy trình được thông báo bởi Tober *và các đồng tác giả, Eur. J. Org. Chem.,* 2013, *3,* 566-577; và Jiang *và các đồng tác giả, Tetrahedron,* 2007, *63(19),* 3982-3988.

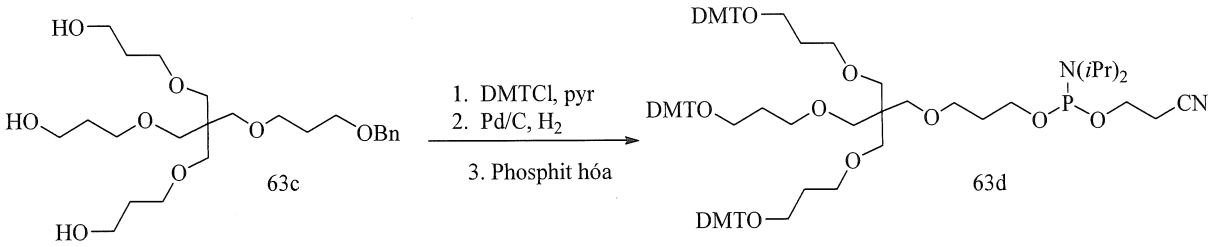
Theo cách khác, hợp chất 63 được điều chế bằng cách áp dụng các quy trình tương tự quy trình đã được báo cáo khoa học và tài liệu sáng chế của Kim *và các đồng tác giả, Synlett,* 2003, *12,* 1838-1840; và Kim *và các đồng tác giả,* đã được công bố đơn quốc tế, WO 2004063208.

Ví dụ 30: Điều chế hợp chất 63b



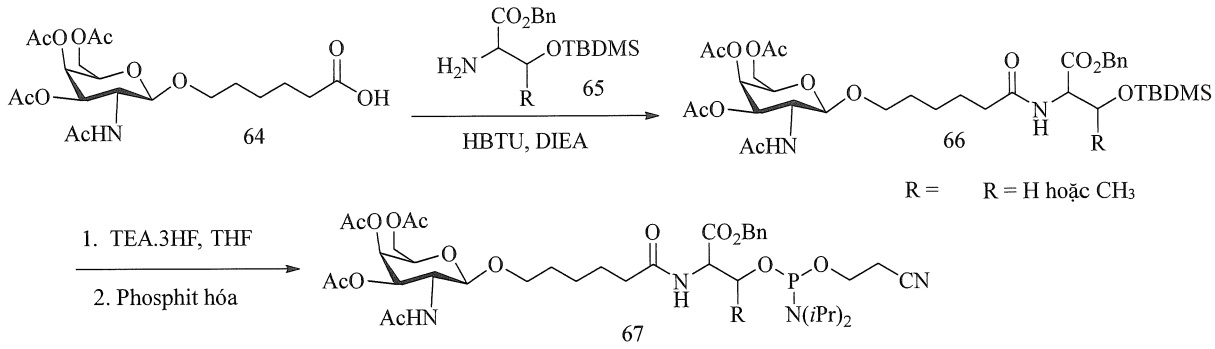
Hợp chất 63a được điều chế bằng cách áp dụng các quy trình tương tự quy trình được thông báo bởi Hanessian *và các đồng tác giả, Canadian Journal of Chemistry,* 1996, *74(9),* 1731 - 1737.

Ví dụ 31: Điều chế hợp chất 63d



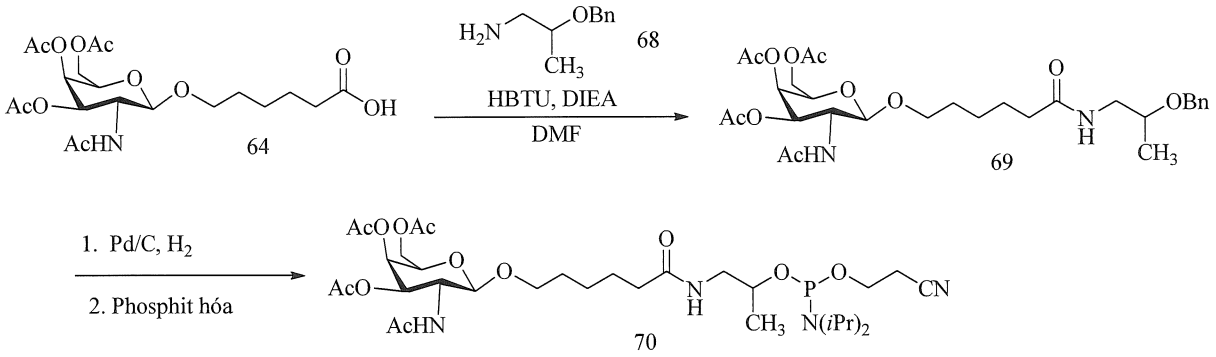
Hợp chất 63c được điều chế bằng cách áp dụng các quy trình tương tự quy trình được thông báo bởi Chen *và các đồng tác giả, Chinese Chemical Letters,* 1998, *9(5),* 451 - 453.

Ví dụ 32: Điều chế hợp chất 67



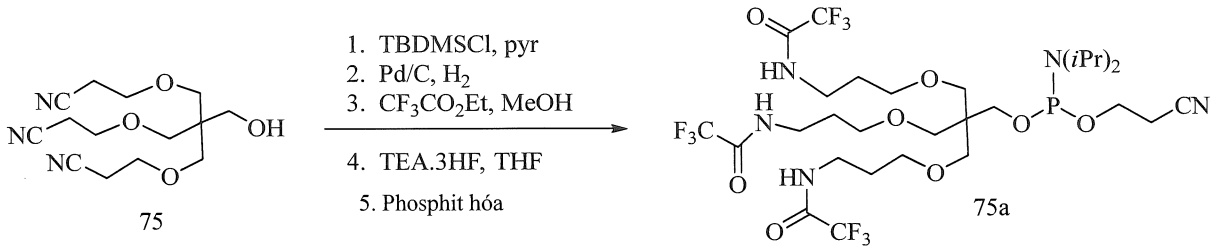
Hợp chất 64 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 2. Hợp chất 65 được điều chế bằng cách áp dụng các quy trình tương tự quy trình được thông báo bởi Or *và các đồng tác giả,* đã được công bố đơn Quốc tế, WO 2009003009. Các nhóm bảo vệ được sử dụng cho Hợp chất 65 nhằm làm đại diện và không được dự định để giới hạn ở các nhóm bảo vệ khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm được thể hiện trong bản mô tả này có thể được sử dụng.

Ví dụ 33: Điều chế hợp chất có công thức 70



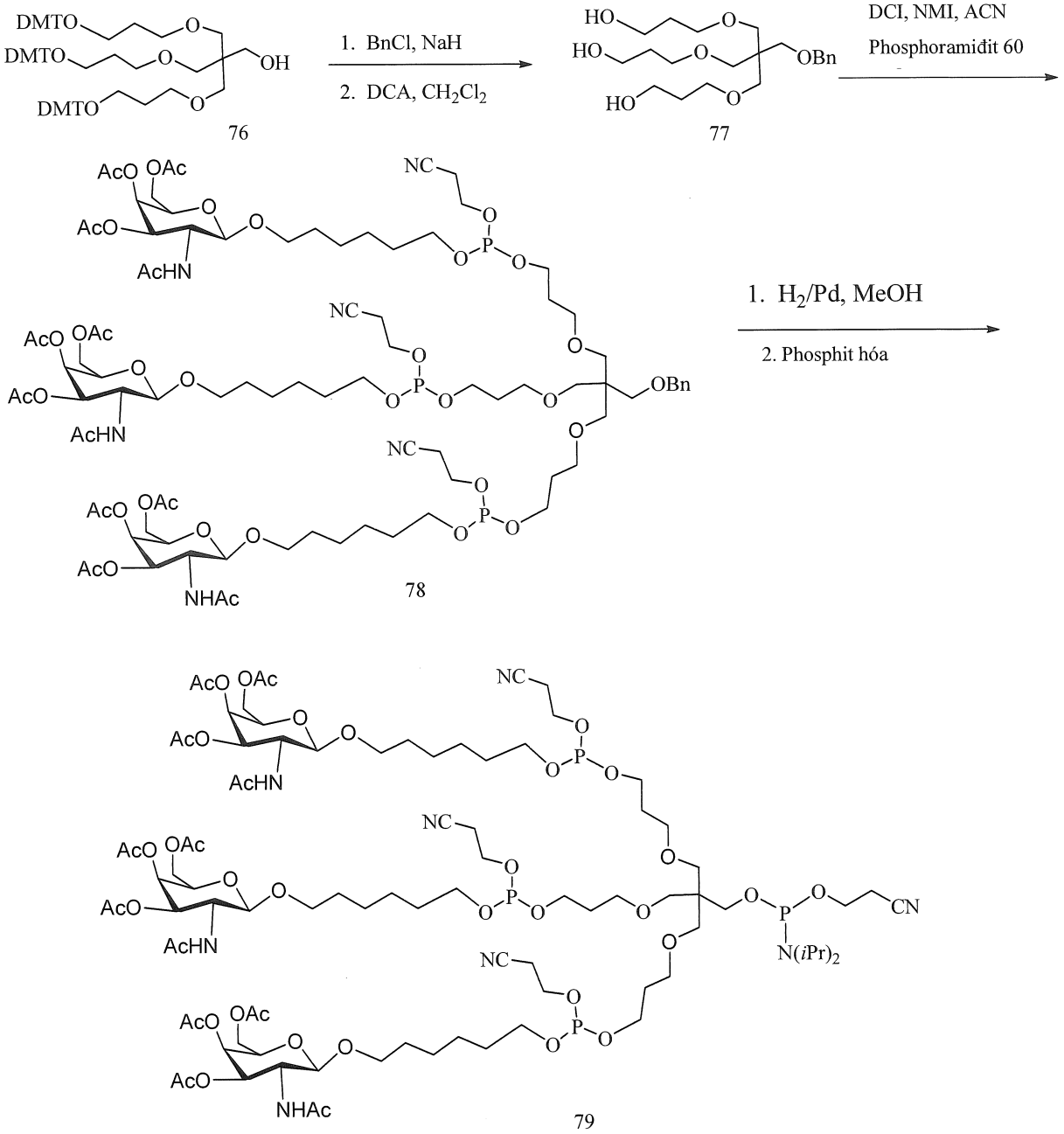
Hợp chất 64 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 2. Hợp chất 68 có bán trên thị trường. Nhóm bảo vệ được sử dụng cho Hợp chất 68 được hiểu là đại diện và không được dự định để giới hạn ở các nhóm bảo vệ khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm được thể hiện trong bản mô tả này có thể được sử dụng.

Ví dụ 34: Điều chế hợp chất có công thức 75a



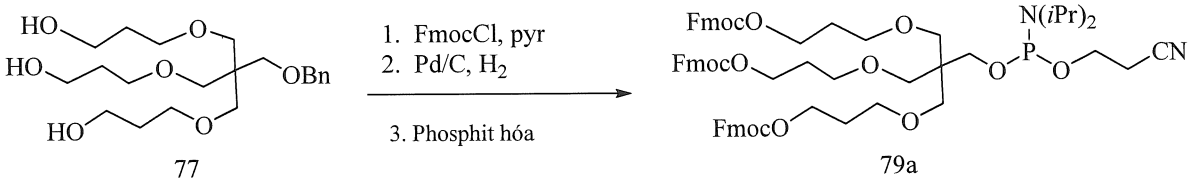
Hợp chất có công thức 75 được điều chế theo các quy trình đã được công bố được thông báo bởi Shchepinov *và các đồng tác giả, Nucleic Acids Research,* 1997, *25(22)*, 4447-4454.

Ví dụ 35: Điều chế hợp chất có công thức 79



Hợp chất có công thức 76 được điều chế theo các quy trình đã được công bố được thông báo bởi Shchepinov *và các đồng tác giả, Nucleic Acids Research,* 1997, *25(22)*, 4447-4454.

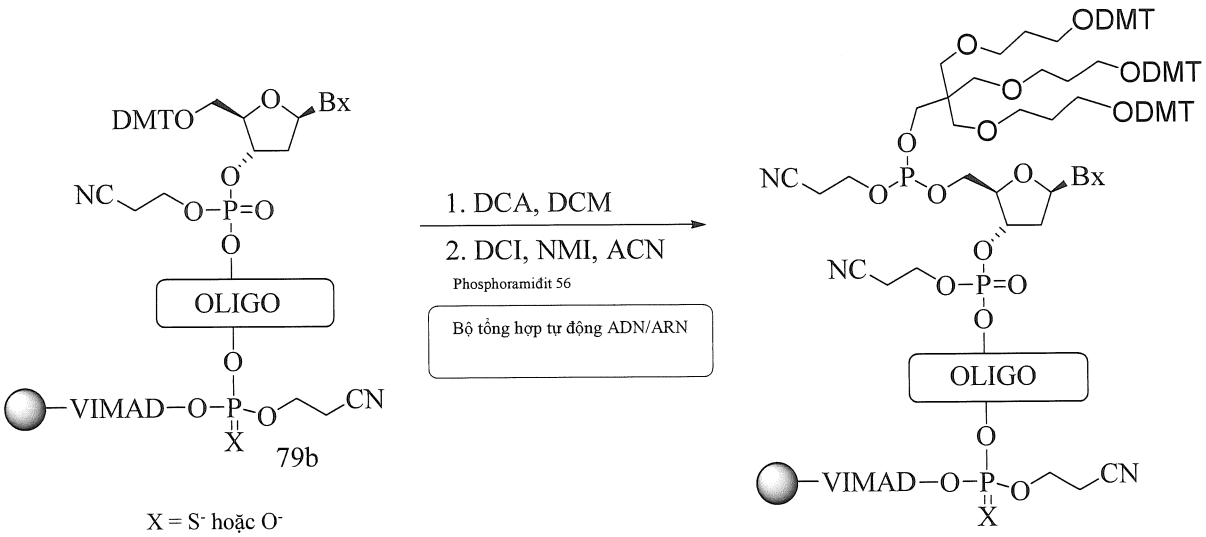
Ví dụ 36: Điều chế hợp chất có công thức 79a



77 79a

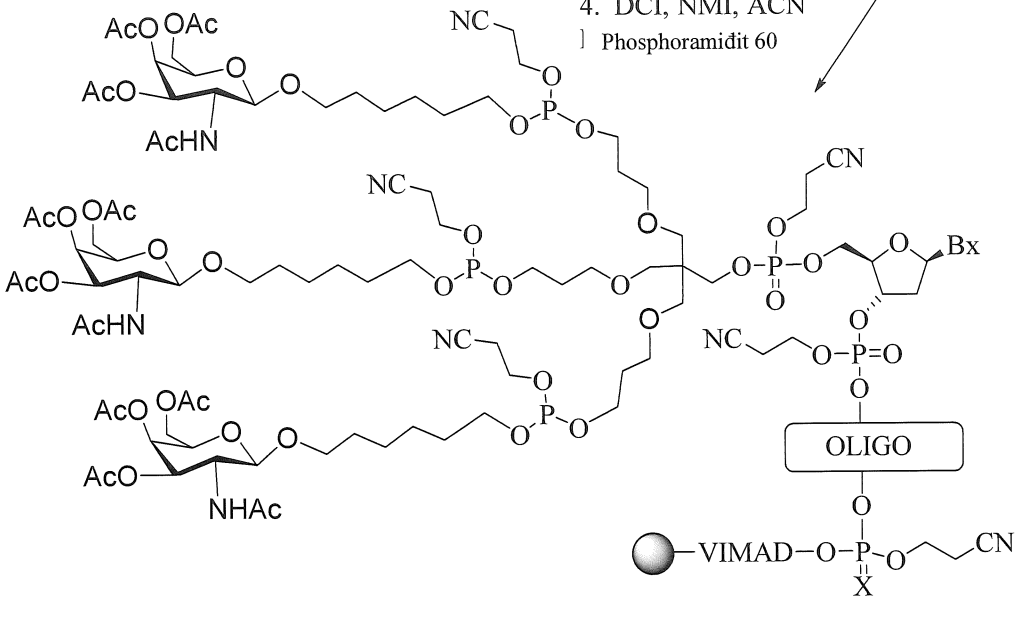
Hợp chất có công thức 77 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 35.

Ví dụ 37: Phương pháp chung để điều chế hợp chất oligome đã tiếp hợp có công thức 82 chứa phosphođieste được liên kết thể tiếp hợp $GalNAc_3$-2 ở đầu tận cùng 5' qua nền rắn (phương pháp I)

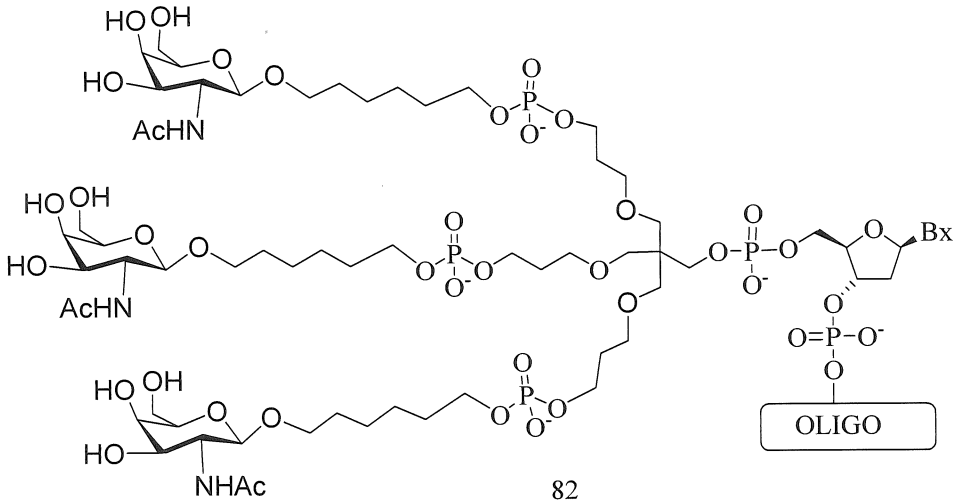


X = S^- hoặc O^-
Bx = bazơ dị vòng

1. Phủ (Ac_2O, NMI, pyr)
2. t-BuOOH
3. DCA, DCM
4. DCI, NMI, ACN
] Phosphoramiđit 60

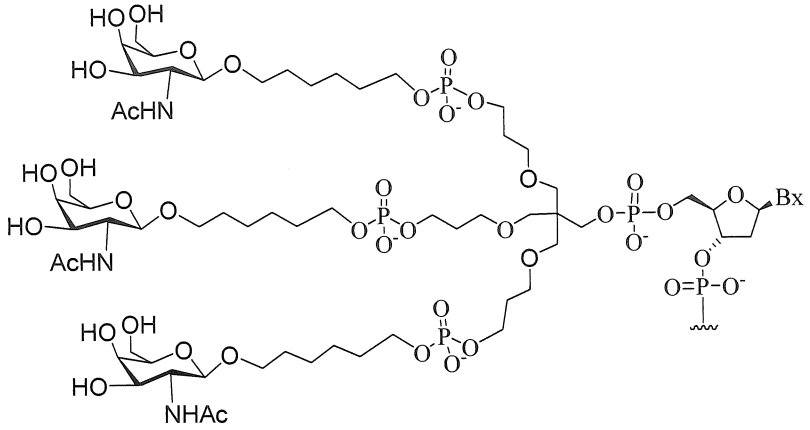


1. Phủ (Ac_2O, NMI, pyr)
2. t-BuOOH
3. 20% Et_2NH trong Toluen (thể tích)
4. NH_4, 55^0C

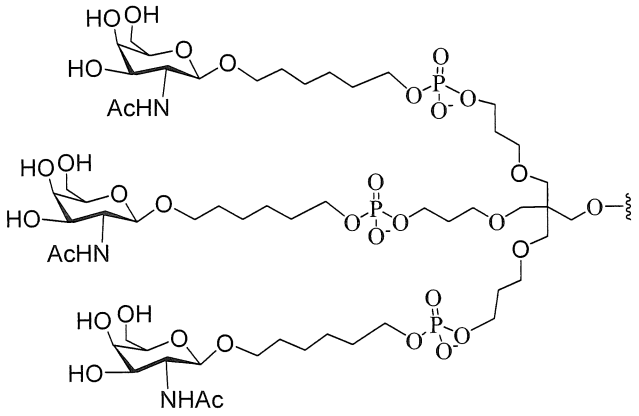


82

trong đó GalNAc$_3$-2 có cấu trúc:

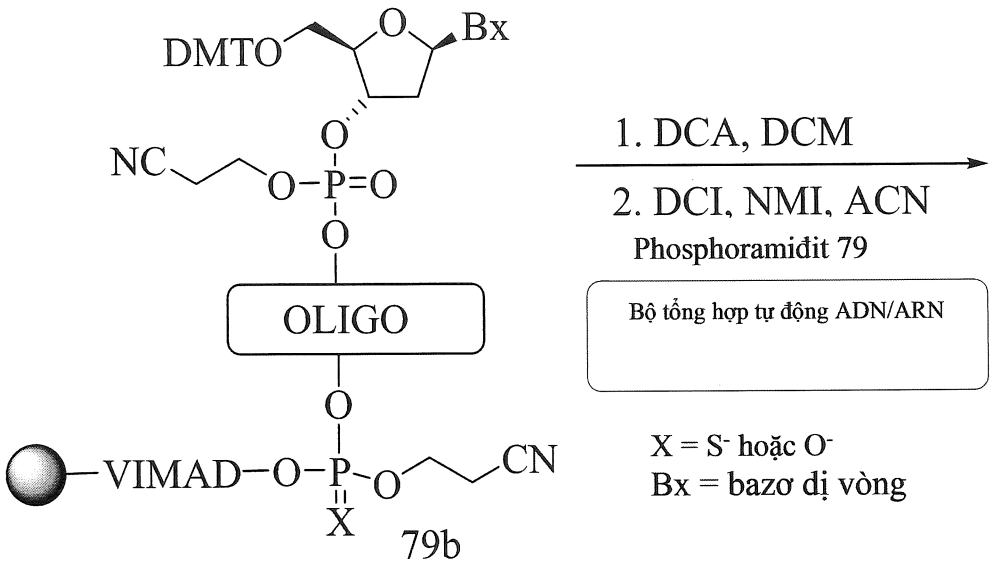


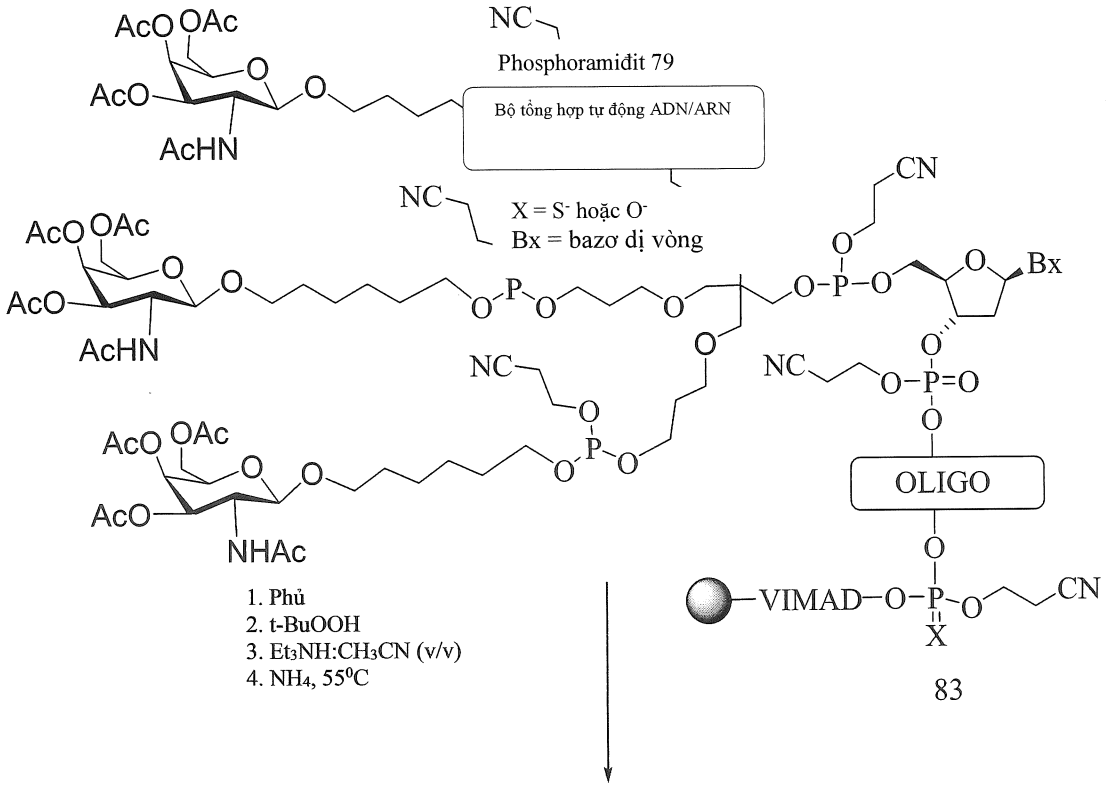
Phần cụm GalNAc$_3$ của nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-2 (GalNAc$_3$-2$_a$) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Trong đó GalNAc$_3$-2$_a$ có công thức sau:



Hợp chất oligome có VIMAD liên kết có công thức 79b được điều chế bằng cách áp dụng các quy trình chuẩn để tổng hợp ADN/ARN tự động (xem tài liệu Dupouy *et al., Angew. Chem. Int. Ed.,* 2006, *45,* 3623-3627). Các hợp chất phosphoramiđit có công thức 56 và 60 lần lượt được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 27 và 28. Các phosphoramiđit được thể hiện nhằm đại diện và không được dự định để giới hạn ở các đơn thể của phosphoramiđit khác bao gồm nhưng không giới hạn ở chất được thể hiện trong bản mô tả này có thể được dùng để điều chế hợp chất oligome có phosphođieste được liên kết nhóm tiếp hợp ở đầu tận cùng 5'. Thứ tự và số lượng của các phosphoramiđit được bổ sung vào nền rắn có thể được điều chỉnh để điều chế các hợp chất oligome như được bộc lộ trong bản mô tả này có trình tự bất kỳ và thành phần định trước.

Ví dụ 38: Phương pháp khác để điều chế hợp chất oligome có công thức 82 chứa phosphođieste được liên kết thể tiếp hợp $GalNAc_3$-2 ở đầu tận cùng 5' (phương pháp II)



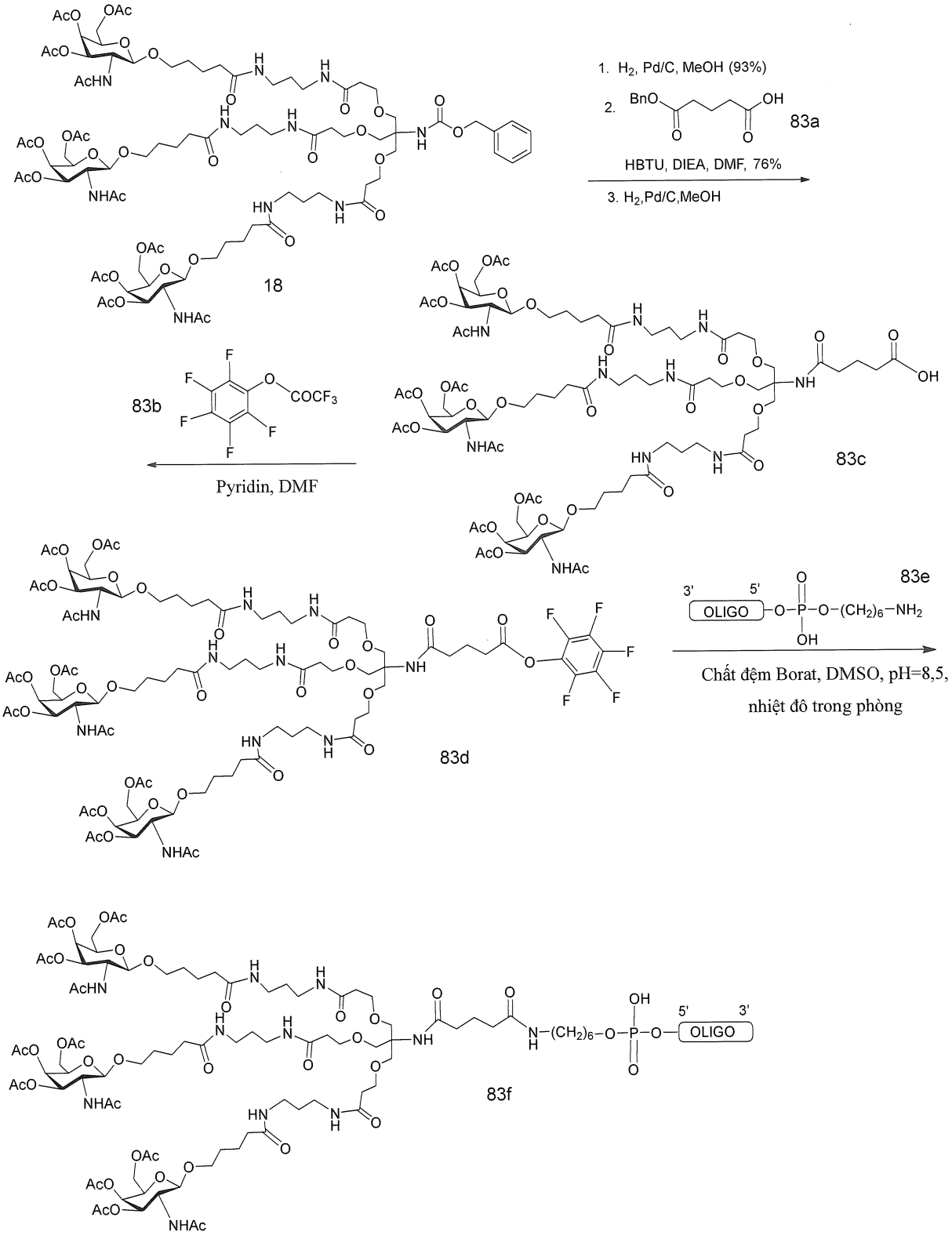


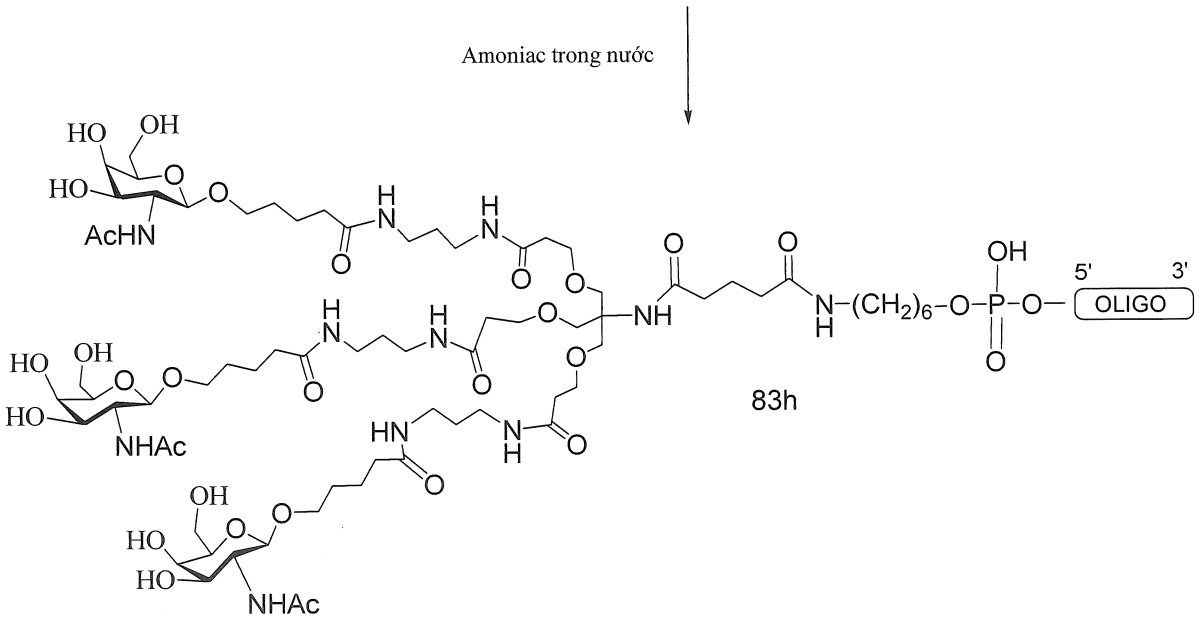
Hợp chất oligome 82

Hợp chất oligome có VIMAD liên kết có công thức 79b được điều chế bằng cách áp dụng các quy trình chuẩn để tổng hợp ADN/ARN tự động (xem tài liệu Dupouy *et al., Angew. Chem. Int. Ed.,* 2006, *45,* 3623-3627). Phosphoramiđit cụm $GalNAc_3$-2, hợp chất có công thức 79 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 35. Phương pháp khác này cho phép dùng một bước phosphođieste được liên kết thể tiếp hợp $GalNAc_3$-2 vào hợp chất oligome ở bước cuối cùng của quy trình tổng hợp. các phosphoramiđit được thể hiện nhằm đại diện và không được dự định để giới hạn, như các đơn thể của phosphoramiđit khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hợp chất được thể hiện trong bản mô tả này có thể được dùng để điều chế các hợp chất oligome có phosphođieste thể tiếp hợp ở đầu tận cùng 5'. Thứ tự và số lượng phosphoramiđit được

bổ sung vào nền rắn có thể được điều chỉnh để điều chế các hợp chất oligome như được bộc lộ trong bản mô tả này có trình tự bất kỳ và thành phần định trước.

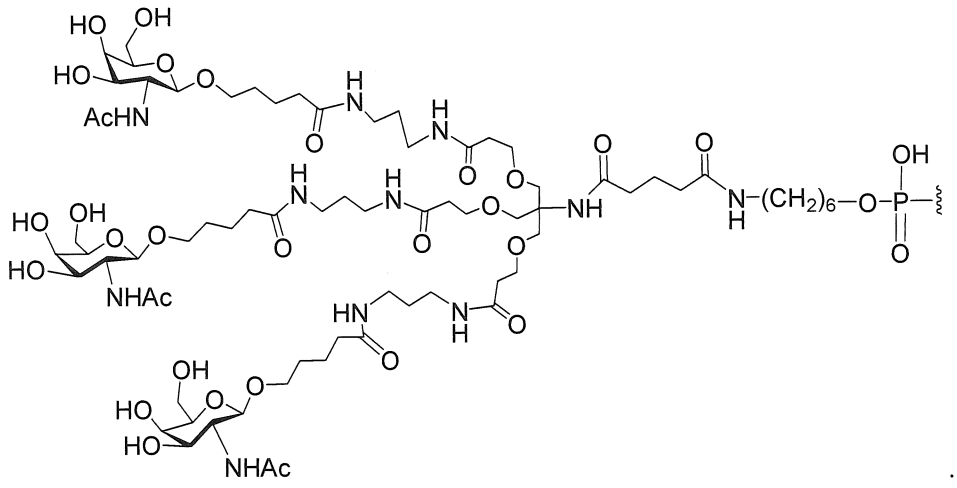
Ví dụ 39: Phương pháp chung để điều chế hợp chất oligome có công thức 83h chứa thể tiếp hợp $GalNAc_3$-3 ở đầu tận cùng 5' ($GalNAc_3$-1 được cải biến ở đầu gắn 5') *qua* nền rắn


1. H2, Pd/C, MeOH (93%)
2.
BnO
OH
83a
HBTU, DIEA, DMF, 76%
3. H2,Pd/C,MeOH
18
83b
COCF3
Pyridin, DMF
83c
83d
83e
3'
5'
OLIGO
O-P-O-(CH2)6-NH2
OH
Chất đệm Borat, DMSO, pH=8,5,
nhiệt đô trong phòng
83f
N-(CH2)6-O-P-O-OLIGO

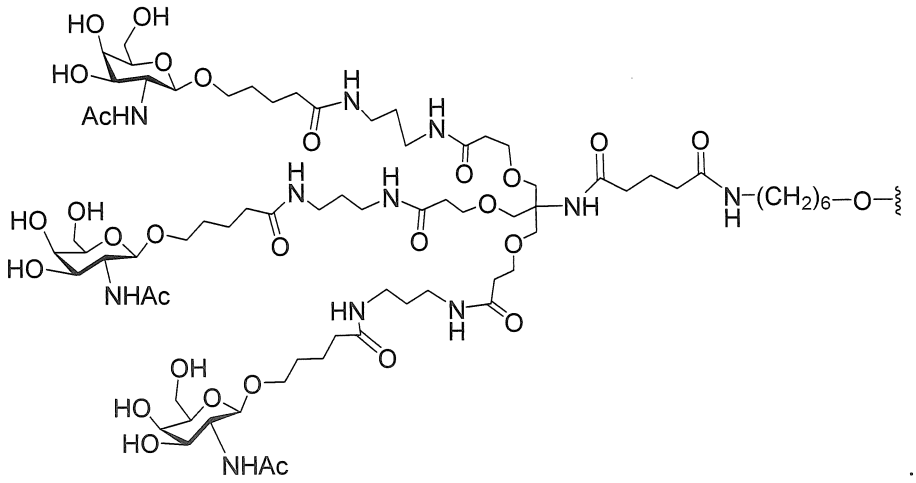


Hợp chất có công thức 18 được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 4. Các hợp chất có công thức 83a và 83b có thể mua được trên thị trường. Hợp chất oligome có công thức 83e chứa phosphođieste được liên kết hexylamin được điều chế bằng cách sử dụng các quy trình tổng hợp oligonucleotit tiêu chuẩn. điều trị được bảo vệ Hợp chất oligome có amoniac trong nước tạo ra hợp chất oligome đã tiếp hợp 5'-GalNAc$_3$-3 có công thức (83h).

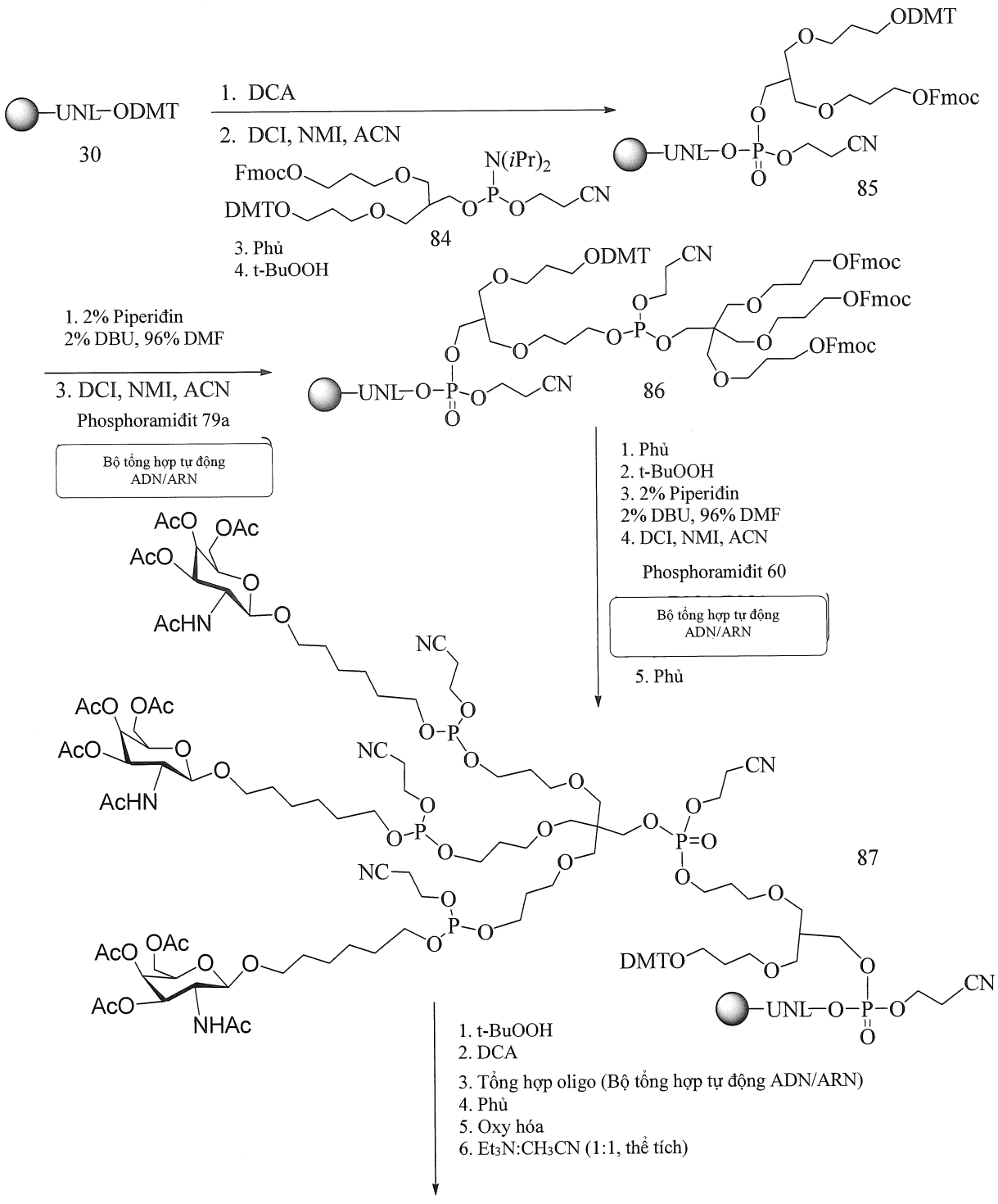
Trong đó GalNAc$_3$-3 có cấu trúc:

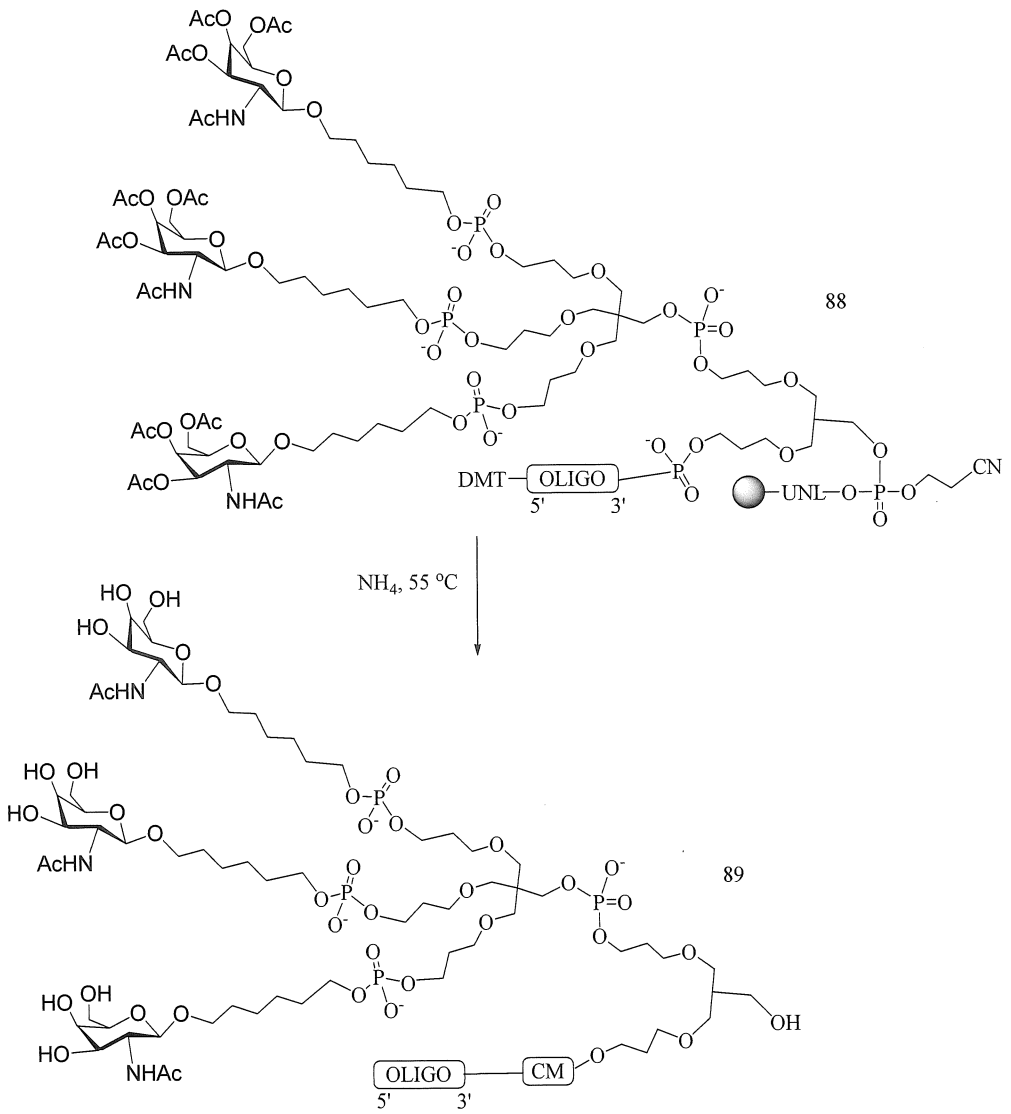


Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-3 (GalNAc$_3$-3$_a$) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Trong đó GalNAc$_3$-3$_a$ có công thức sau:

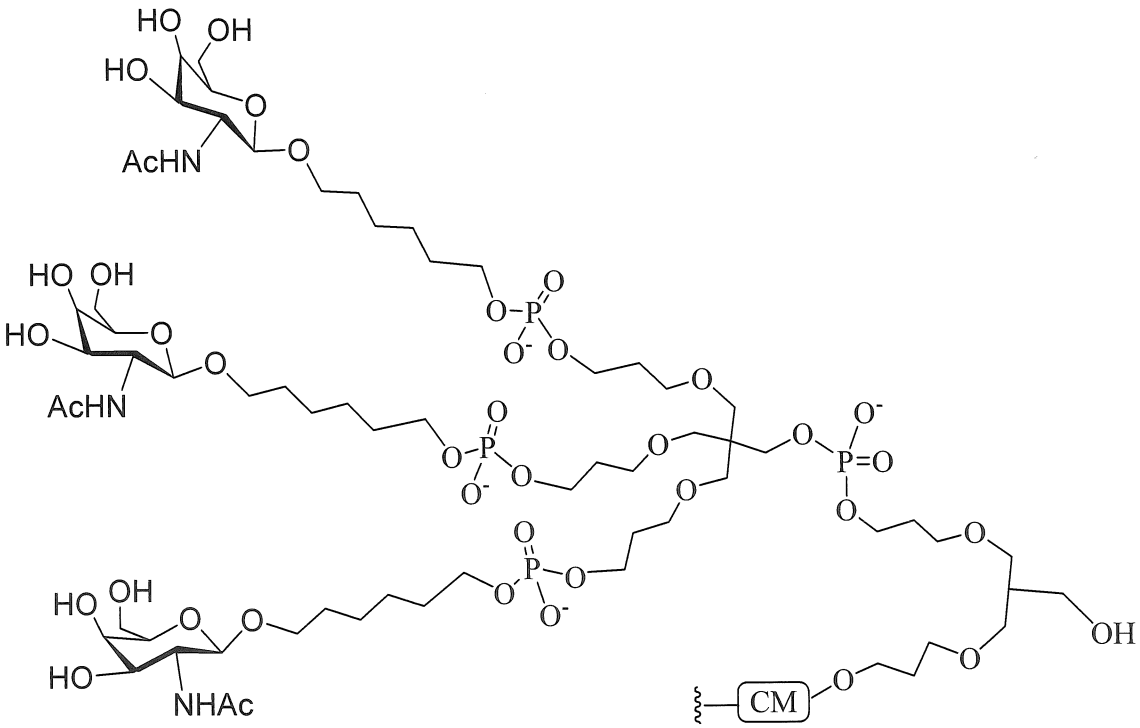


Ví dụ 40: Phương pháp chung để điều chế hợp chất oligome có công thức 89 chứa phosphođieste được liên kết thể tiếp hợp $GalNAc_3$-4 ở đầu tận cùng 3' *qua nền rắn*

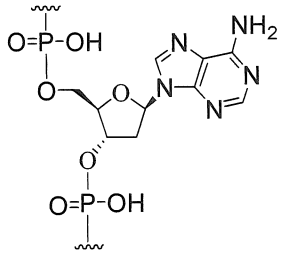



AcO
OAc
AcHN
DMT
OLIGO
5'
3'
UNL
CN
88
NH4, 55 °C
HO
OH
NHAc
CM
89

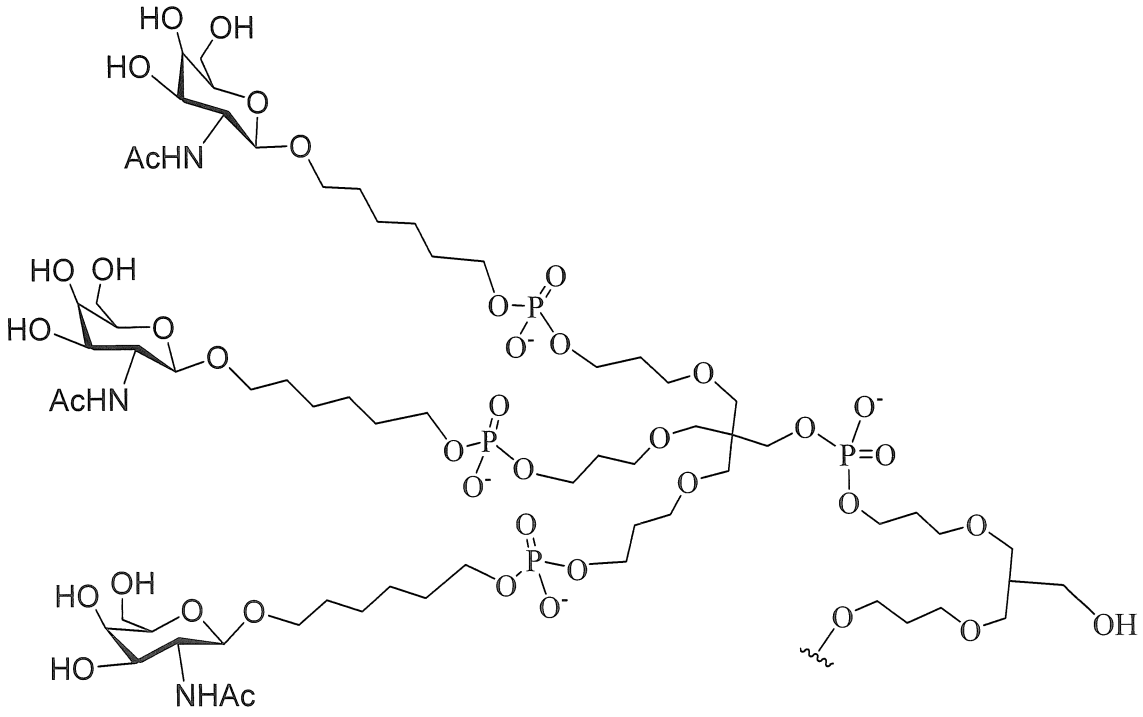
Trong đó GalNAc$_3$-4 có cấu trúc:



Trong đó CM là gốc phân cắt được. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là:



Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-4 (GalNAc$_3$-4$_a$) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Trong đó GalNAc$_3$-4$_a$ có công thức sau:



Hợp chất nền rắn được chức hóa Unylinker được bảo vệ có công thức 30 có bán trên thị trường. Hợp chất có công thức 84 được điều chế bằng cách áp dụng các quy trình tương tự quy trình được báo cáo trong tài liệu (*xem tài liệu* Shchepinov *et al., Nucleic Acids Research,* 1997, *25(22)*, 4447-4454; Shchepinov *et al., Nucleic Acids Research,* 1999, *27*, 3035-3041; và Hornet *et al., Nucleic Acids Research,* 1997, *25*, 4842-4849).

Các đơn thể của phosphoramiđit, Các hợp chất 60 và 79a được điều chế theo các quy trình được thể hiện trong Ví dụ 28 và 36. Các phosphoramiđit được thể hiện nhằm đại diện và không được dự định để giới hạn ở các đơn thể của phosphoramiđit khác có thể được dùng để điều chế hợp chất oligome có phosphođieste được liên kết thể tiếp hợp ở đầu tận cùng 3' với trình tự và thành phần định trước. Thứ tự và số lượng của các phosphoramiđit được bổ sung vào nền rắn có thể được điều chỉnh để điều chế các hợp chất oligome như được bộc lộ trong bản mô tả này có trình tự bất kỳ và thành phần định trước.

Ví dụ 41: Phương pháp chung để điều chế các ASO chứa phosphođieste được liên kết $GalNAc_3$-2 (xem Ví dụ 37, Bx là ađenin) thể tiếp hợp ở vị trí 5' theo kỹ thuật pha rắn

(điều chế ISIS 661134)

Trừ khi có quy định khác, tất cả các chất phản ứng và dung dịch được sử dụng cho quy trình tổng hợp các hợp chất oligome được mua từ các nguồn thương mại. Các đơn thể của phosphoramiđit tiêu chuẩn và nền rắn được sử dụng cho các gốc nucleosit kết hợp mà bao gồm chứng hạn các gốc T, A, G, và mC. Các hợp chất phosphoramiđit có công thức 56 và 60 được sử dụng để tổng hợp phosphođieste được liên kết thể tiếp hợp $GalNAc_3$-2 ở đầu tận cùng 5'. Dung dịch 0,1M chứa phosphoramiđit trong axetonitril khan được sử dụng cho β-D-2'-đeoxyribonucleosit và 2'-MOE.

Quy trình tổng hợp ASO được thực hiện trên bộ tổng hợp ABI 394 (quy mô 1μmol đến 2μmol) hoặc trên bộ tổng hợp GE Healthcare Bioscience ÄKTA oligopilot (quy mô 40μmol đến 200μmol) bằng phương pháp liên hợp phosphoramiđit trên nền rắn VIMAD (110μmol/g, Guzaev *et al.*, 2003) được đóng trong cột. Đối với bước liên hợp, các phosphoramiđit được phân phối dư 4 lần so với tải nạp nền rắn và phosphoramiđit liên hợp được thực hiện trong thời gian 10 phút. Tất cả các bước khác tiếp theo là các cách thức chuẩn do nhà sản xuất cung cấp. Dung dịch chứa axit đicloaxetic 6% trong toluen được sử dụng để loại bỏ các nhóm đimetoxytrityl (DMT) khỏi các nhóm 5'-hyđroxyl gồm nucleotit. 4,5-đixyanoimiđazol (0,7M) trong CH_3CN khan được dùng làm chất hoạt hóa trong khi bước liên hợp. Các liên kết phosphorothioat được đưa vào bằng cách sulfua hóa với dung dịch 0,1M chứa xantan hyđrua trong 1:1 pyriđin/CH_3CN trong khoảng thời gian tiếp xúc 3 phút. Dung dịch chứa 20% *tert*-butylhyđroperoxit trong CH_3CN chứa nước 6% được dùng làm tác nhân oxy hóa để tạo ra các liên kết phosphođieste giữa nucleosit với thời gian tiếp xúc 12 phút.

Sau trình tự mong muốn được tập hợp, các nhóm phosphast xyanoetyl bảo vệ được khử bảo vệ bằng cách sử dụng 20% đietylamin trong toluen (thể tích) với thời gian tiếp xúc 45 phút. Các ASO liên kết nền rắn được tạo huyền phù trong amoniac trong nước (28% đến 30% khối lượng) và đun nóng ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 6 giờ.

Sau đó, các ASO không liên kết được lọc và amoniac được làm bay hơi. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp trên cột trao đổi anion mạnh (GE Healthcare Bioscience, nguồn 30Q, 30μm, 2,54 x 8cm, A = 100mM amoni axetat trong 30% CH_3CN trong nước, B = 1,5M NaBr trong A, 0% đến 40% B trong thời gian 60

phút, lưu lượng 14mL min-1, λ = 260nM). Cặn được loại muối theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) trên cột pha đảo để tạo ra các ASO mong muốn với hiệu suất phân tách từ 15% đến 30% trên cơ sở mẻ nạp ban đầu trên nền rắn. Các ASO được đặc trưng bởi sự phân tích MS được liên hợp HPLC hai ion bằng hệ thống Agilent 1100 MSD.

Bảng 21

ASO chứa phosphođieste được liên kết thể tiếp hợp GalNAc$_3$-2 ở vị trí 5' hướng đích SRB-1

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Khối lượng tính toán	Khối lượng quan sát	SEQ ID No.
661134	GalNAc$_3$-2$_a$-$_o$'$A_{do}T_{ks}{}^mC_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^mC_k$	6482,2	6481,6	26

Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE "d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "k" biểu thị 6'-(*S*)-CH_3 nucleosit hai vòng (ví dụ, cEt); "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit (PS); "o" biểu thị các liên kết phosphođieste giữa nucleosit (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. Chỉ số trên "m" biểu thị các 5-metylxytosin. Cấu trúc của GalNAc$_3$-2$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 37.

Ví dụ 42: Phương pháp chung để điều chế các ASO chứa thể tiếp hợp GalNAc$_3$-3 ở vị trí 5' *qua* các kỹ thuật pha rắn (việc điều chế ISIS 661166)

Quy trình tổng hợp ISIS 661166 được thực hiện bằng cách áp dụng các quy trình tương tự như được minh họa trong Ví dụ 39 và 41.

ISIS 661166 là 5-10-5 MOE gapmer, trong đó vị trí 5' chứa thể tiếp hợp GalNAc$_3$-3. ASO được đặc trưng bởi phân tích MS được liên hợp HPLC hai ion bằng hệ thống Agilent 1100 MSD.

Bảng 21a

ASO chứa thể tiếp hợp GalNAc$_3$-3 ở vị trí 5' qua liên kết phosphođieste hexylamino hướng đích Malat-1

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Thể tiếp hợp	Khối lượng tính toán	Khối lượng quan sát	SEQ ID No.
661166	5'-GalNAc$_{3}$-**3**$_{a-o}$-$^{m}C_{es}G_{es}G_{es}T_{es}G_{es}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}$ $G_{es}A_{es}A_{es}T_{es}T_{e}$	**5'**-GalNAc$_{3}$-**3**	8992,16	8990,51	27

Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE; "d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit (PS); "o" biểu thị các liên kết phosphođieste giữa nucleosit (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. Chỉ số trên "m" biểu thị các 5-metylxytosin. Cấu trúc của "5'-GalNAc$_{3}$-3a" được thể hiện trong Ví dụ 39.

Ví dụ 43: Nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng của phosphođieste được liên kết GalNAc$_{3}$-2 (xem ví dụ 37 và 41, Bx là ađenin) ở đầu tận cùng 5' hướng đích đến SRB-1 *in vivo*

ISIS 661134 (xem chẳng hạn 41) chứa phosphođieste được liên kết thể tiếp hợp GalNAc$_{3}$-2 ở đầu tận cùng 5' được thử trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng đối với việc ức chế đối nghĩa của SRB-1 ở chuột nhắt. ISIS 440762 và 651900 không tiếp hợp (GalNAc$_{3}$-**1** tiếp hợp ở đầu tận cùng 3', xem Ví dụ 9) nằm trong thử nghiệm để so sánh và bộc lộ trong Bảng 4 trên đây.

Điều trị

Các con chuột nhắt Balb/c đực sáu tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được tiêm dưới da một lần ISIS 440762, 651900, 661134 với liều lượng được thể hiện dưới đây hoặc bằng đối chứng đã được xử lý bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 con chuột. Con chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều lượng cuối cùng để xác định lượng ARN thông tin của SRB-1 ở gan bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Lượng ARN thông tin của SRB-1 được xác định so với toàn bộ ARN (bằng cách sử dụng Ribogreen), trước khi chuẩn tắc hóa với đối chứng đã được xử lý bằng PBS. Các kết quả đưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng ARN thông tin của SRB-1 cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa với đối chứng đã được xử

lý bằng PBS và được biểu thị là "% PBS". ED_{50}s được đo bằng cách áp dụng các phương pháp tương tự như đã được bộc lộ trên đây và được đưa ra dưới đây.

Như được thể hiện trong Bảng 22, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của SRB-1 theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng. Thực vậy, các oligonucleotit đối nghĩa chứa phosphođieste được liên kết thể tiếp hợp $GalNAc_3$-2 ở đầu tận cùng 5' (ISIS 661134) hoặc thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 được liên kết ở đầu tận cùng 3' (ISIS 651900) thể hiện gần như nâng cao hiệu nghiệm so với đối nghĩa không được tiếp hợp của oligonucleotit (ISIS 440762). Ngoài ra, ISIS 661134, mà chứa phosphođieste được liên kết thể tiếp hợp $GalNAc_3$-2 ở đầu tận cùng 5' được đẳng thế so với ISIS 651900, mà chứa thể tiếp hợp $GalNAc_3$-**1** ở đầu tận cùng 3'.

Bảng 22
Các ASO chứa $GalNAc_3$-1 hoặc $GalNAc_3$-2 hướng đích đến SRB-1

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	SRB-1 lượng ARN thông tin (% PBS)	ED_{50} (mg/kg)	Thể tiếp hợp	SEQ ID No.
PBS	0	100	--	--	
440762	0,2	116	2,58	Không tiếp hợp	22
	0,7	91			
	2	69			
	7	22			
	20	5			
651900	0,07	95	0,26	**3'** $GalNAc_3$-**1**	23
	0,2	77			
	0,7	28			
	2	11			
	7	8			
661134	0,07	107	0,25	**5'** $GalNAc_3$-2	26
	0,2	86			
	0,7	28			
	2	10			
	7	6			

Các cấu trúc đối với 3' $GalNAc_3$-**1** và 5' $GalNAc_3$-2 được mô tả trên đây trong Ví dụ 9 và Ví dụ 37.

Phân tích dược động học(PK)

PK của các ASO từ nhóm liều lượng cao (7mg/kg) được nghiên cứu và đánh giá theo cùng cách đó như được minh họa trong Ví dụ 20. Mẫu gan được nghiền và chiết bằng cách sử dụng các cách thức chuẩn. Toàn bộ chiều dài các chất chuyển hóa của 661134 (5' $GalNAc_3$-2) và ISIS 651900 (3' $GalNAc_3$-1) được xác định và khối lượng của chúng được xác nhận bằng sự phân tích phép đo phổ khối phân giải cao. Các kết quả cho thấy rằng chất chuyển hóa chính được đo đối với ASO chứa phosphođieste được liên kết thể tiếp hợp $GalNAc_3$-2 ở đầu tận cùng 5' (ISIS 661134) là ISIS 440762 (dữ liệu không được thể hiện). Không quan sát thấy các chất chuyển hóa bổ sung với lượng có thể đo được. Không giống như bản sao của nó, các chất chuyển hóa bổ sung tương tự chất được báo cáo trên đây trong Bảng 10a được quan sát được đối với ASO có thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 ở đầu tận cùng 3' (ISIS 651900). Các kết quả này ám chỉ rằng có phosphođieste được liên kết thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 hoặc $GalNAc_3$-2 có thể nâng cao biên dạng PK của các ASO mà không ảnh hưởng đến hiệu nghiệm của chúng.

Ví dụ 44: Tác động của các liên kết PO/PS đến mức độ ức chế đối nghĩa của các ASO chứa thể tiếp hợp $GalNAc_3$-1 (xem Ví dụ 9) ở đầu tận cùng 3' hướng đích SRB-1

Mỗi ISIS 655861 và 655862 chứa thể tiếp hợp $GalNAc_3$-**1** ở đầu tận cùng 3' hướng đích SRB-1 được thử trong nghiên cứu dùng một lần về khả năng ức chế của chúng đối với SRB-1 ở chuột nhắt. Hợp chất không tiếp hợp gốc, ISIS 353382 nằm trong thử nghiệm để so sánh.

Các ASO là 5-10-5 MOE gapmer, trong đó vùng gián đoạn chứa mười 2'-đeoxyribonucleosit và mỗi vùng cách chứa năm nucleosit cải biến 2'-MOE. Các ASO được điều chế bằng cách áp dụng các phương pháp tương tự như được minh họa trên đây trong Ví dụ 19 và bộc lộ Bảng 23, dưới đây.

Bảng 23
Các ASO cải biến chứa thể tiếp hợp $GalNAc_{3}$-1 ở đầu tận cùng 3' hướng đích SRB-1

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Hóa học	SEQ ID No.
353382 (gốc)	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS đầy đủ không thể tiếp hợp	28
655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-$GalNAc_{3}$-$\mathbf{1_a}$	PS đầy đủ có thể tiếp hợp $GalNAc_{3}$-**1**	29
655862	$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-$GalNAc_{3}$-$\mathbf{1_a}$	Hỗn hợp PS/PO có thể tiếp hợp $GalNAc_{3}$-**1**	29

Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE; "d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit (PS); "o" biểu thị các liên kết phosphođieste giữa nucleosit (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. Chỉ số trên "m" biểu thị các 5-metylxytosin. Cấu trúc của "$GalNAc_{3}$-**1**" được thể hiện trong Ví dụ 9.

Điều trị

Các con chuột nhắt Balb/c đực sáu tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được tiêm dưới da một lần với liều lượng được thể hiện dưới đây bằng ISIS 353382, 655861, 655862 hoặc bằng đối chứng đã được xử lý bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 con chuột. Trước khi điều trị cũng như sau khi dùng liều cuối cùng, máu được lấy từ mỗi chuột và các mẫu huyết tương được phân tích. chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng để xác định lượng ARN thông tin của SRB-1 ở gan bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Lượng ARN thông tin của SRB-1 được xác định so với toàn bộ ARN (bằng cách sử dụng Ribogreen), trước khi chuẩn tắc hóa với đối chứng đã được xử lý bằng PBS. Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng ARN thông tin của SRB-1 cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa với đối chứng đã được xử lý bằng PBS và được biểu thị là "% PBS". ED_{50}s được

đo bằng cách áp dụng các phương pháp tương tự như đã được bộc lộ trên đây và được báo cáo dưới đây.

Như được thể hiện trong Bảng 24, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của SRB-1 theo kiểu phụ thuộc liều lượng so với đối chứng đã được xử lý bằng PBS. Thực vậy, các oligonucleotit đối nghĩa chứa thể tiếp hợp GalNAc$_3$-**1** ở đầu tận cùng 3' (ISIS 655861 và 655862) thể gần như nâng cao về hiệu nghiệm so với đối nghĩa không thể tiếp hợp của oligonucleotit (ISIS 353382). Ngoài ra, ISIS 655862 với các liên kết PS/PO hỗn hợp thể hiện sự nâng cao về hiệu lực so với PS đầy đủ (ISIS 655861).

Bảng 24

Tác động của các liên kết PO/PS đến mức độ ức chế đối nghĩa của các ASO chứa thể tiếp hợp GalNAc$_3$-1 ở đầu tận cùng 3' hướng đích SRB-1

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Các lượng ARN thông tin của SRB-1 (% PBS)	ED_{50} (mg/kg)	Hóa học	SEQ ID No.
PBS	0	100	--	--	
353382 (gốc)	3	76,65	10,4	PS đầy đủ không có thể tiếp hợp	28
	10	52,40			
	30	24,95			
655861	0,5	81,22	2,2	PS đầy đủ có thể tiếp hợp GalNAc$_3$-**1**	29
	1,5	63,51			
	5	24,61			
	15	14,80			
655862	0,5	69,57	1,3	PS/PO hỗn hợp cóthể tiếp hợp GalNAc$_3$-1	29
	1,5	45,78			
	5	19,70			
	15	12,90			

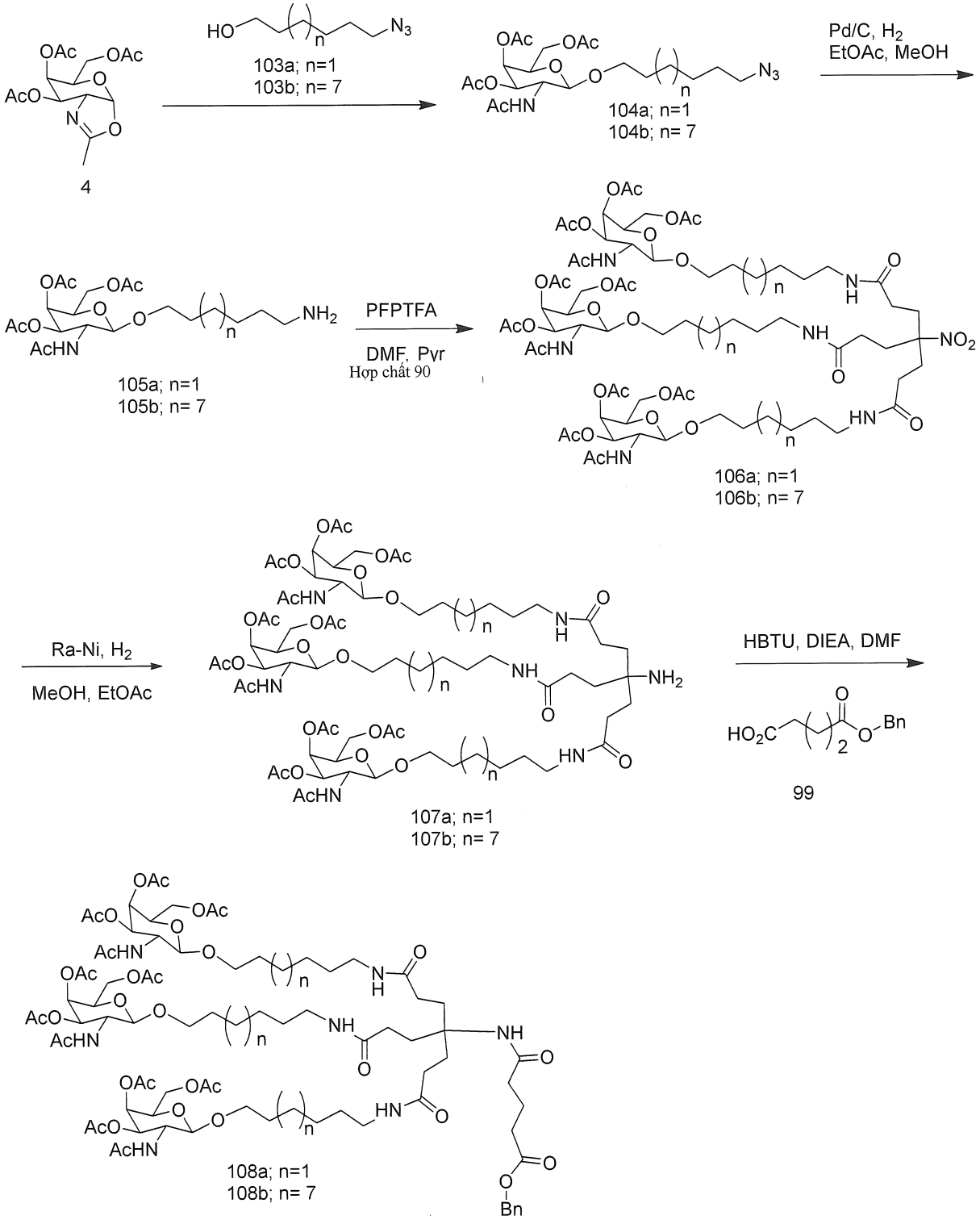
Các mức traxaminaza của gan, alanin aminotransferaza (ALT) và aspartat aminotransferaza (AST), trong huyết thanh được đo so với nước muối được tiêm vào chuột nhắt bằng cách sử dụng các cách thức chuẩn. Trọng lượng cơ quan sẽ được đánh

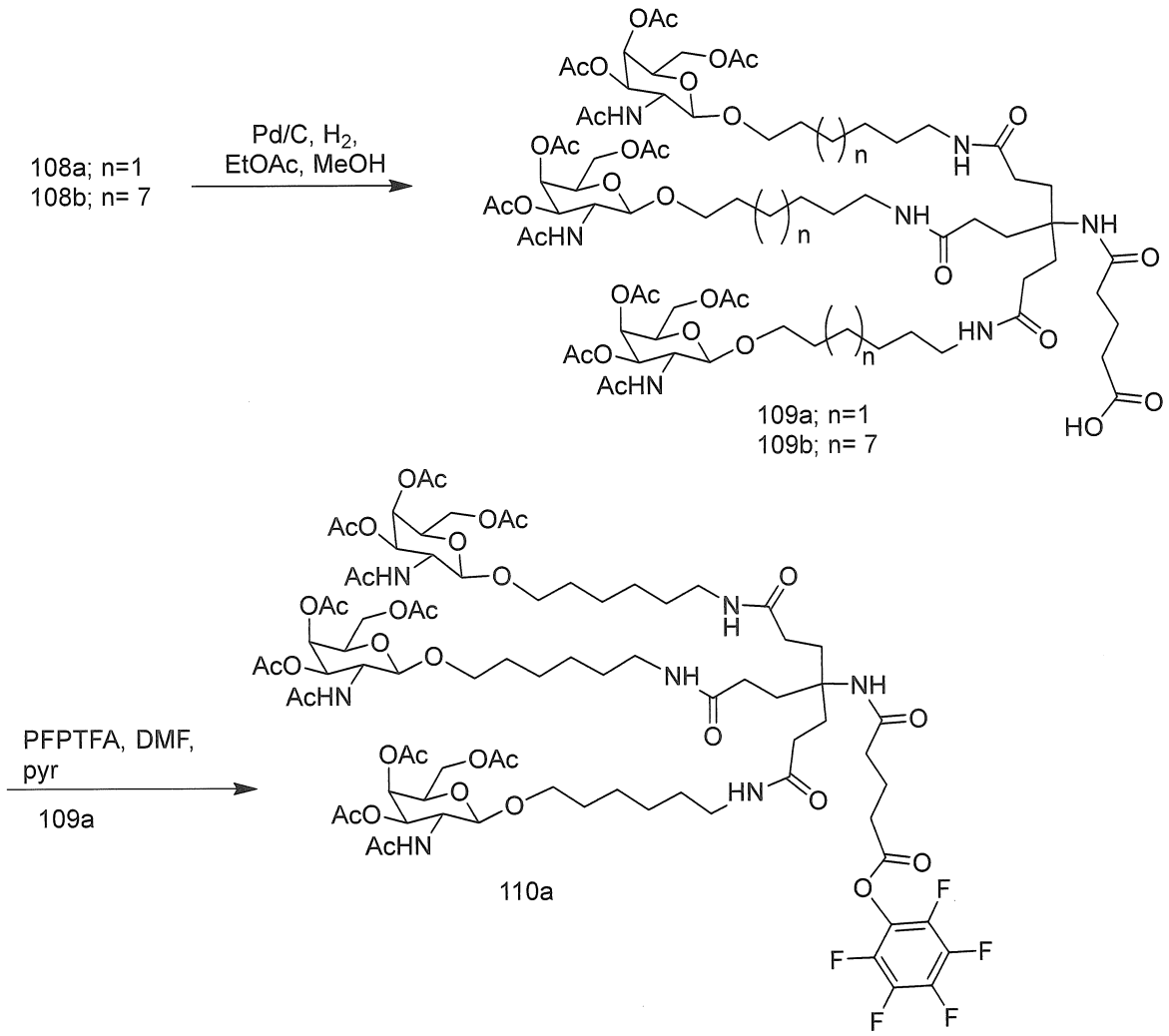
giá. Các kết quả thể hiện rằng không tăng lượng traxaminaza (Bảng 25) hoặc trọng lượng cơ quan (dữ liệu không được thể hiện) được quan sát ở chuột nhắt được xử lý bằng các ASO so với sự điều khiển bằng PBS. Ngoài ra, ASO có các liên kết PS/PO hỗn hợp (ISIS 655862) thể hiện giống như các lượng traxaminaza so với PS đầy đủ (ISIS 655861).

Bảng 25
Tác động của các liên kết PO/PS đến lượng traxaminaza của các ASO chứa thể tiếp hợp $GalNAc_{3}$-1 ở đầu tận cùng 3' hướng đích SRB-1

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Hóa học	SEQ ID No.
PBS	0	28,5	65	--	
353382 (gốc)	3	50,25	89	PS đầy đủ không có thể tiếp hợp	28
	10	27,5	79,3		
	30	27,3	97		
655861	0,5	28	55,7	PS đầy đủ có $GalNAc_{3}$-1	29
	1,5	30	78		
	5	29	63,5		
	15	28,8	67,8		
655862	0,5	50	75,5	PS/PO hỗn hợp có $GalNAc_{3}$-1	29
	1,5	21,7	58,5		
	5	29,3	69		
	15	22	61		

Ví dụ 45: Điều chế PFP este, hợp chất có công thức 110a





Đặc biệt, hợp chất có công thức 4 (9,5g, 28,8mmol) được xử lý bằng hợp chất có công thức 103a hoặc 103b (38mmol), và TMSOTf (0,5 đương lượng) và rây phân tử trong điclometan (200mL), và khuấy trong thời gian 16 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tại thời điểm đó, lớp hữu cơ được lọc qua Celite, sau đó được rửa bằng natri bicacbonat, nước và nước muối. Sau đó, lớp hữu cơ được tách và làm khô trên natri sulfat, lọc và giảm trong điều kiện áp suất giảm. Dầu thu được được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (2%-->10% metanol/điclometan) để tạo ra các hợp chất có công thức 104a và 104b với hiệu suất >80%. LCMS và proton NMR là phù hợp với cấu trúc.

Các hợp chất có công thức 104a và 104b được xử lý ở cùng điều kiện như với các hợp chất có công thức 100a-d (theo Ví dụ 47), để tạo ra các hợp chất có công thức 105a và 105b với >90% hiệu suất. LCMS và proton NMR là phù hợp với cấu trúc.

Đặc biệt, các hợp chất có công thức 105a và 105b được xử lý bằng hợp chất 90 trong cùng cùng điều kiện như với các hợp chất 901a-d, để tạo ra các hợp chất có công thức 106a (80%) và 106b (20%). LCMS và proton NMR là phù hợp với cấu trúc.

Các hợp chất có công thức 106a và 106b được xử lý trong cùng điều kiện như với các hợp chất 96a-d (theo Ví dụ 47), để tạo ra 107a (60%) và 107b (20%). LCMS và proton NMR là phù hợp với cấu trúc.

Các hợp chất có công thức 107a và 107b được xử lý trong cùng điều kiện như với các hợp chất 97a-d (theo Ví dụ 47), để tạo ra các hợp chất có công thức 108a và 108b với hiệu suất 40% đến 60%. LCMS và proton NMR là phù hợp với cấu trúc.

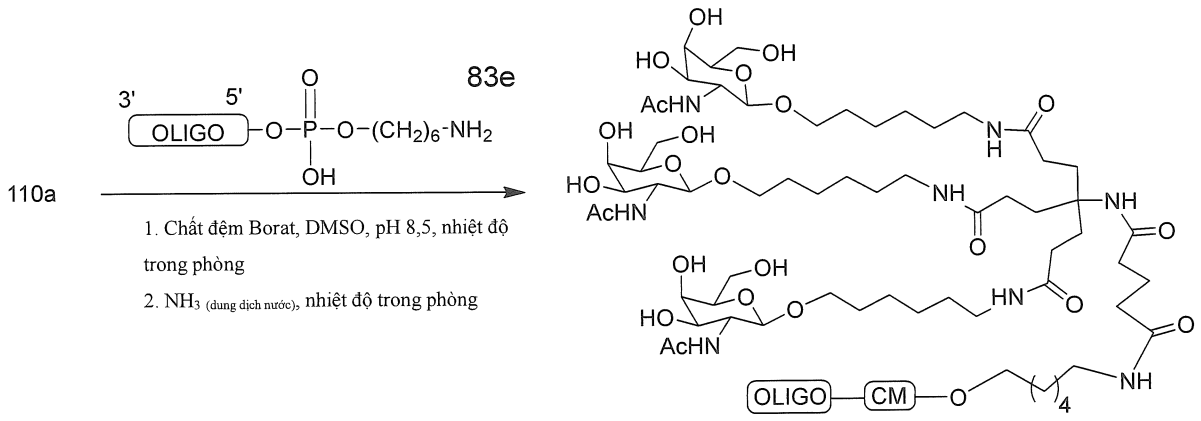
Các hợp chất có công thức 108a (60%) và 108b (40%) được xử lý trong cùng điều kiện như với các hợp chất có công thức 100a-d (theo Ví dụ 47), để tạo ra các hợp chất có công thức 109a và 109b với hiệu suất >80%. LCMS và proton NMR là phù hợp với cấu trúc.

Hợp chất có công thức 109a được xử lý trong cùng điều kiện như với các hợp chất có công thức 101a-d (theo Ví dụ 47), để tạo ra hợp chất có công thức 110a với hiệu suất 30% đến 60%. LCMS và proton NMR là phù hợp với cấu trúc. Theo cách khác, hợp chất có công thức 110b có thể được điều chế theo cách tương tự bắt đầu với hợp chất có công thức 109b.

Ví dụ 46: Quy trình chung để tiếp hợp với PFP este (Oligonucleotit 111); điều chế ISIS 666881 ($GalNAc_3$-10)

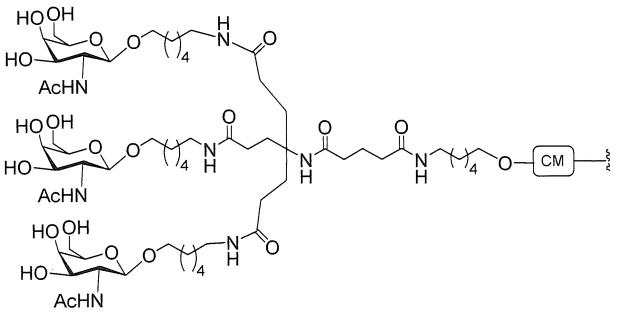
Oligonucleotit cải biến 5'-hexylamino được tổng hợp và tinh chế bằng cách sử dụng các quy trình oligonucleotit pha rắn tiêu chuẩn. Oligonucleotit cải biến 5'-hexylamino được hòa tan trong natri tetraborat 0,1M, pH = 8,5 (200µl) và 3 đương lượng cụm GalNAc3 este hóa PFP chọn lọc được hòa tan trong DMSO (50µl) được bổ sung vào. Nếu PFP este kết tủa trong khi bổ sung dung dịch ASO DMSO được bổ sung cho đến khi tất cả PFP este nằm trong dung dịch. Phản ứng được hoàn thành sau khoảng 16

giờ trộn ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch thu được được pha loãng bằng nước đến 12ml và sau đó được quay ở 3000 vòng/phút trong bộ lọc quay bằng cắt khối lượng 3000Da. Quy trình này được lặp lại hai lần để loại bỏ các tạp chất phân tử nhỏ. Sau đó, dung dịch này được sấy khô ở nhiệt độ thấp đến khô và được hòa tan lại trong amoniac trong nước đã được cô và trộn ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2,5 giờ nữa tiếp theo là cô trong chân không để loại bỏ hầu hết amoniac. Oligonucleotit đã tiếp hợp được tinh chế và được khử muối theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp đảo pha và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra oligonucleotit đã tiếp hợp $GalNAc_3$.



111

Oligonucleotit 111 được tiếp hợp với $GalNAc_3$-10. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-10 ($GalNAc_3$-10_a) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)- như được thể hiện trong oligonucleotit (ISIS 666881) được tổng hợp với $GalNAc_3$-10 dưới đây. Cấu trúc của $GalNAc_3$-10 ($GalNAc_3$-10_a-CM-) được thể hiện dưới đây:



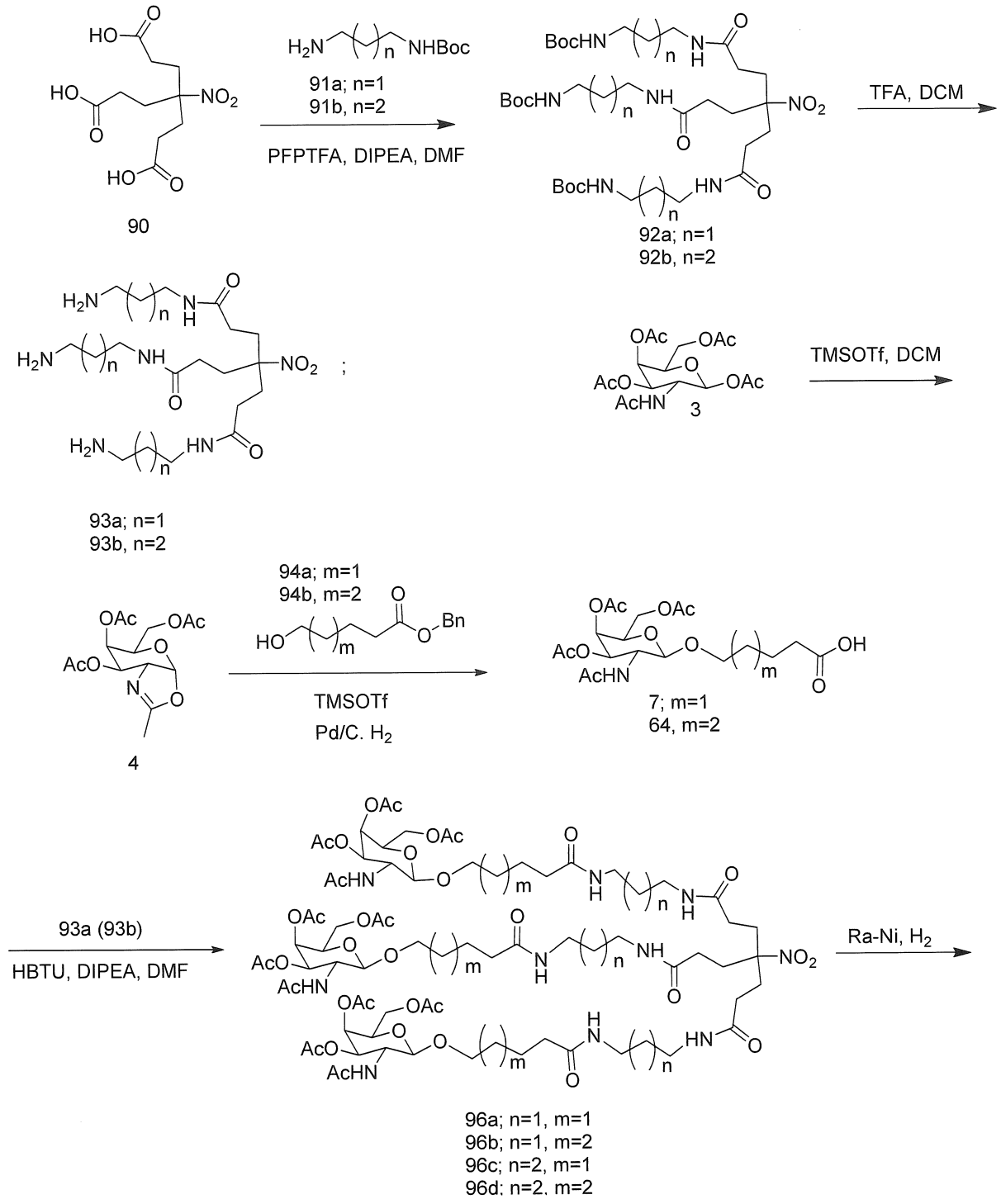
Tiếp theo quy trình này chung ISIS 666881 được chuẩn bị. Oligonucleotit cải biến 5'-hexylamino, ISIS 660254, tổng hợp và tinh chế bằng cách sử dụng các quy trình oligonucleotit pha rắn tiêu chuẩn. ISIS 660254 (40mg, 5,2µmol) được hòa tan trong natri tetraborat 0,1M, pH 8,5 (200µl) và 3 đương lượng PFP este (Hợp chất có công thức 110a) được hòa tan trong DMSO (50µl) được bổ sung vào. PFP este kết tủa trong khi bổ sung dung dịch ASO yêu cầu DMSO bổ sung (600µl) để hòa tan hoàn toàn PFP este. Phản ứng được hoàn thành sau khi 16 giờ trộn ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch này được pha loãng bằng nước đến tổng thể tích 12ml và được quay ở 3000 vòng/phút trong bộ lọc quay với cắt khối lượng 3000Da. Quy trình này được lặp lại hai lần để loại bỏ các tạp chất phân tử nhỏ. Dung dịch này được sấy khô ở nhiệt độ thấp đến khô và được hòa tan lại trong amoniac trong nước đã được cô và trộn ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2,5 giờ nữa tiếp theo là cô trong chân không để loại bỏ hầu hết amoniac. Oligonucleotit đã tiếp hợp được tinh chế và được khử muối theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp đảo pha và sấy khô ở nhiệt độ thấp để tạo ra ISIS 666881 với hiệu suất 90% theo khối lượng (42mg, 4,7µmol).

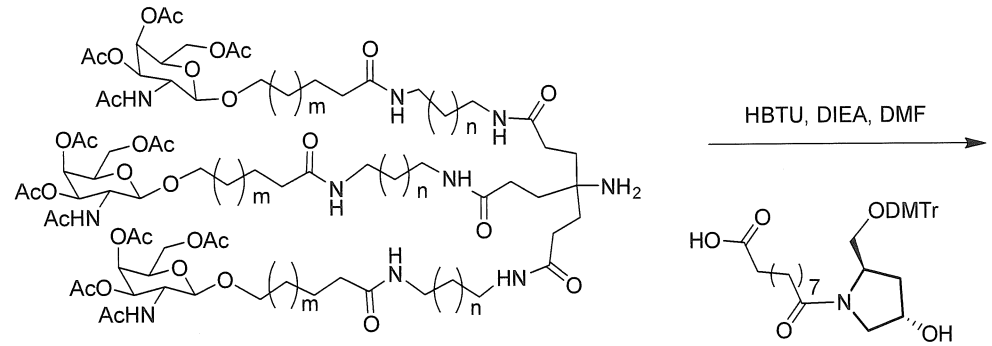
Oligonucleotit đã tiếp hợp $GalNAc_3$-10

ASO	Trình tự (5' đến 3')	Nhóm 5'	SEQ ID No.
ISIS 660254	$NH_2(CH_2)_{6\text{-}o}A_{do}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ ${}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	Hexylamin	30
ISIS 666881	$GalNAc_3\text{-}10_{a\text{-}o'}\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ ${}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-10	30

Các chữ viết hoa thể hiện nucleobazơ với mỗi nucleosit và ${}^{m}C$ biểu thị 5-metyl xytosin. Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE; "d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa nucleosit (PS); "o" biểu thị liên kết giữa nucleosit phosphođieste (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. Các nhóm tiếp hợp được in đậm.

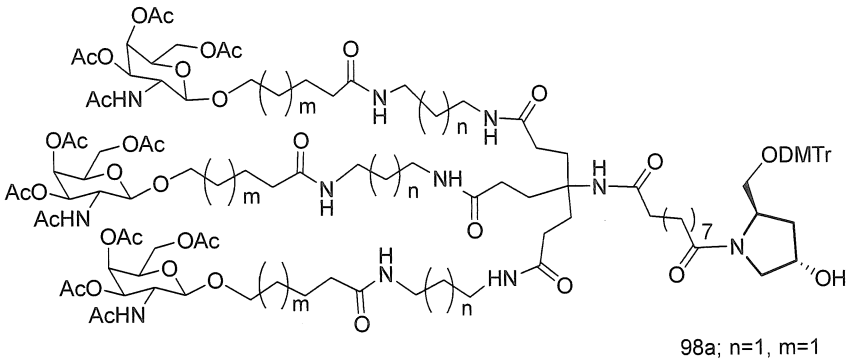
Ví dụ 47: Điều chế oligonucleotit 102 chứa $GalNAc_3$-8



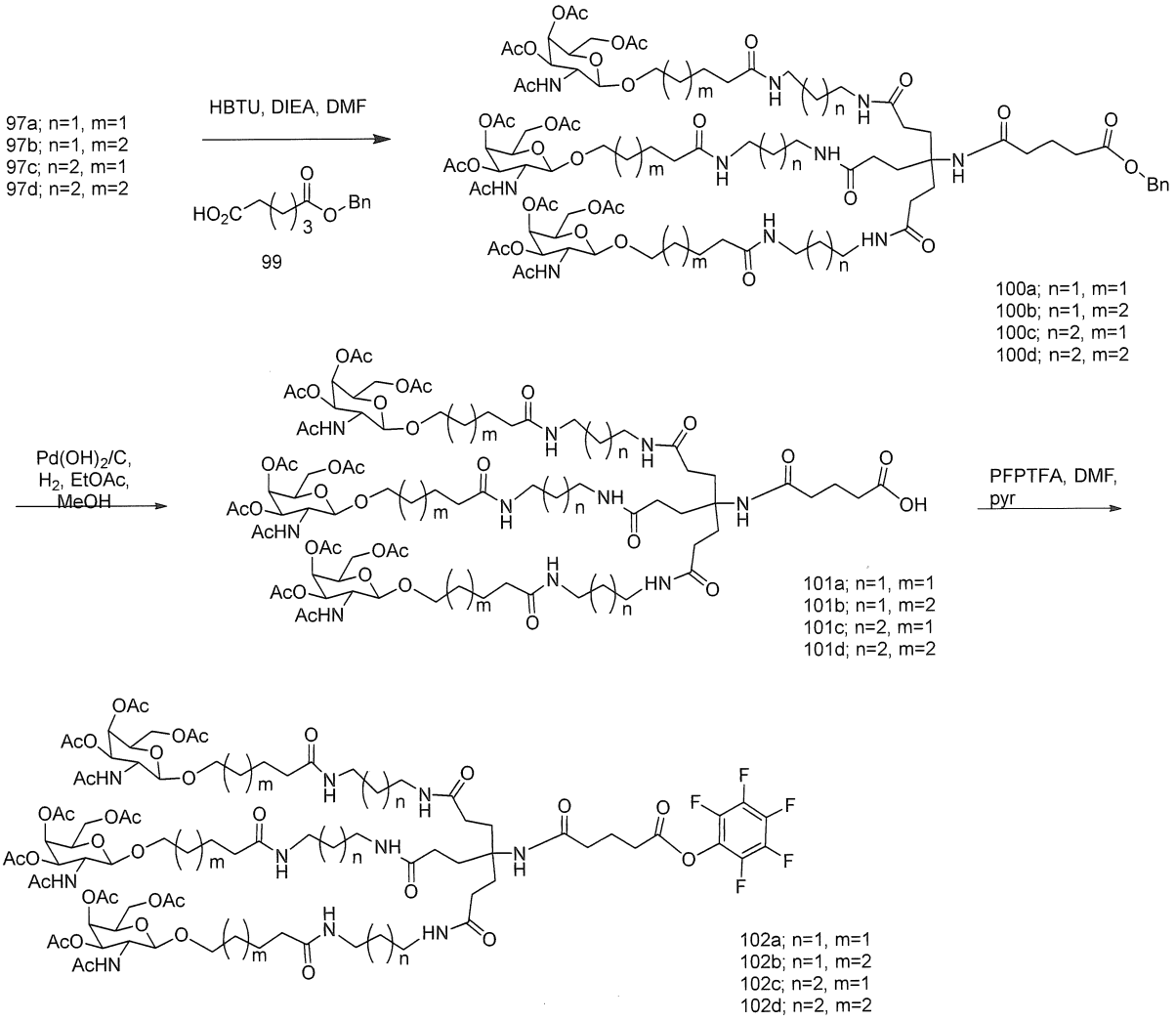


97a; n=1, m=1
97b; n=1, m=2
97c; n=2, m=1
97d; n=2, m=2

23



98a; n=1, m=1
98b; n=1, m=2
98c; n=2, m=1
98d; n=2, m=2



Triaxit 90 (4g, 14,43mmol) được hòa tan trong DMF (120mL) và *N*,*N*-điisopropyletylamin (12,35mL, 72mmol). Pentaflorophenyl trifloaxetat (8,9ml, 52mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào, trong khí quyển Argon, và hỗn hợp phản ứng này được để khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Boc-điamin 91a hoặc 91b (68,87mmol) được bổ sung vào, cùng với *N*,*N*-điisopropyletylamin (12,35mL, 72mmol), và hỗn hợp phản ứng này được để khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Tại thời điểm đó, DMF được giảm >75% trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó hỗn hợp này được hòa tan trong điclometan. Lớp hữu cơ được rửa bằng natri bicacbonat, nước và nước muối. Sau đó, lớp hữu cơ được tách và làm khô trên natri sulfat, lọc và khử thành

dầu trong điều kiện áp suất giảm. Dầu thu được được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (2%-->10% metanol/điclometan) để tạo ra các hợp chất 92a và 92b với hiệu suất khoảng 80%. LCMS và proton NMR là phù hợp với cấu trúc.

Hợp chất 92a hoặc 92b (6,7mmol) được xử lý bằng 20mL điclometan và 20mL axit trifloaxetic ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Dung dịch thu được làm bay hơi và sau đó được hòa tan trong metanol và xử lý bằngnhựa DOWEX-OH trong thời gian 30 phút. Dung dịch thu được lọc và giảm thành dầu trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hiệu suất 85% đến 90% của các hợp chất có công thức 93a và 93b.

Các hợp chất có công thức 7 hoặc 64 (9,6mmol) được xử lý bằng HBTU (3,7g, 9,6mmol) và *N,N*-điisopropyletylamin (5mL) trong DMF (20mL) trong thời gian 15 phút. Vào đây được bổ sung hợp chất 93a hoặc hợp chất 93b (3mmol), và để khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Tại thời điểm đó, DMF được giảm >75% trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó hỗn hợp này được hòa tan trong điclometan. Lớp hữu cơ được rửa bằng natri bicacbonat, nước và nước muối. Sau đó, lớp hữu cơ được tách và làm khô trên natri sulfat, lọc và giảm thành dầu trong điều kiện áp suất giảm. Dầu thu được được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (5%-->20% metanol/điclometan) để tạo ra các hợp chất 96a-d với hiệu suất 20% đến 40%. LCMS và proton NMR là phù hợp với cấu trúc.

Đặc biệt, các hợp chất 96a-d (0,75mmol)được hyđro hóa trên niken Raney trong thời gian 3 giờ trong etanol (75mL). Tại thời điểm đó, chất xúc tác được loại bỏ bằng cách lọc qua Celite, và etanol được loại ra trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra các hợp chất có công thức 97a-d với hiệu suất 80% đến 90%. LCMS và proton NMR là phù hợp với cấu trúc.

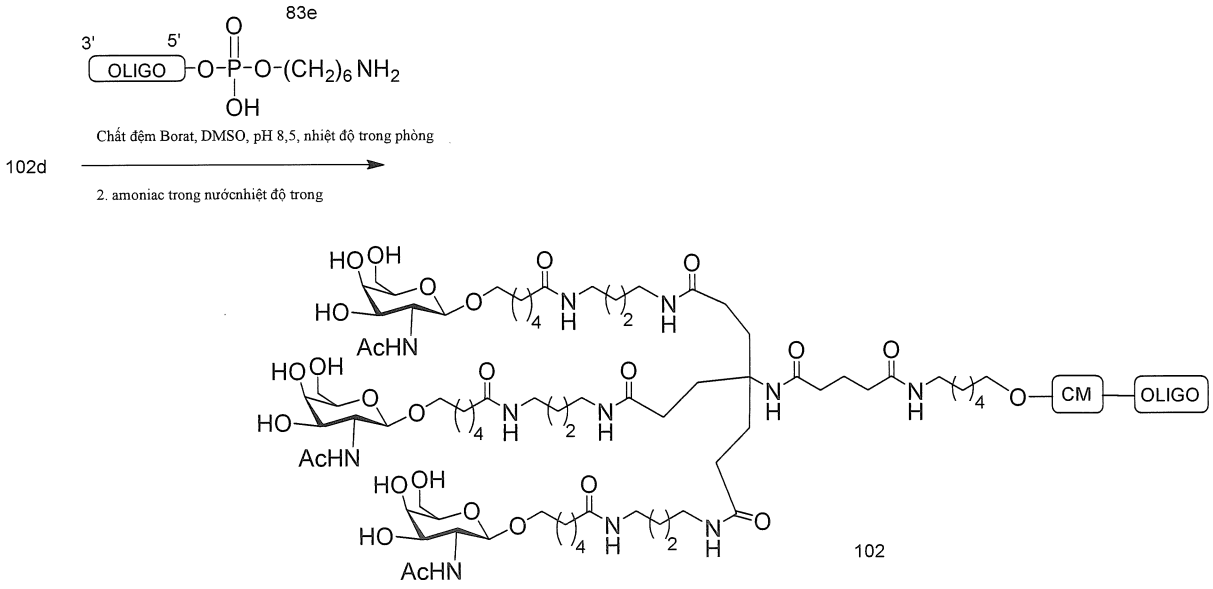
Hợp chất có công thức 23 (0,32g, 0,53mmol) được xử lý bằng HBTU (0,2g, 0,53mmol) và *N,N*-điisopropyletylamin (0,19ml, 1,14mmol) trong DMF (30mL) trong thời gian 15 phút. vào đây được bổ sung các hợp chất 97a-d (0,38mmol), riêng lẻ, và để khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Tại thời điểm đó, DMF được giảm >75% trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó hỗn hợp này được hòa tan trong điclometan. Lớp hữu cơ được rửa bằng natri bicacbonat, nước và nước muối. Sau đó, lớp hữu cơ được tách và làm khô trên natri sulfat, lọc và giảm thành dầu trong điều kiện áp

suất giảm. Dầu thu được được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (2%-->20% metanol/điclometan) để tạo ra các hợp chất có công thức 98a-d với hiệu suất 30% đến 40%. LCMS và proton NMR là phù hợp với cấu trúc.

Hợp chất 99 (0,17g, 0,76mmol) được xử lý bằng HBTU (0,29g, 0,76mmol) và *N,N*-điisopropyletylamin (0,35mL, 2,0mmol) trong DMF (50mL) trong thời gian 15 phút. Đặc biệt, các hợp chất 97a-d (0,51mmol) được bổ sung và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 16 giờ. Tại thời điểm đó, DMF được giảm >75% trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó hỗn hợp này được hòa tan trong điclometan. Lớp hữu cơ được rửa bằng natri bicacbonat, nước và nước muối. Sau đó, lớp hữu cơ được tách và làm khô trên natri sulfat, lọc và giảm thành dầu trong điều kiện áp suất giảm. Dầu thu được được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (5%-->20% metanol/ điclometan) để tạo ra các hợp chất có công thức 100a-d với hiệu suất 40% đến 60%. LCMS và proton NMR là phù hợp với cấu trúc.

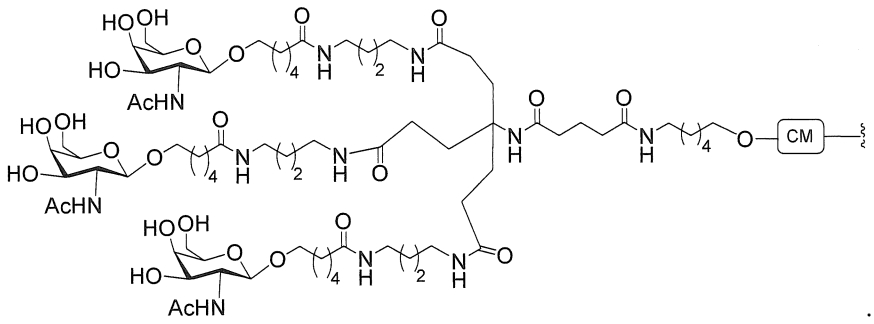
Đặc biệt, các hợp chất có công thức 100a-d (0,16mmol) được hyđro hóa trên 10% $Pd(OH)_2/C$ trong thời gian 3 giờ trong metanol/etyl axetat (theo tỷ lệ 1:1, 50mL). Tại thời điểm đó, chất xúc tác được loại bỏ bằng cách lọc qua Celite, và các chất hữu cơ được loại ra trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra các hợp chất có công thức 101a-d với hiệu suất 80% đến 90%. LCMS và proton NMR là phù hợp với cấu trúc.

Đặc biệt, các hợp chất có công thức 101a-d (0,15mmol) được hòa tan trong DMF (15mL) và pyriđin (0,016ml, 0,2mmol). Pentaflorophenyl trifloaxetat (0,034mL, 0,2mmol) được bổ sung nhỏ giọt vào, trong khí quyển Argon, và hỗn hợp phản ứng này được để khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Tại thời điểm đó, DMF được giảm >75% trong điều kiện áp suất giảm, và sau đó hỗn hợp này được hòa tan trong điclometan. Lớp hữu cơ được rửa bằng natri bicacbonat, nước và nước muối. Sau đó, lớp hữu cơ được tách và làm khô trên natri sulfat, lọc và giảm thành dầu trong điều kiện áp suất giảm. Dầu thu được được tinh chế theo phương pháp sắc ký trên silicagel (2%-->5% metanol/điclometan) để tạo ra các hợp chất có công thức 102a-d với hiệu suất khoảng 80%. LCMS và proton NMR là phù hợp với cấu trúc.

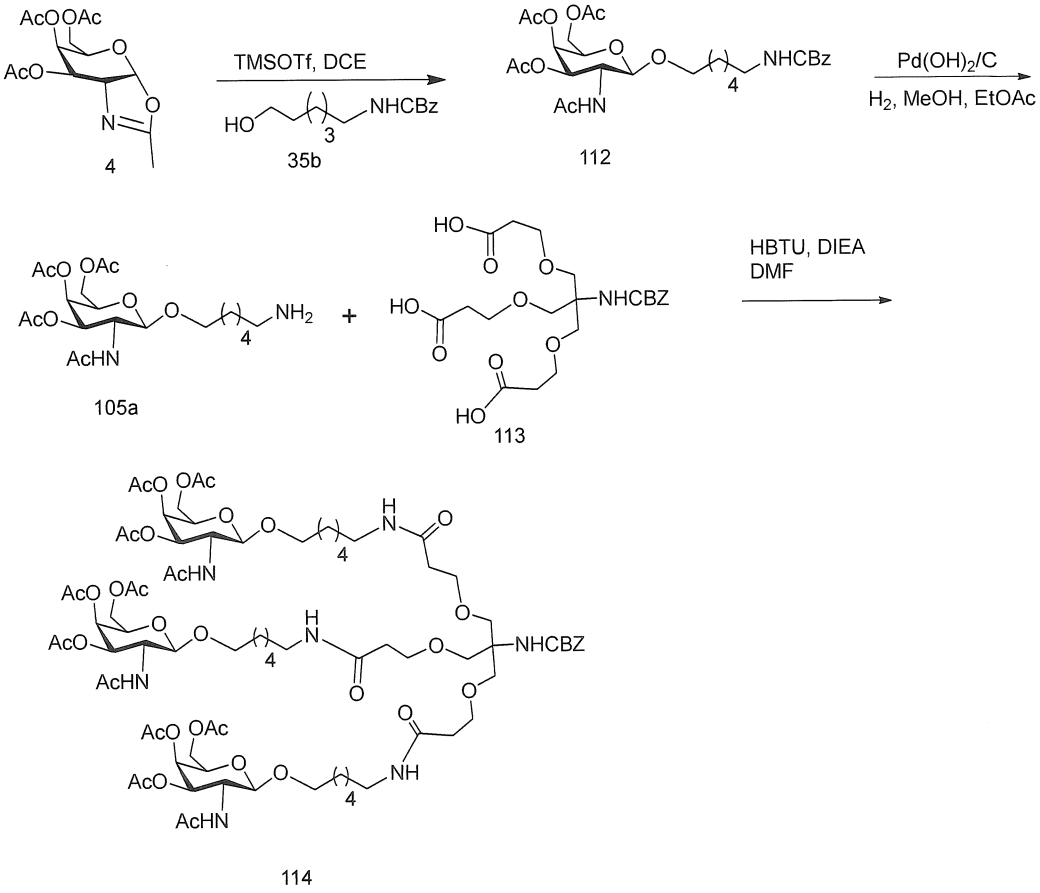


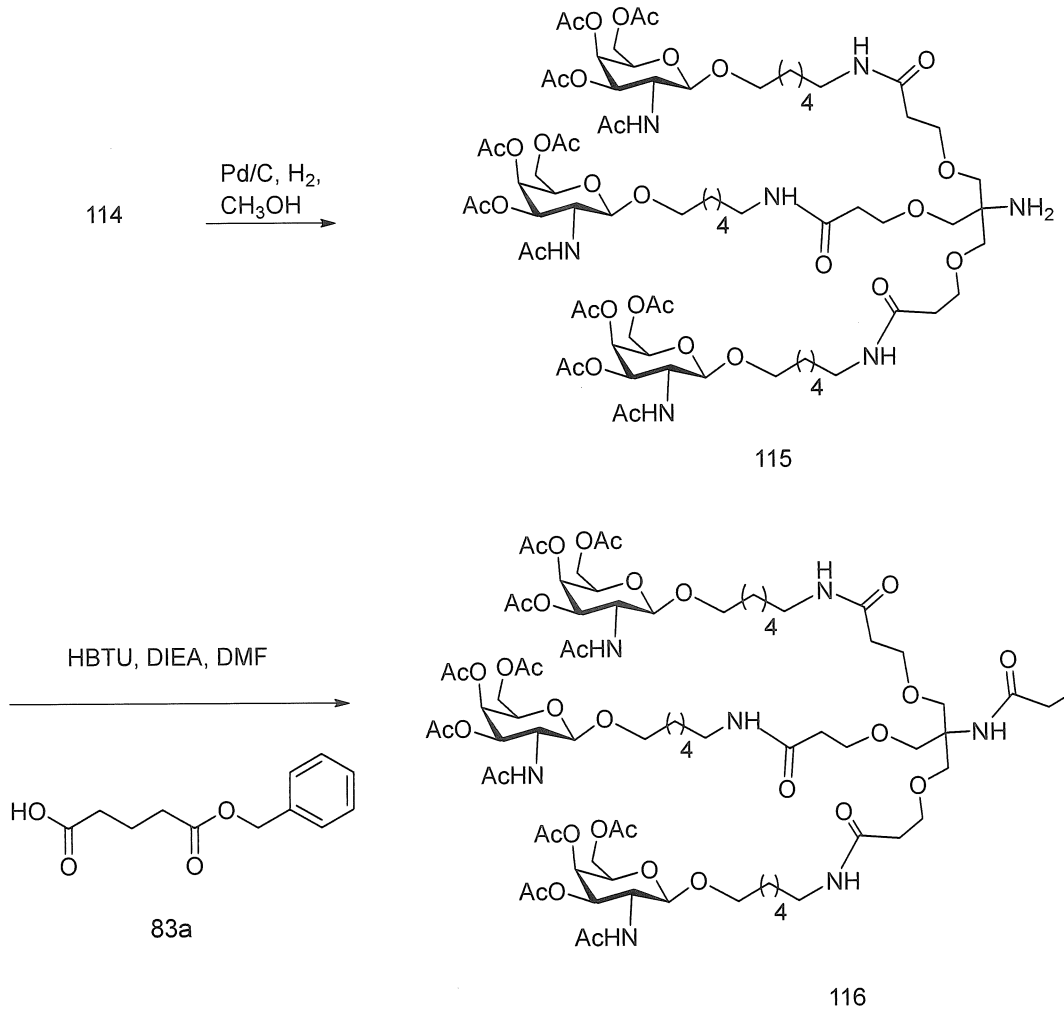
Hợp chất oligome có công thức 102, chứa nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-8, điều chế bằng cách áp dụng các quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 46. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-8 (GalNAc$_3$-8$_a$) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo phương án được ưu tiên, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-.

Cấu trúc của GalNAc$_3$-8 (GalNAc$_3$-8$_a$-CM-) được thể hiện dưới đây:



Ví dụ 48: Điều chế Oligonucleotit 119 Chứa $GalNAc_3$-7





Hợp chất có công thức 112 được tổng hợp theo quy trình đã được bộc lộ trong các tài liệu (*J. Med. Chem.* 2004, *47*, 5798-5808).

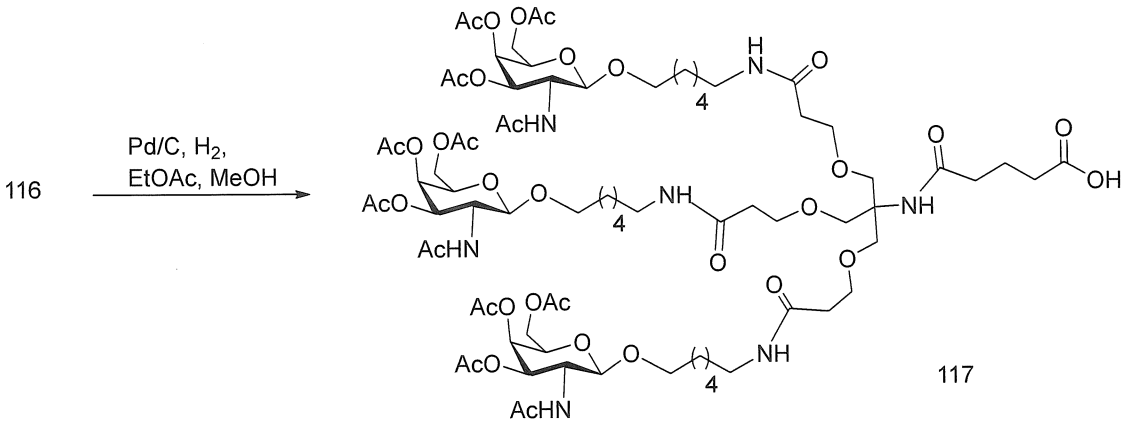
Hợp chất có công thức 112 (5g, 8,6mmol) được hòa tan trong 1:1 metanol/etyl axetat (22mL/22mL). Paladi hyđroxit trên cacbon (0,5g) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong hyđro trong thời gian 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được lọc qua đệm xelit và được rửa đệm này với tỷ lệ 1:1 metanol/etyl axetat. Dịch lọc và rửa được kết hợp và cô đến khô để tạo ra hợp chất có công thức 105a (định lượng). Cấu trúc được xác nhận theo phương pháp LCMS.

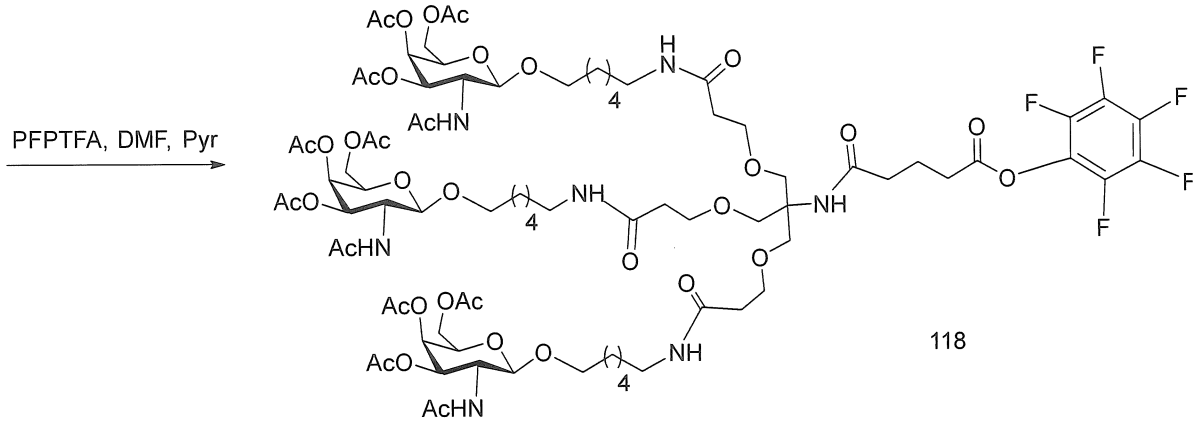
Hợp chất 113 (1,25g, 2,7mmol), HBTU (3,2g, 8,4mmol) và DIEA (2,8ml, 16,2mmol) được hòa tan trong DMF khan (17ml) và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở

nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 phút. Dung dịch này chứa hợp chất có công thức 105a (3,77g, 8,4mmol) trong DMF khan (20mL) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 6 giờ. Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra dầu. Cặn được hòa tan trong CH_2Cl_2 (100mL) và rửa bằng dung dịch nước $NaHCO_3$ bão hòa (100mL) và nước muối (100mL). Lớp hữu cơ được tách, làm khô (Na_2SO_4), lọc và làm bay hơi. Cặn được tinh chế bằng cột sắc ký trên silicagel và rửa giải bằng 10% đến 20% MeOH trong điclometan để tạo ra hợp chất có công thức 114 (1,45g, 30%). Cấu trúc được xác nhận theo phương pháp phân tích LCMS và ^1H NMR.

Hợp chất có công thức 114 (1,43g, 0,8mmol) được hòa tan trong 1:1 metanol/etyl axetat (4mL/4mL). Paladi trên cacbon (ướt, 0,14g) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được sục hyđro và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong hyđro trong thời gian 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được lọc qua đệm xelit. Đệm Celite được rửa bằng metanol/etyl axetat (theo tỷ lệ 1:1). Dịch lọc và rửa được kết hợp cùng nhau và làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất có công thức 115 (định lượng). Cấu trúc được xác nhận theo phương pháp phân tích LCMS và ^1H NMR.

Hợp chất có công thức 83a (0,17g, 0,75mmol), HBTU (0,31g, 0,83mmol) và DIEA (0,26ml, 1,5mmol) được hòa tan trong DMF khan (5mL) và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 phút. Dung dịch này chứa hợp chất có công thức 115 (1,22g, 0,75mmol) trong DMF khan được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 6 giờ. Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm và cặn được hòa tan trong CH_2Cl_2. Lớp hữu cơ được rửa dung dịch nước $NaHCO_3$ bão hòa và nước muối và làm khô trên Na_2SO_4 khan và lọc. Lớp hữu cơ được cô đến khô và cặn thu được tinh chế bằng cột sắc ký trên silicagel và được rửa giải bằng 3% đến 15% MeOH trong điclometan để tạo ra hợp chất có công thức 116 (0,84g, 61%). Cấu trúc được xác nhận theo phương pháp phân tích LC MS và ^1H NMR.

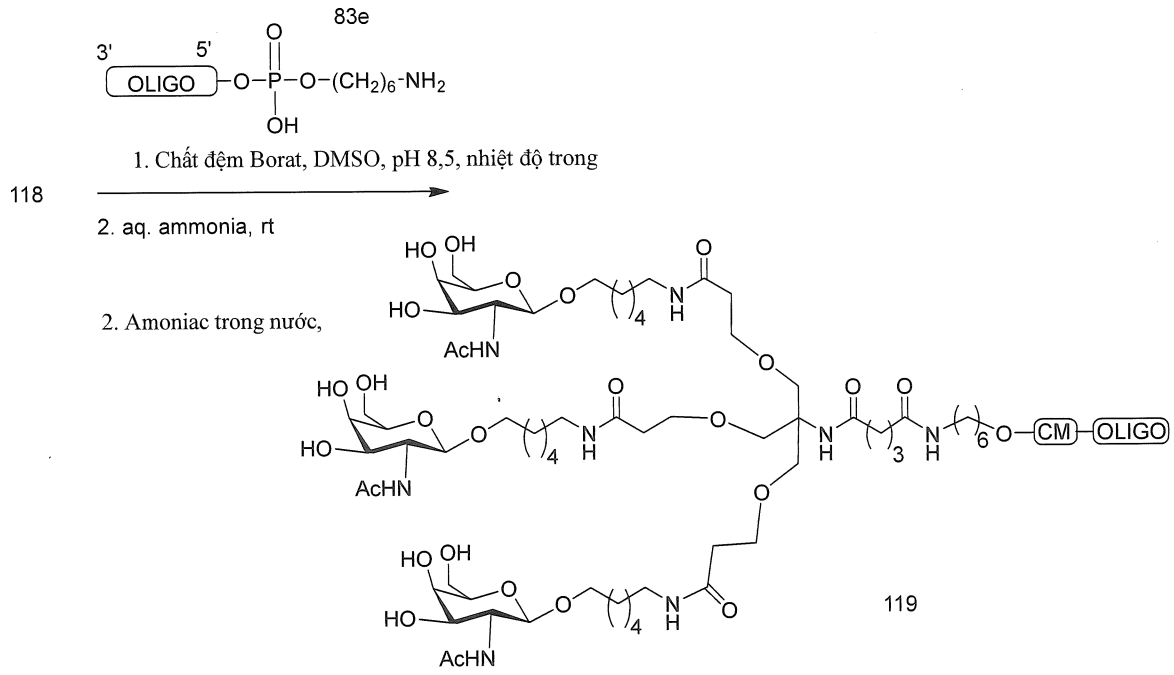




Hợp chất có công thức 116 (0,74g, 0,4mmol) được hòa tan trong 1:1 metanol/etyl axetat (5mL/5mL). Palađi trên cacbon (ướt, 0,074g) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được sục hyđro và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong hyđro trong thời gian 12 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được lọc qua đệm xelit. Đệm Celite được rửa bằng metanol/etyl axetat (theo tỷ lệ 1:1). Dịch lọc và rửa được kết hợp cùng nhau và làm bay hơi trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất có công thức 117 (0,73g, 98%). Cấu trúc được xác nhận theo phương pháp phân tích LCMS và ^{1}H NMR.

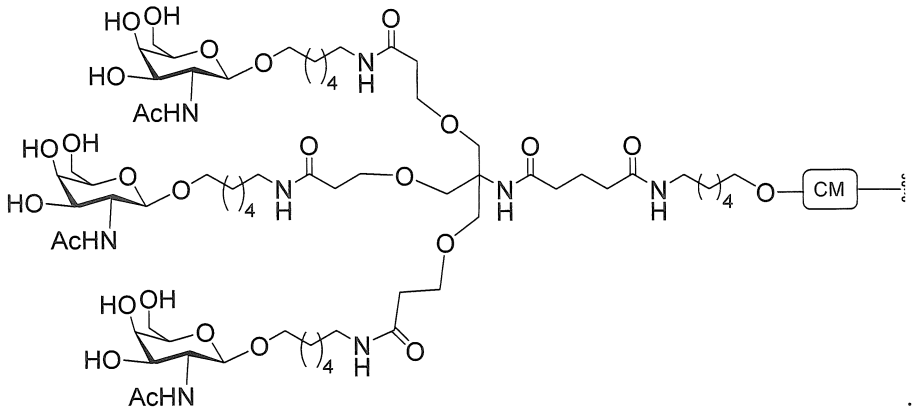
Hợp chất có công thức 117 (0,63g, 0,36mmol) được hòa tan trong DMF khan (3ml). vào dung dịch này *N*,*N*-điisopropyletylamin (70µl, 0,4mmol) và pentaflorophenyl trifloaxetat (72µl, 0,42mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 12 giờ và rót vào dung dịch nước $NaHCO_3$ bão hòa. Hỗn hợp này được chiết bằng điclometan, rửa bằng nước muối và làm khô trên Na_2SO_4 khan. Dung dịch điclometan được cô đến khô và tinh chế theo phương pháp sắc ký cột

silicagel và rửa giải bằng 5% đến 10% MeOH trong điclometan để tạo ra hợp chất có công thức 118 (0,51g, 79%). Cấu trúc được xác nhận theo phương pháp LCMS và ^{1}H và ^{1}H và ^{19}F NMR.

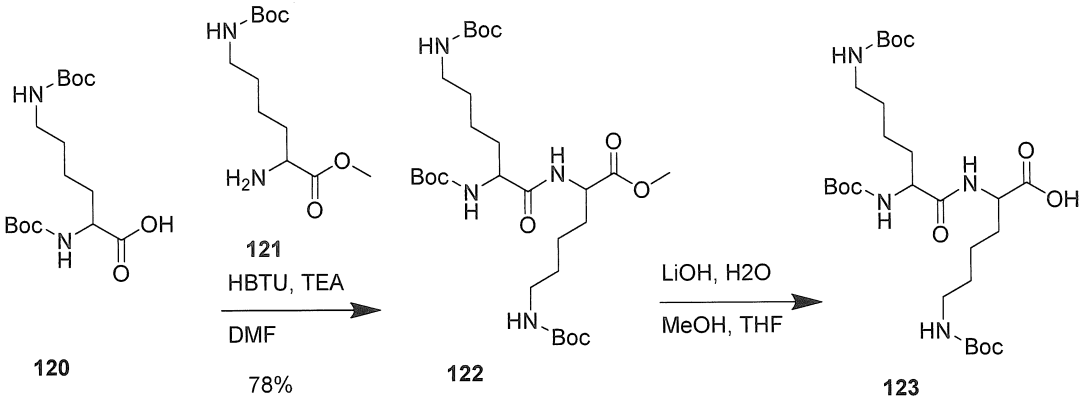


Hợp chất oligome có công thức 119, chứa nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-7, điều chế bằng cách áp dụng các quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 46. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-7 ($GalNAc_3$-7_a) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-.

Cấu trúc của $GalNAc_3$-7 ($GalNAc_3$-7_a-CM-) được thể hiện dưới đây:



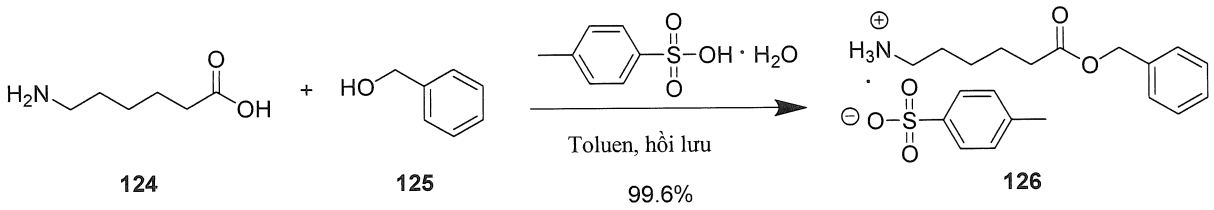
Ví dụ 49: Điều chế Oligonucleotit 132 chứa $GalNAc_3$-5



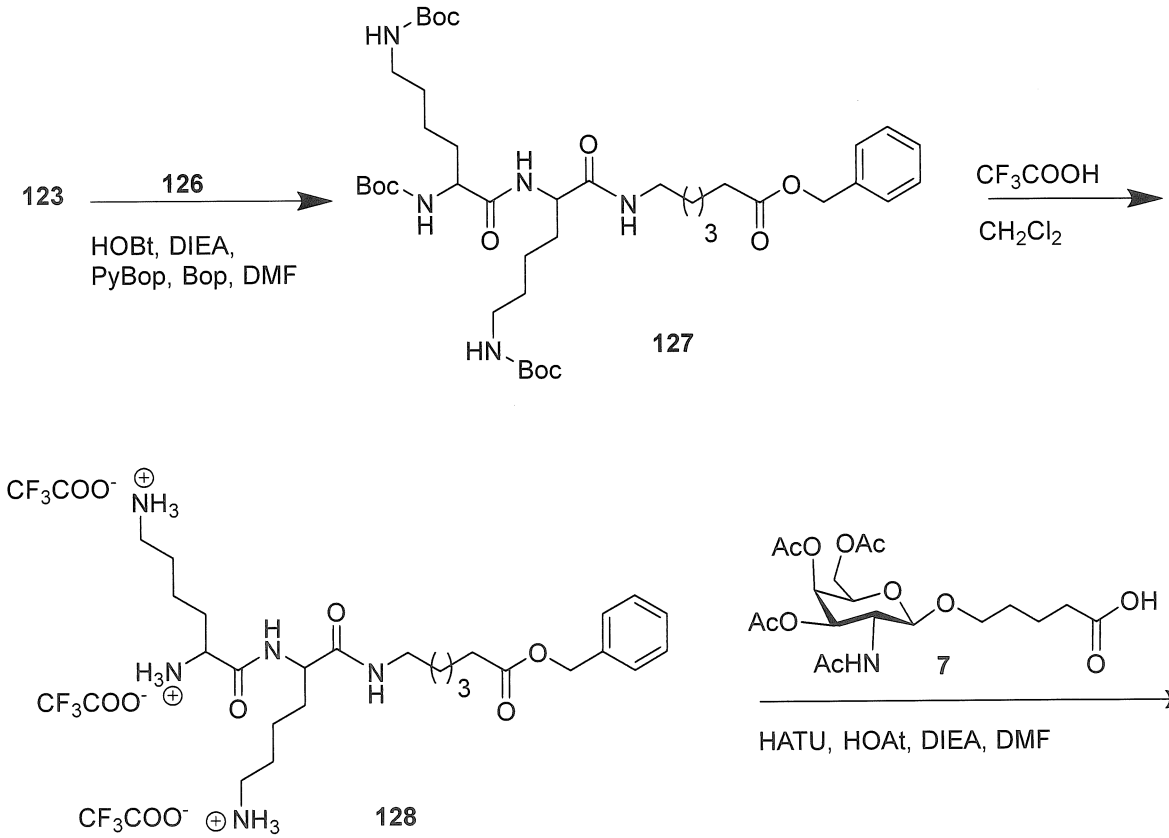
Hợp chất có công thức 120 (14,01g, 40mmol) và hBTU (14,06g, 37mmol) được hòa tan trong DMF khan (80mL). Trietylamin (11,2mL, 80,35mmol) được bổ sung vào và khuấy trong thời gian 5 phút. Hỗn hợp phản ứng này được làm nguội trong bể nước đá và dung dịch chứa hợp chất có công thức 121 (10g, mmol) trong DMF khan (20mL) được bổ sung vào. Thêm trietylamin (4,5mL, 32,28mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong thời gian 18 giờ trong khí quyển argon. Phản ứng này được theo dõi theo phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) (etyl axetat: hexan; 1:1; Rf = 0,47). Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được đưa vào EtOAc (300mL) và rửa bằng 1M $NaHSO_4$ (3 x 150mL), trong nước dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa (3 x 150mL) và nước muối (2 x 100mL). Lớp hữu cơ được làm khô bằng Na_2SO_4. Tác nhân làm khô được loại bỏ bằng cách lọc và lớp hữu cơ được cô theo phương pháp làm bay hơi

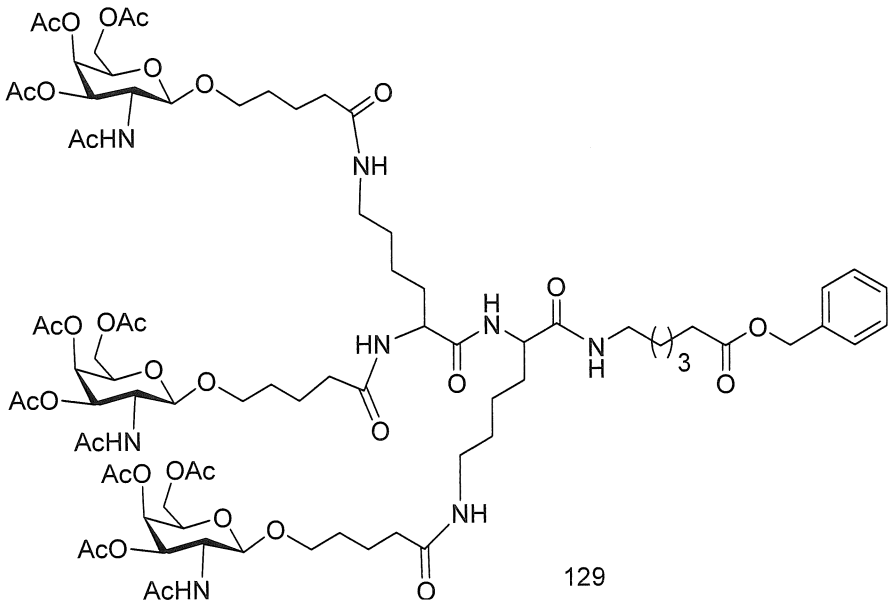
kiểu quay. Hỗn hợp thô được tinh chế bằng cột sắc ký trên silicagel và được rửa giải bằng cách sử dụng 35% đến 50% EtOAc trong hexan để tạo ra hợp chất có công thức 122 (15,50g, 78,13%). Cấu trúc được xác nhận theo phương pháp phân tích LCMS và ^{1}H NMR. Khối lượng *m/z* 589,3 $[M + H]^+$.

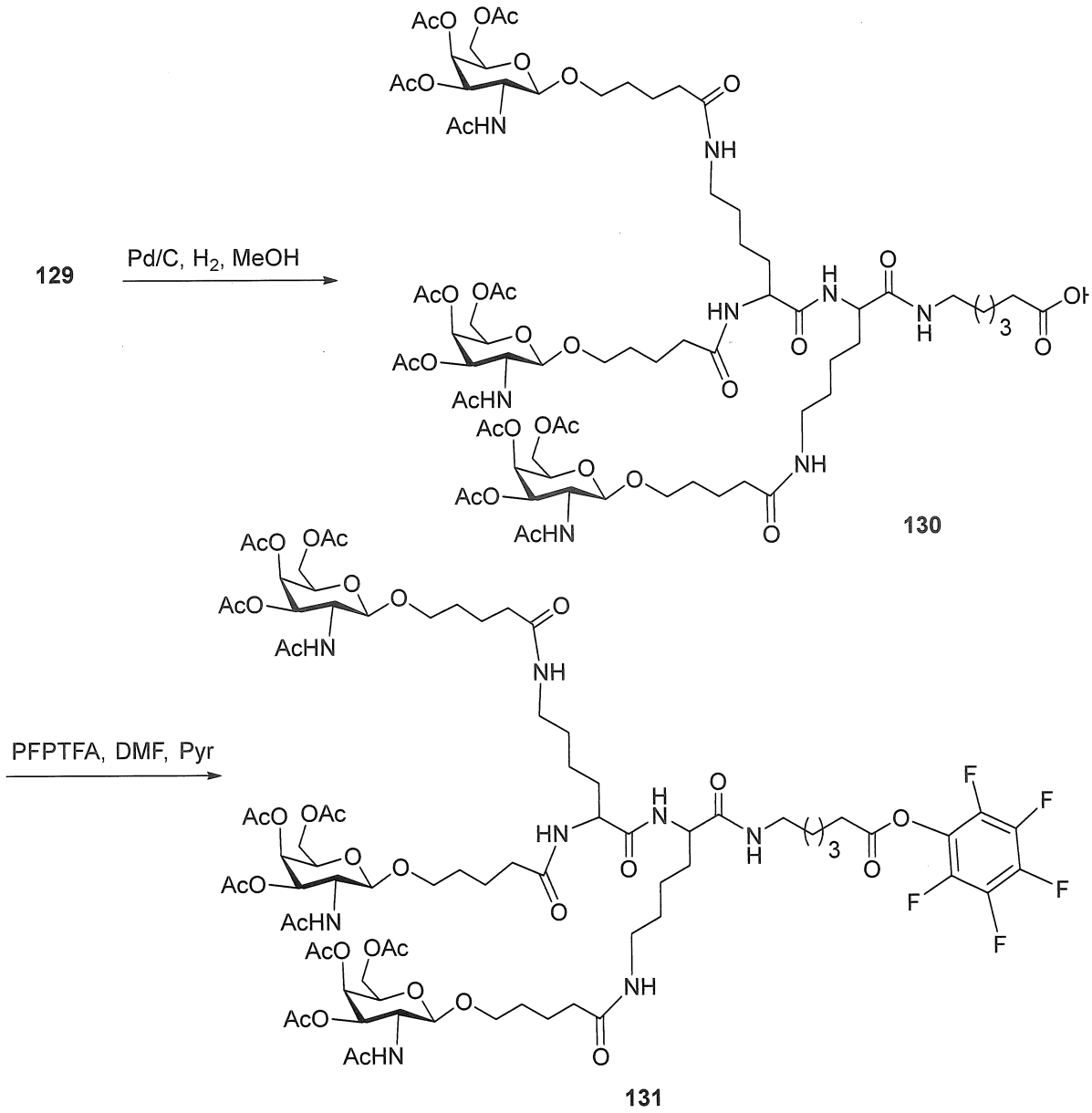
Dung dịch chứa LiOH (92,15mmol) trong nước (20mL) và THF (10mL) được bổ sung vào dung dịch đã nguội chứa hợp chất có công thức 122 (7,75g,13,16mmol) được hòa tan trong metanol (15mL). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 45 phút. và theo dõi theo phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) (EtOAc:hexan; 1:1). Hỗn hợp phản ứng này được cô đến nửa thể tích trong điều kiện áp suất giảm. Dung dịch còn lại được làm nguội trong bể nước đá và được trung hòa bằng cách bổ sung dung dịch HCl đậm đặc. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng, chiết bằng EtOAc (120mL) và rửa bằng nước muối (100mL). Nhũ tương được tạo ra và làm sạch sau khi để yên qua đêm. Lớp hữu cơ được tách được làm khô (Na_2SO_4), lọc và làm bay hơi để tạo ra hợp chất có công thức 123 (8,42 g). Muối còn dư có thể sử dụng lượng quá số d\. LCMS phù hợp với cấu trúc. Sản phẩm được sử dụng không cần tinh chế thêm. M.W.cal:574,36; M.W.fd:575,3 $[M + H]^+$.



Hợp chất có công thức 126 được tổng hợp theo quy trình đã được bộc lộ trong các tài liệu (*J. Am. Chem. Soc.* 2011, *133*, 958-963).


123
126
HOBt, DIEA,
PyBop, Bop, DMF
Boc
HN
Boc
N
H
O
H
N
O
N
H
3
O
O
HN
Boc
127
CF3COOH
CH2Cl2
CF3COO-
NH3
H3N
CF3COO-
CF3COO-
NH3
128
AcO
OAc
AcO
AcHN
7
OH
HATU, HOAt, DIEA, DMF


AcO
OAc
AcO
AcHN
NH
HN
NH
3
NH
129



Hợp chất có công thức 123(7,419g, 12,91mmol), HOBt (3,49g, 25,82mmol) và hợp chất có công thức 126 (6,33g, 16,14mmol) được hòa tan trong và DMF (40mL) và hỗn hợp phản ứng tạo thành được làm nguội trong bể nước đá. *N*,*N*-điisopropyletylamin (4,42mL, 25,82mmol), PyBop (8,7g, 16,7mmol) được bổ sung vào hợp chất này trong khí quyển argon, tiếp theo là tác nhân liên hợp Bop (1,17g, 2,66mmol). Bể nước đá được loại bỏ và dung dịch được nâng nhiệt độ lên đến nhiệt độ trong phòng. Phản ứng được hoàn

thành sau 1 giờ như được xác định theo phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) (DCM:MeOH:AA; 89:10:1). Hỗn hợp phản ứng này được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được hòa tan trong EtOAc (200mL) và rửa bằng 1M $NaHSO_4$ (3x100mL), dung dịch nước $NaHCO_3$ bão hòa (3x100mL) và nước muối (2x100mL). Lớp hữu cơ được tách được làm khô (Na_2SO_4), lọc và cô. Cặn được tinh chế bằng cột sắc ký trên silicagel với gradien 50% hexan/EtOAc đến 100% EtOAc để tạo ra hợp chất có công thức 127 (9,4g) ở dạng bọt màu trắng. LCMS và ^1H NMR là phù hợp với cấu trúc. Khối lượng *m/z* 778,4 $[M + H]^+$.

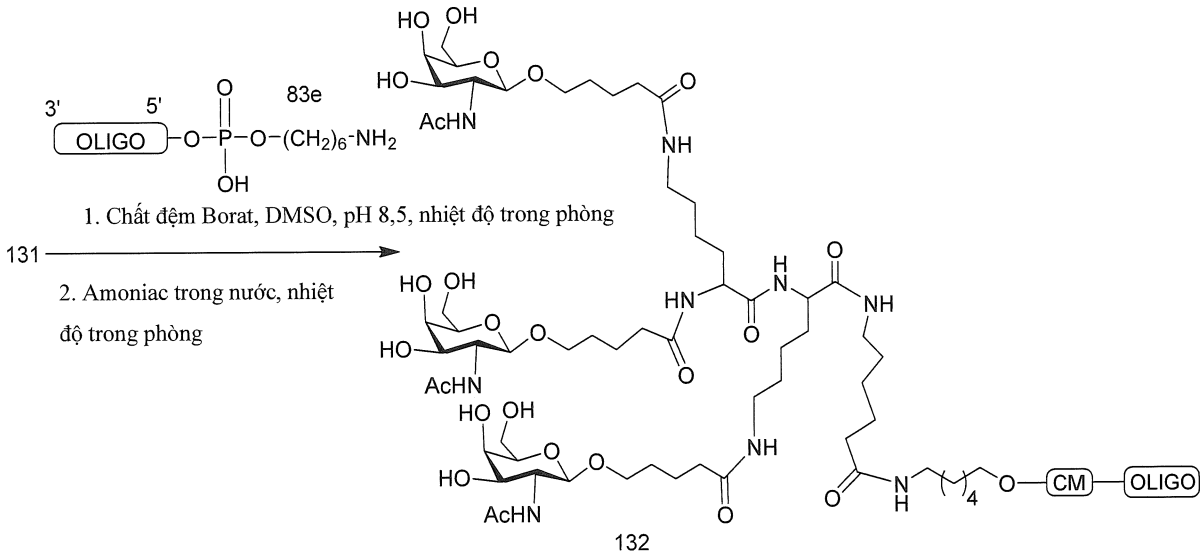
Axit trifloaxetic (12mL) được bổ sung vào dung dịch chứa hợp chất có công thức 127 (1,57g, 2,02mmol) trong điclometan (12mL) và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được làm bay hơi đồng thời với toluen (30mL) trong điều kiện áp suất giảm đến khô. Cặn thu được được làm bay hơi đồng thời hai lần với axetonitril (30mL) và toluen (40mL) để tạo ra hợp chất có công thức 128 (1,67g) là muối axetat triflo và sử dụng ở bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm. LCMS và ^1H NMR là phù hợp với cấu trúc. Khối lượng *m/z*478,2 $[M + H]^+$.

Hợp chất có công thức 7 (0,43g, 0,963mmol), HATU (0,35g, 0,91mmol), và hOAt (0,035g, 0,26mmol) được kết hợp cùng nhau và làm khô trong thời gian 4 giờ over P_2O_5 trong điều kiện áp suất giảm trong bình đáy tròn và sau đó được hòa tan trong DMF khan (1mL) và khuấy trong thời gian 5 phút. *N,N*-điisopropyletylamin (0,2mL) được bổ sung vào dung dịch này chứa hợp chất có công thức 128 (0,20g, 0,26mmol) trong DMF khan (0,2mL). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khí quyển argon. Phản ứng được hoàn thành sau 30 phút như được xác định theo phương pháp LCMS và TLC (7% MeOH/DCM). Hỗn hợp phản ứng này được cô trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được hòa tan trong DCM (30mL) và rửa bằng 1 M $NaHSO_4$ (3x20mL), dung dịch nước $NaHCO_3$ bão hòa (3 x 20mL) và nước muối (3x20mL). Lớp hữu cơ được tách, làm khô trên Na_2SO_4, lọc và cô. Cặn được tinh chế bằng cột sắc ký trên silicagel bằng cách sử dụng 5% đến 15% MeOH trong điclometan để tạo ra hợp chất có công thức 129 (96,6mg). LC MS và ^1H NMR là phù hợp với cấu trúc. Khối lượng *m/z*883,4 $[M + 2H]^+$.

Hợp chất có công thức 129 (0,09g, 0,051mmol) được hòa tan trong metanol

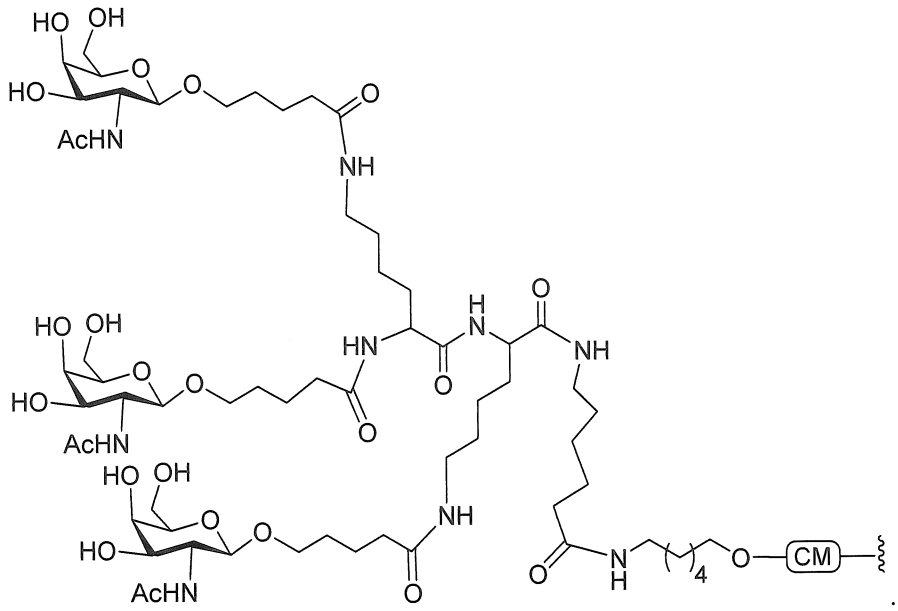
(5mL) trong lọ đếm nhấp nháy loại dung tích 20mL. Lượng nhỏ 10% Pd/C (0,015mg) được bổ sung vào dung dịch này và bình phản ứng được sục khí H_2. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khí quyển H2 trong thời gian 18 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được lọc qua đệm xelit và đệm Celite được rửa bằng metanol. Dịch lọc rửa được gom cùng nhau và cô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất có công thức 130 (0,08g). LCMS và ^{1}H NMR là phù hợp với cấu trúc. Sản phẩm được sử dụng không cần tinh chế thêm. Khối lượng *m/z* 838,3 $[M + 2H]^+$.

Hợp chất có công thức 130 (75,8mg, 0,046mmol), 0,37M pyriđin/DMF (200µl) được bổ sung vào bình đáy tròn có đầu nhọn dung tích 10mL và khuấy. 0,7M pentaflorophenyl trifloaxetat/DMF (100µl) được bổ sung nhỏ giọt vào dung dịch này và khuấy. Phản ứng được hoàn thành sau 1 giờ như được xác định theo phương pháp LC MS. Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm và cặn được hòa tan trong $CHCl_3$ (~ 10mL). Lớp hữu cơ được phân chia against $NaHSO_4$ (1M, 10mL), dung dịch nước $NaHCO_3$ bão hòa (10mL) và nước muối (10mL) ba lần mỗi. Lớp hữu cơ được tách và làm khô trên Na_2SO_4, lọc và cô để tạo ra hợp chất có công thức 131 (77,7mg). LCMS phù hợp với cấu trúc. Được sử dụng mà không cần tinh chế thêm. Khối lượng *m/z* 921,3 $[M + 2H]^+$.

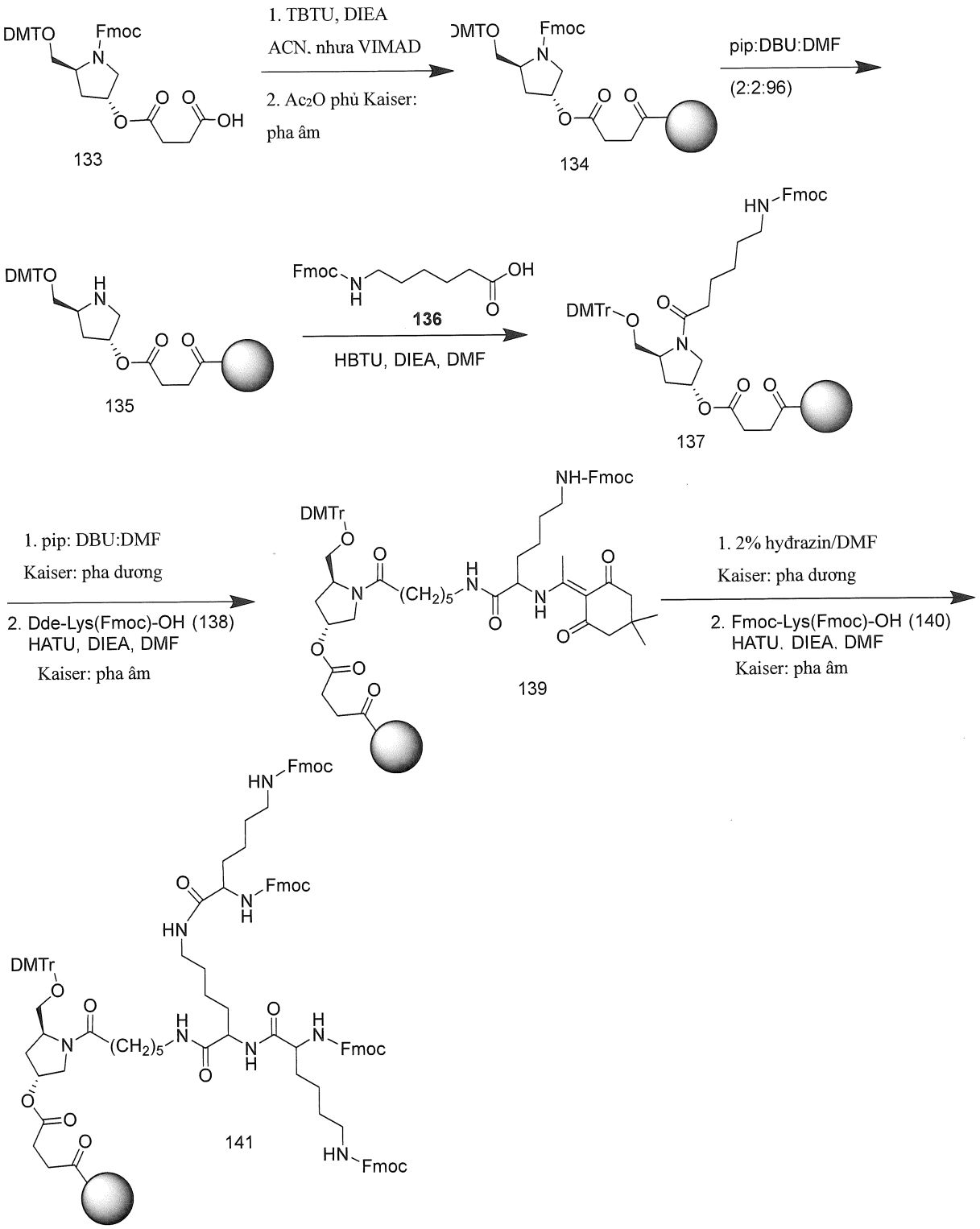


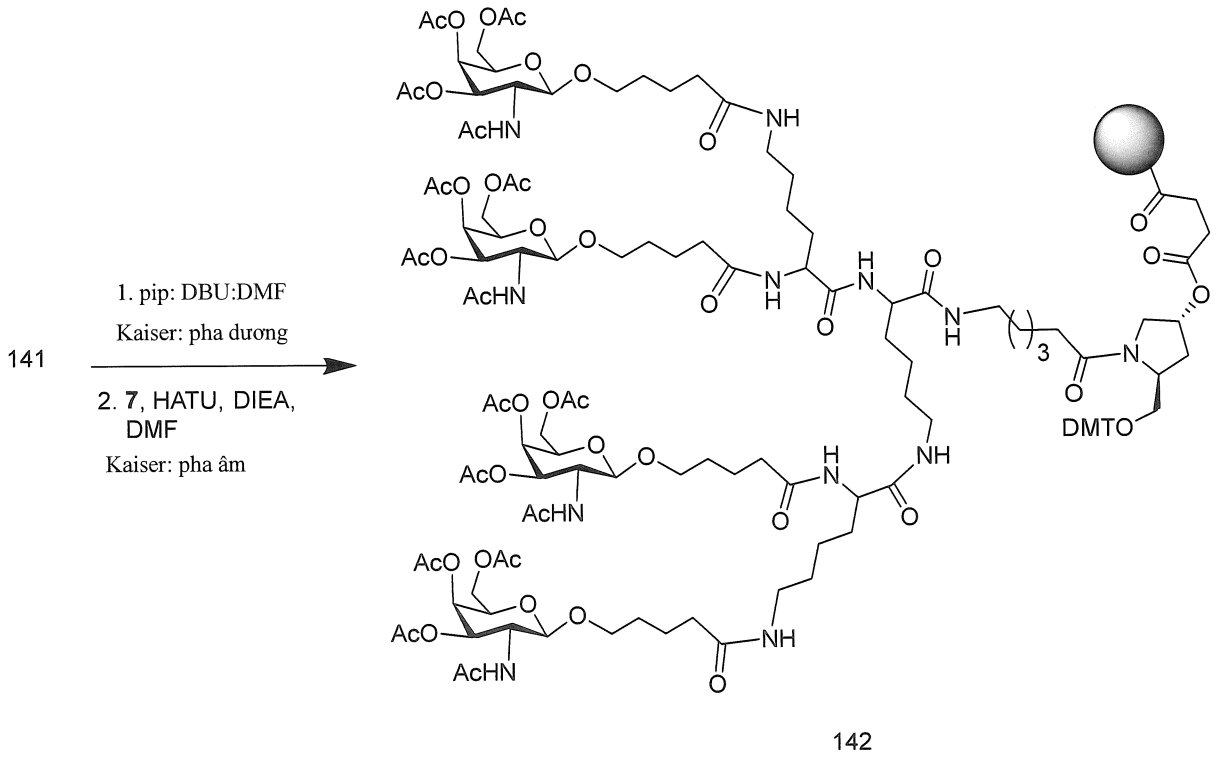
Hợp chất oligome có công thức 132, chứa nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-5, điều chế bằng cách áp dụng các quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 46. Phần cụm $GalNAc_3$ của nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-5 ($GalNAc_3$-5_a) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-.

Cấu trúc của $GalNAc_3$-5 ($GalNAc_3$-5_a-CM-) được thể hiện dưới đây:



Ví dụ 50: Điều chế Oligonucleotit 144 Chứa GalNAc$_4$-11



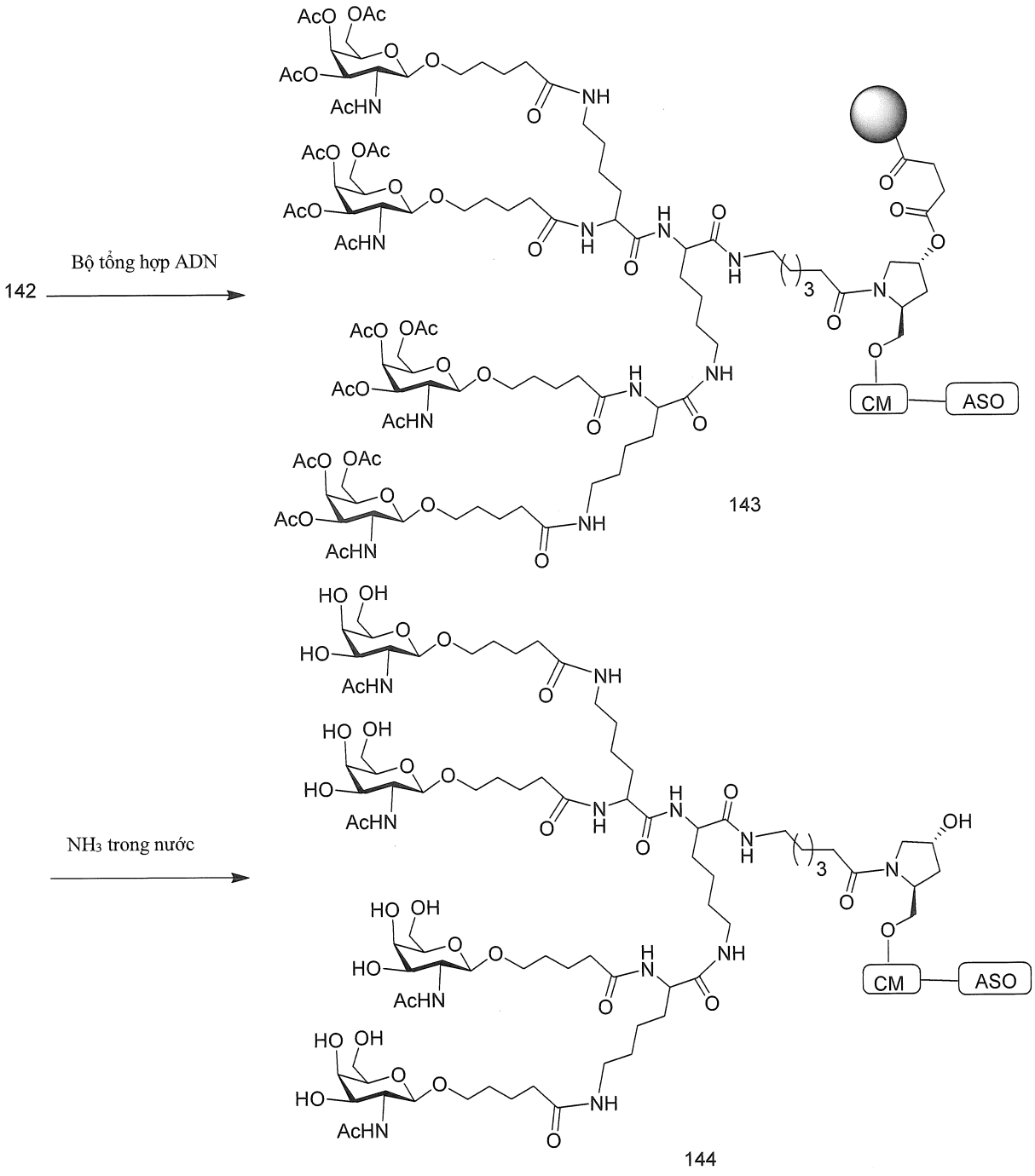


Quy trình tổng hợp hợp chất có công thức 134. Nhựa VIMAD aminomety (2,5g, 450µmol/g) mà được rửa bằng axetonitril, đimetylformamit, điclometan và axetonitril được bổ sung vào bình Merrifield. Nhựa được làm nở ra trong axetonitril (4mL). Hợp chất có công thức 133 được hoạt hóa trước trong bình đáy tròn loại dung tích 100mL bằng cách bổ sung 20 (1,0mmol, 0,747g), TBTU (1,0mmol, 0,321g), axetonitril (5mL) và DIEA (3,0mmol, 0,5mL). Dung dịch này được để khuấy trong thời gian 5 phút và sau đó được bổ sung vào bình Merrifield và lắc. Huyền phù được lắc trong thời gian 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được tháo kiệt và nhựa được rửa bằng axetonitril, DMF và DCM. Việc nạp nhựa mới được đo lường bằng cách đo mức hấp thụ của cation DMTở 500nM (extinction coefficient = 76000) trong DCM và xác định được là 238µmol/g. Nhựa được đậy nắp bằng cách tạo huyền phù trong dung dịch axetic anhyđrit trong thời gian mười phút ba lần.

Hợp chất liên kết nền rắn có công thức 141 được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp peptit pha rắn trên cơ sở Fmoc lặp lại. Lượng nhỏ nền rắn được

thu hồi và tạo huyền phù trong amoniac trong nước (28% đến 30% khối lượng) trong thời gian 6 giờ. Hợp chất đã chia tách được phân tích theo phương pháp LC-MS và khối lượng quan sát là phù hợp với cấu trúc. Khối lượng *m/z*1063,8 $[M + 2H]^+$.

Hợp chất liên kết nền rắn có công thức 142 được tổng hợp bằng cách áp dụng quy trình tổng hợp peptit pha rắn.



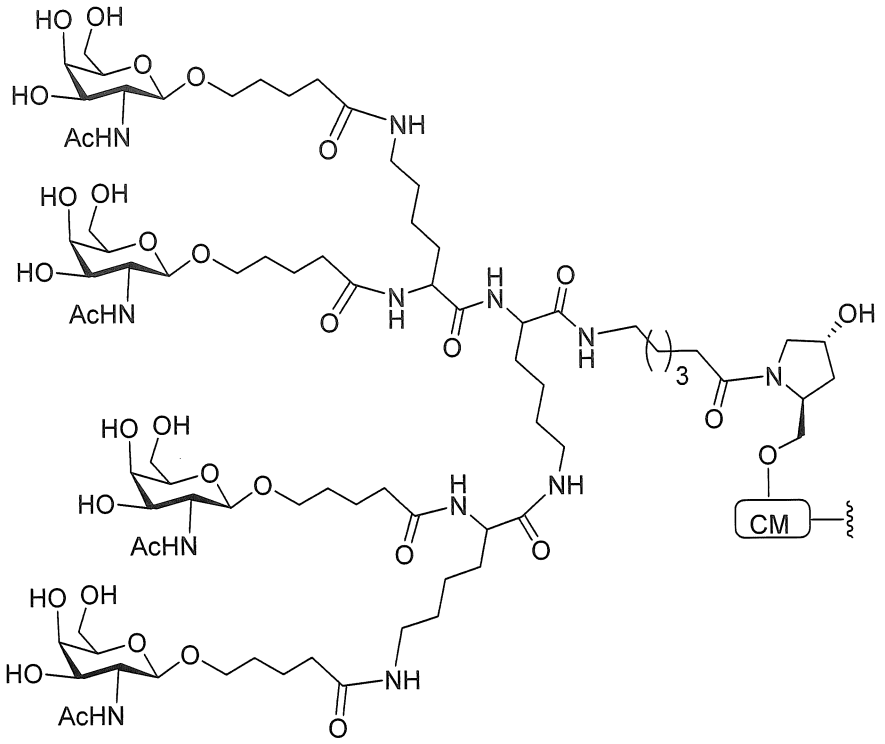
Hợp chất liên kết nền rắn có công thức 143 được tổng hợp bằng cách áp dụng quy trình tổng hợp pha rắn tiêu chuẩn trên bộ tổng hợp ADN.

Hợp chất liên kết nền rắn có công thức 143 được tạo huyền phù trong amoniac trong nước (28% đến 30% khối lượng) và đun nóng ở nhiệt độ 55°C trong thời gian 16

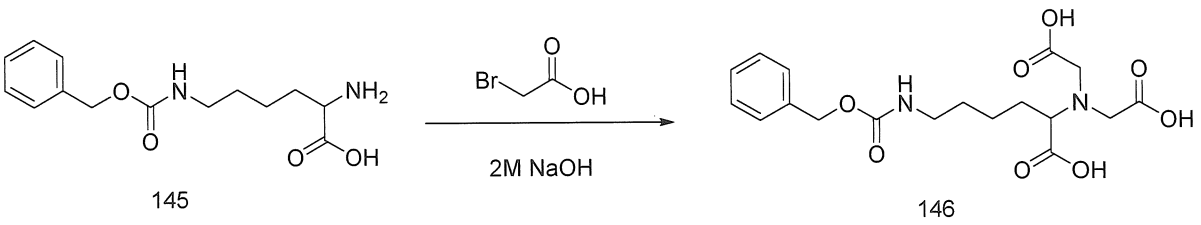
giờ. Dung dịch này được làm nguội và nền rắn được lọc. Dịch lọc được cô và cặn được hòa tan trong nước và tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) trên cột trao đổi anion mạnh. Các phân đoạn chứa hợp chất có chiều dài đầy đủ có công thức 144 được gộp chung với nhau và được khử muối. GalNAc4-11 thu được hợp chất oligome đã tiếp hợp được phân tích theo phương pháp LC-MS và khối lượng quan sát là phù hợp với cấu trúc.

Phần cụm $GalNAc_4$ của nhóm tiếp hợp $GalNAc_4$-11 ($GalNAc_4$-11_a) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-.

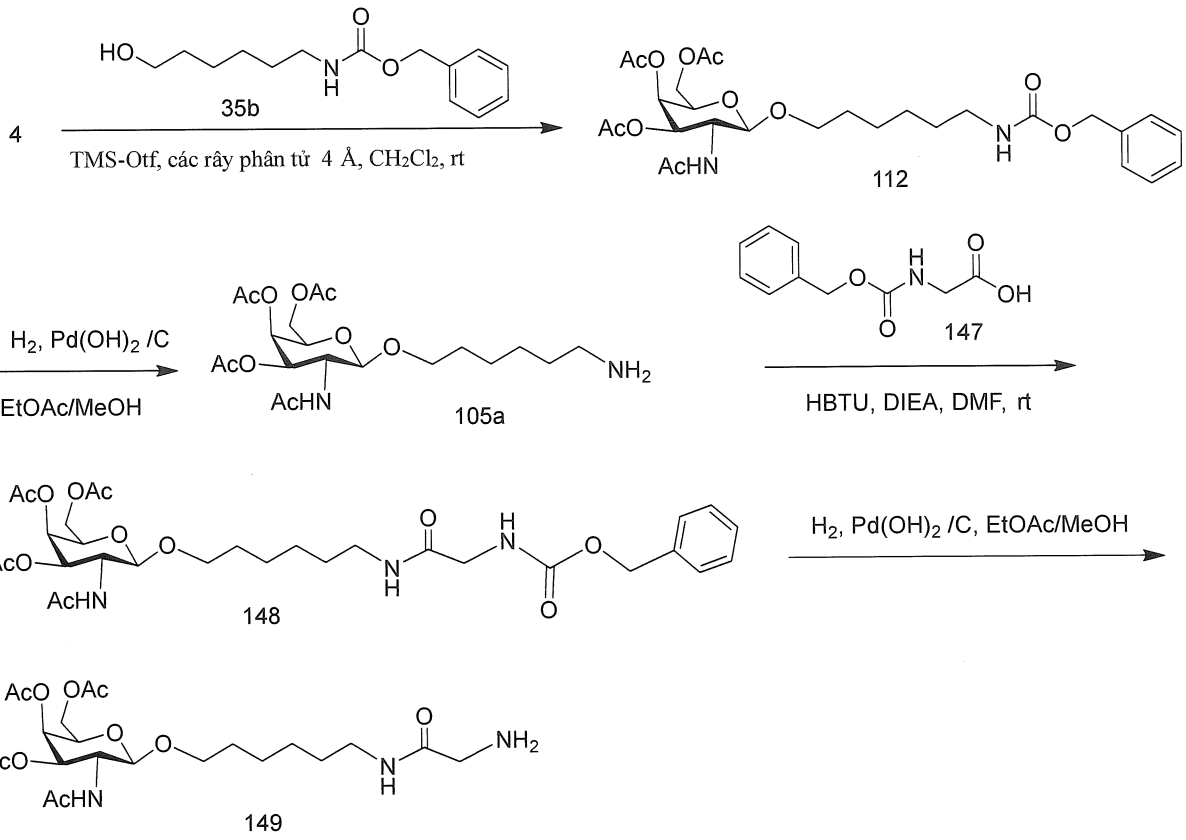
Cấu trúc của $GalNAc_4$-11 ($GalNAc_4$-11_a-CM) được thể hiện dưới đây:



Ví dụ 51: Điều chế oligonucleotit 155 chứa $GalNAc_3$-6



Hợp chất có công thức 146 được tổng hợp như đã được bộc lộ trong các tài liệu (*Analytical Biochemistry* 1995, *229*, 54-60).



Hợp chất có công thức 4 (15g, 45,55mmol) và hợp chất có công thức 35b (14,3 gam, 57mmol) được hòa tan trong CH_2Cl_2 (200mL). Rây phân tử đã hoạt hóa (4 Å. 2g, bột) được bổ sung vào, và hỗn hợp phản ứng này được để khuấy trong thời gian 30 phút trong khí quyển nitơ. TMS-OTf được bổ sung (4,1mL, 22,77mmol) và hỗn hợp phản ứng này được để khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Sau khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng được dừng bằng cách rót vào dung dịch chứa dung dịch $NaHCO_3$ trong nước bão hòa

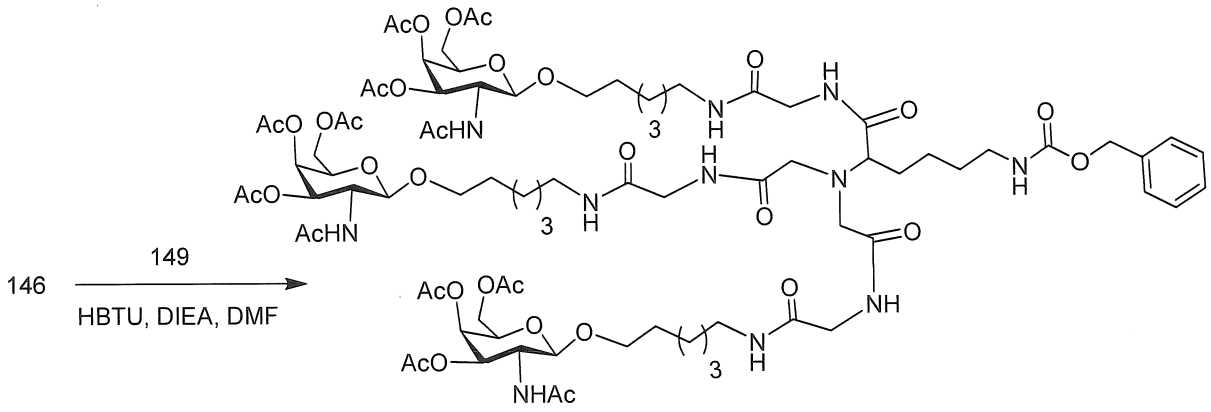
(500mL) và nước đá xay (~ 150g). Lớp hữu cơ được tách, rửa bằng nước muối, làm khô trên $MgSO_4$, lọc, và cô đến dầu màu cam trong điều kiện áp suất giảm. Nguyên liệu thô được tinh chế bằng cột sắc ký trên silicagel và rửa giải bằng 2% đến 10% MeOH trong CH_2Cl_2 để tạo ra hợp chất có công thức 112 (16,53g, 63%). LCMS và ^1H NMR là phù hợp với hợp chất mong muốn.

Hợp chất có công thức 112 (4,27g, 7,35mmol) được hòa tan trong 1:1 MeOH/EtOAc (40mL). Hỗn hợp phản ứng được sục bằng cách sục dòng argon qua dung dịch trong thời gian 15 phút. Chất xúc tác Pearlman (paladi hyđroxit tren cacbon, 400mg) được bổ sung vào, và khí hyđro được sục qua dung dịch trong thời gian 30 phút. Khi đầy đủ (TLC 10% MeOH trong CH_2Cl_2, và LCMS), chất xúc tác được loại bỏ bằng cách lọc qua đệm Celite. Dịch lọc được cô theo phương pháp làm bay hơi kiểu quay, và làm khô trong một thời gian ngắn trong chân không cao để tạo ra hợp chất có công thức 105a (3,28g). LCMS và ^1H NMR là phù hợp với sản phẩm mong muốn.

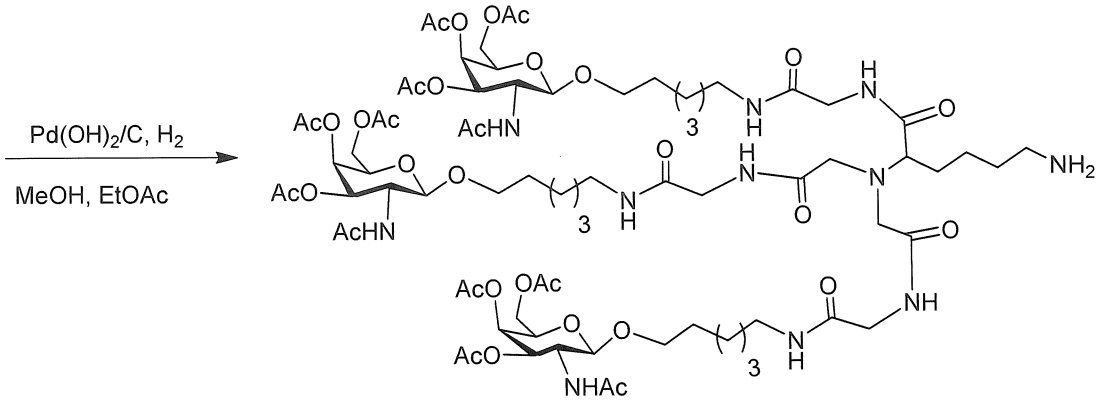
Hợp chất có công thức 147 (2,31g, 11mmol) được hòa tan trong DMF khan (100mL). *N*,*N*-điisopropyletylamin (DIEA, 3,9ml, 22mmol) được bổ sung vào, tiếp theo HBTU (4g, 10,5mmol). Hỗn hợp phản ứng này được để khuấy trong khoảng 15 phút trong khí quyển nitơ. vào dung dịch này chứa hợp chất có công thức 105a (3,3g, 7,4mmol) trong DMF khô được bổ sung vào và khuấy trong thời gian 2 giờ trong khí quyển nitơ. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng EtOAc và rửa bằng dung dịch nước $NaHCO_3$ bão hòa và nước muối. Các chất hữu cơ pha được tách, làm khô ($MgSO_4$), lọc, và cô thành siro màu cam. Nguyên liệu thô được tinh chế theo phương pháp sắc ký cột 2% đến 5% MeOH trong CH_2Cl_2 để tạo ra hợp chất có công thức 148 (3,44g, 73%). LCMS và ^1H NMR là phù hợp với sản phẩm mong muốn.

Hợp chất có công thức 148 (3,3g, 5,2mmol) được hòa tan trong 1:1 MeOH/EtOAc (75mL). Hỗn hợp phản ứng được sục bằng cách sục dòng argon thông qua dung dịch trong thời gian 15 phút. chất xúc tác Pearlman (paladi hyđroxit trên cacbon) được bổ sung (350mg). Khí hyđro được sục qua dung dịch trong thời gian 30 phút. Khi đầy đủ (TLC 10% MeOH trong DCM, và LCMS), chất xúc tác được loại bỏ bằng cách lọc qua đệm xelit. Dịch lọc được cô theo phương pháp làm bay hơi kiểu quay, và làm khô trong một thời gian ngắn trong chân không cao để tạo ra hợp chất có công thức 149 (2,6 g).

LCMS là phù hợp với sản phẩm mong muốn. Cặn được hòa tan trong DMF khan (10mL) được sử dụng ngay lập tức ở bước tiếp theo.



150

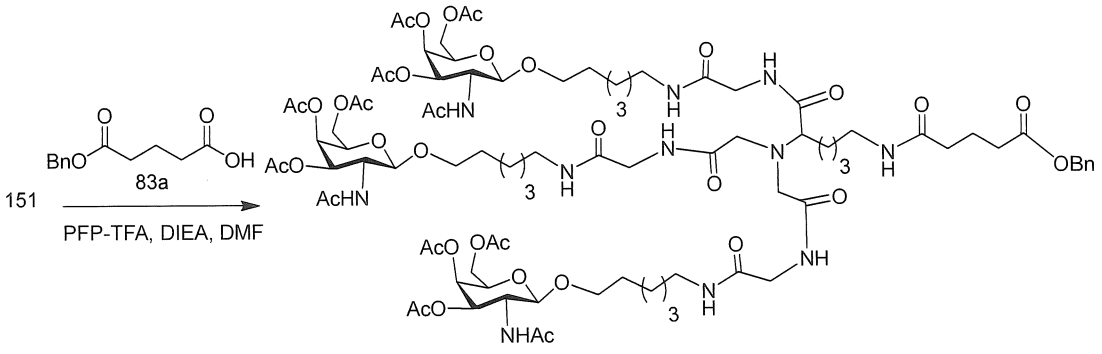


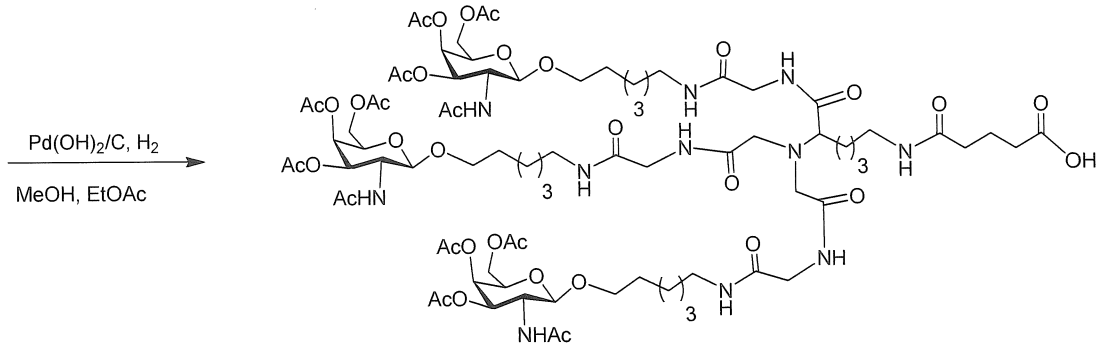
151

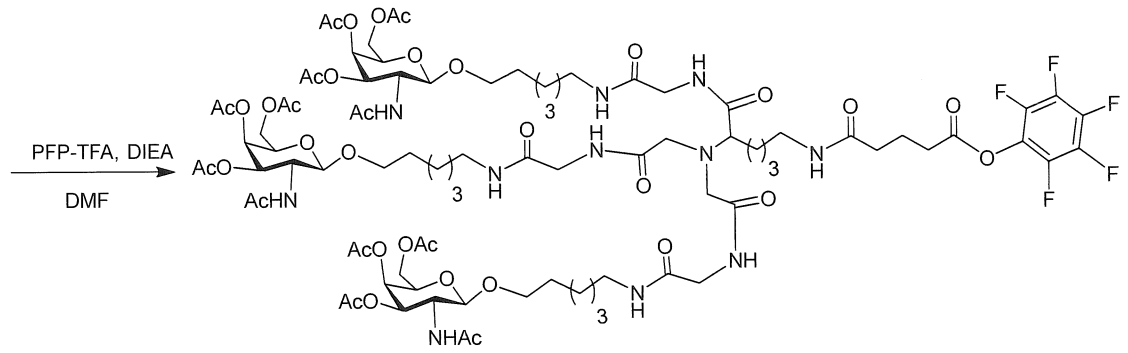
Hợp chất có công thức 146 (0,68g, 1,73mmol) được hòa tan trong DMF khan (20mL). DIEA (450µl, 2,6mmol, 1,5 đương lượng) và hBTU (1,96g, 0,5,2mmol) được bổ sung vào dung dịch này. Hỗn hợp phản ứng này được để khuấy trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng trong khí quyển nitơ. Dung dịch chứa hợp chất có công thức 149 (2,6 g) trong DMF khan (10mL) được bổ sung vào. Độ pH của phản ứng được điều chỉnh đến độ pH = 9 đến 10 bằng cách bổ sung DIEA (nếu cần). Hỗn hợp phản ứng này được để khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong khí quyển nitơ trong thời gian 2 giờ. Sau khi hoàn thành, hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng EtOAc (100mL), và rửa bằng dung dịch nước nước $NaHCO_3$ bão hòa, tiếp theo nước muối. Lớp hữu cơ được tách, làm khô trên

$MgSO_4$, lọc, và cô. Cặn được tinh chế bằng cột sắc ký trên silicagel và rửa giải bằng 2% đến 10% MeOH trong CH_2Cl_2 để tạo ra hợp chất có công thức 150 (0,62g, 20%). LCMS và ^1H NMR là phù hợp với sản phẩm mong muốn.

Hợp chất có công thức 150 (0,62 g) được hòa tan trong 1:1 MeOH/ EtOAc (5L). Hỗn hợp phản ứng được sục bằng cách sục dòng argon thông qua dung dịch trong thời gian 15 phút. chất xúc tác Pearlman (paladi hyđroxit trên cacbon) được bổ sung (60mg). Khí hyđro được sục qua dung dịch trong thời gian 30 phút. Khi đầy đủ (TLC 10% MeOH trong DCM, và LCMS), chất xúc tác được loại bỏ bằng cách lọc (bộ lọc Teflon đầu xiranh, 0,45µm). Dịch lọc được cô theo phương pháp làm bay hơi kiểu quay, và làm khô trong một thời gian ngắn trong chân không cao để tạo ra hợp chất có công thức 151 (0,57g). LCMS là phù hợp với sản phẩm mong muốn. Sản phẩm được hòa tan trong 4mL DMF khan và sử dụng ngay lập tức ở bước tiếp theo.





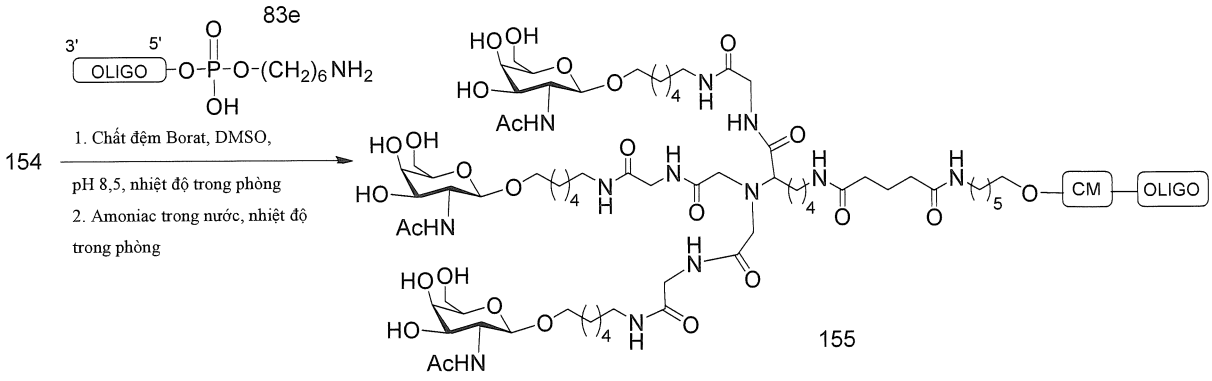


Hợp chất có công thức 83a (0,11g, 0,33mmol) được hòa tan trong DMF khan (5mL) và *N*,*N*-điisopropyletylamin (75µL, 1mmol) và PFP-TFA (90µl, 0,76mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng được quay thành màu đỏ tươi khi tiếp xúc, và được quay dần dần thành màu cam trong 30 phút tiếp theo. Quá trình phản ứng được theo dõi theo phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) và LCMS. Khi hoàn thành (sự hình thành của PFP este), dung dịch chứa hợp chất có công thức 151 (0,57g, 0,33mmol) trong DMF được bổ

sung vào. Độ pH của phản ứng được điều chỉnh đến độ pH = 9 đến 10 bằng cách bổ sung *N*,*N*-điisopropyletylamin (nếu cần). Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong khí quyển nitơ trong khoảng 30 phút. Sau khi hoàn thành, phần lớn dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được pha loãng bằng CH_2Cl_2 và rửa bằng dung dịch nước $NaHCO_3$ bão hòa, tiếp theo nước muối. Lớp hữu cơ được tách, làm khô trên $MgSO_4$, lọc, và cô thành siro màu cam. Cặn được tinh chế bằng cột sắc ký trên silicagel (2% đến 10% MeOH trong CH_2Cl_2) để tạo ra hợp chất có công thức 152 (0,35g, 55%). LCMS và ^1H NMR là phù hợp với sản phẩm mong muốn.

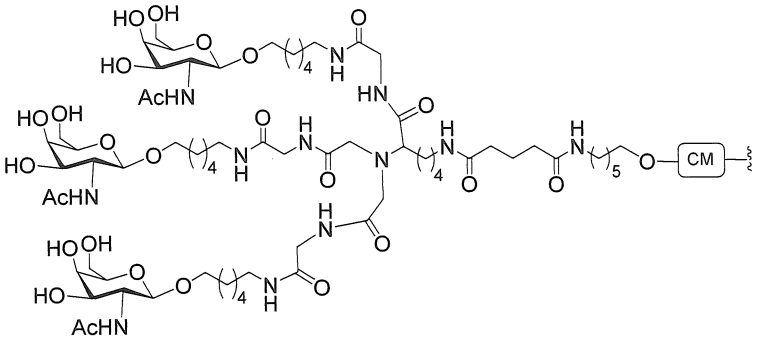
Hợp chất có công thức 152 (0,35g, 0,182mmol) được hòa tan trong 1:1 MeOH/EtOAc (10mL). Hỗn hợp phản ứng được sục bằng cách sục dòng argon qua dung dịch trong thời gian 15 phút. Chất xúc tác Pearlman (paladi hyđroxit trên cacbon) được bổ sung (35mg). Khí hyđro được sục qua dung dịch trong thời gian 30 phút. Khi đầy đủ (TLC 10% MeOH trong DCM, và LCMS), chất xúc tác được loại bỏ bằng cách lọc (bộ lọc Teflon đầu xiranh, 0,45µm). Dịch lọc được cô theo phương pháp làm bay hơi kiểu quay, và làm khô trong một thời gian ngắn trong chân không cao để tạo ra hợp chất có công thức 153 (0,33g, định lượng). LCMS là phù hợp với sản phẩm mong muốn.

Hợp chất có công thức 153 (0,33g, 0,18mmol) được hòa tan trong DMF khan (5mL) và khuấy trong khí quyển nitơ. *N*,*N*-điisopropyletylamin (65µl, 0,37mmol) và PFP-TFA (35µl, 0,28mmol) được bổ sung vào dung dịch này. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong khí quyển nitơ trong khoảng 30 phút. Hỗn hợp phản ứng được quay thành màu đỏ tươi khi tiếp xúc, và được quay dần dần thành màu cam. Độ pH của hỗn hợp phản ứng được duy trì ở độ pH = 9 đến 10 bằng cách bổ sung thêm *N*,-điisopropyletylamin. Tiến trình của phản ứng được theo dõi theo phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) và LCMS. Sau khi hoàn thành, phần lớn dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm. Cặn được pha loãng bằng CH_2Cl_2 (50mL), và rửa bằng dung dịch nước $NaHCO_3$ bão hòa, tiếp theo nước muối. Lớp hữu cơ được làm khô trên $MgSO_4$, lọc, và cô thành siro màu cam. Cặn được tinh chế theo phương pháp sắc ký cột và rửa giải bằng 2% đến 10% MeOH trong CH_2Cl_2 để tạo ra hợp chất có công thức 154 (0,29g, 79%). LCMS và ^1H NMR là phù hợp với sản phẩm mong muốn.

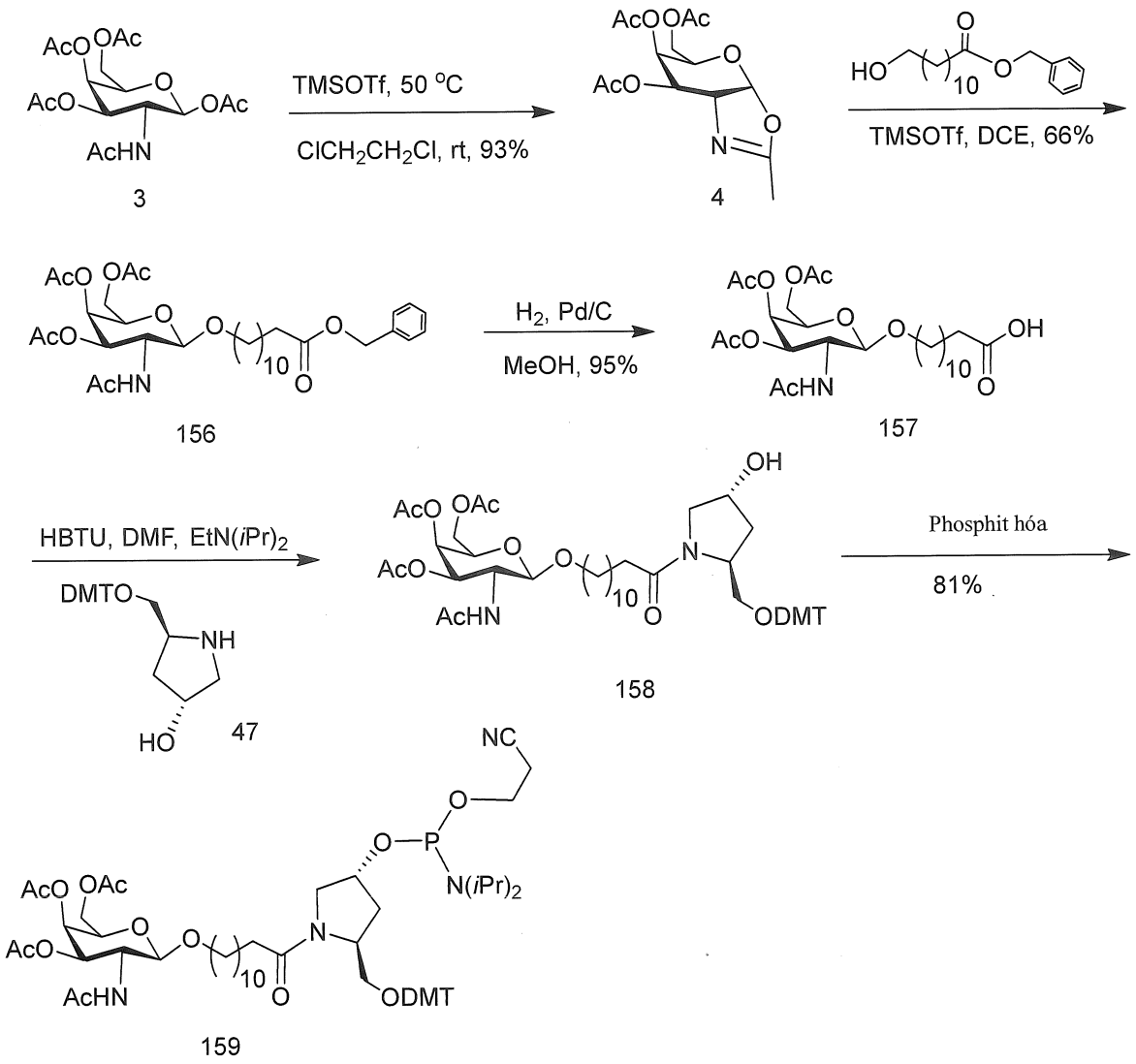


Hợp chất oligome có công thức 155, chứa nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-6, điều chế bằng cách áp dụng các quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 46. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-6 (GalNAc$_3$-6$_a$) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-.

Cấu trúc của GalNAc$_3$-6 (GalNAc$_3$-6$_a$-CM-) được thể hiện dưới đây:



Ví dụ 52: Điều chế Oligonucleotit 160 chứa $GalNAc_3$-9



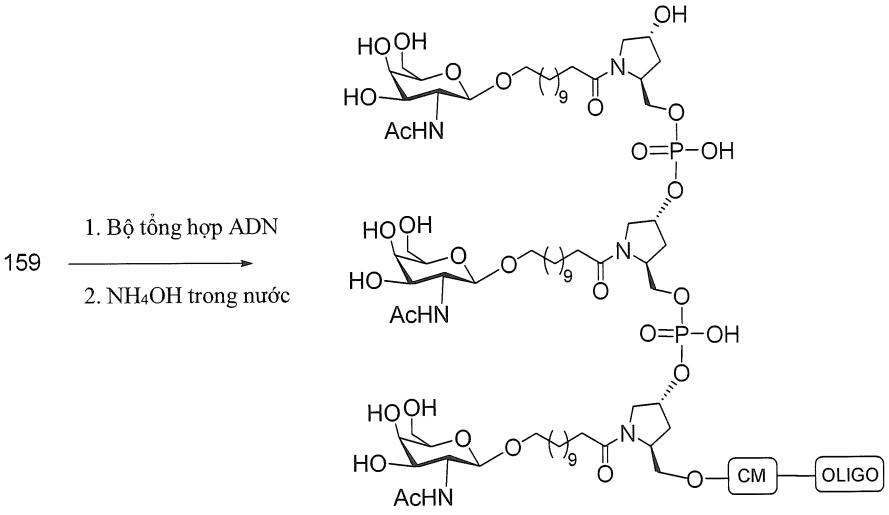
Hợp chất có công thức 156 được tổng hợp theo quy trình đã được bộc lộ trong các tài liệu (*J. Med. Chem.* 2004, *47*, 5798-5808).

Hợp chất có công thức 156, (18,60g, 29,28mmol) được hòa tan trong metanol (200mL). Palađi trên cacbon (6,15g, 10% khối lượng, nạp (cơ sở khô), bột cacbon dính kết, ướt) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong hyđro trong thời gian 18 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được lọc qua đệm xelit và đệm Celite được rửa kỹ bằng metanol. dịch lọc kết hợp được rửa và cô đến khô. Cặn được tinh

chế bằng cột sắc ký trên silicagel và rửa giải bằng 5% đến 10% metanol trong điclometan để tạo ra hợp chất có công thức 157 (14,26g, 89%). Khối lượng *m/z* 544,1 $[M-H]^-$.

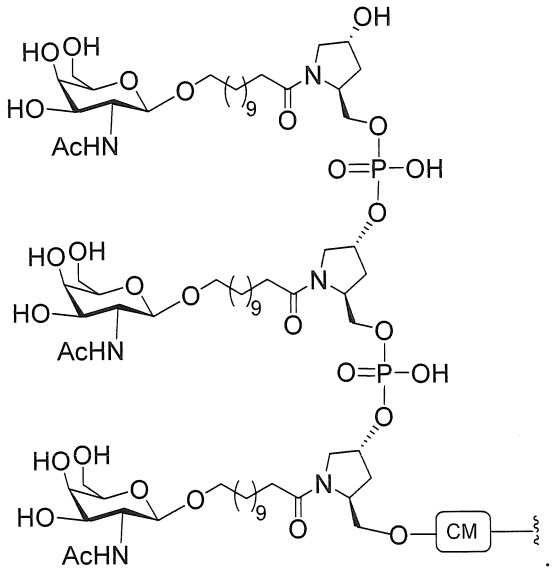
Hợp chất có công thức 157 (5g, 9,17mmol) được hòa tan trong khan DMF (30mL). HBTU (3,65g, 9,61mmol) và *N,N*-điisopropyletylamin (13,73ml, 78,81mmol) được bổ sung vào và hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 phút. vào dung dịch này chứa hợp chất có công thức 47 (2,96g, 7,04mmol) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 8 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được rót vào dung dịch nước $NaHCO_3$ bão hòa. Hỗn hợp này được chiết bằng etyl axetat và lớp hữu cơ được rửa bằng nước muối và làm khô (Na_2SO_4), lọc và làm bay hơi. Cặn thu được tinh chế bằng cột sắc ký trên silicagel và rửa giải bằng 50% etyl axetat trong hexan để tạo ra hợp chất có công thức 158 (8,25g, 73,3%). Cấu trúc được xác nhận bằng phương pháp phân tích MS và ^1H NMR.

Hợp chất có công thức 158 (7,2g, 7,61mmol) được làm khô trên P_2O_5 trong điều kiện áp suất giảm. được sấy khô hợp chất được hòa tan trong DMF khan (50mL). 1H-tetrazol (0,43g, 6,09mmol) và *N*-metylimiđazol (0,3ml, 3,81mmol) và 2-xyanoetyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropyl phosphorođiamidite (3,65mL, 11,50mmol) được bổ sung vào dung dịch này. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong khí quyển argon trong thời gian 4 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được pha loãng bằng etyl axetat (200mL). Hỗn hợp phản ứng này được rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa và nước muối. Lớp hữu cơ được tách, làm khô (Na_2SO_4), lọc và làm bay hơi. Cặn được tinh chế bằng cột sắc ký trên silicagel và rửa giải bằng 50% đến 90% etyl axetat trong hexan để tạo ra hợp chất có công thức 159 (7,82g, 80,5%). Cấu trúc được xác nhận theo phương pháp phân tích LCMS và ^{31}P NMR.

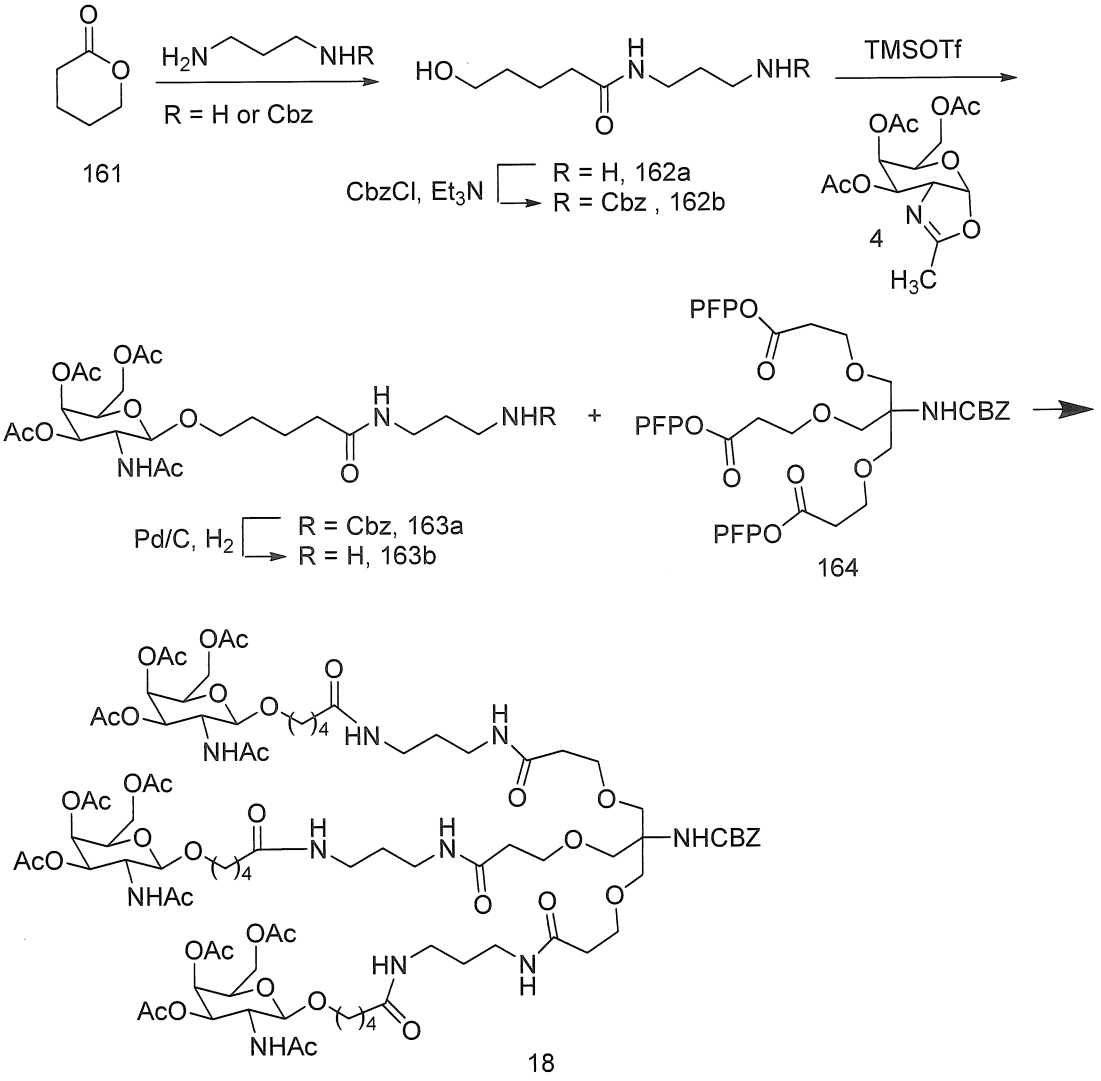


160

Hợp chất oligome có công thức 160, chứa nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-9, điều chế bằng cách sử dụng các quy trình tổng hợp oligonucleotit tiêu chuẩn. Ba đơn vị của hợp chất có công thức 159 được liên hợp với nền rắn, tiếp theo nucleotit các phosphoramiđit. Xử lý hợp chất oligome được bảo vệ bằng amoniac trong nước để tạo ra hợp chất có công thức 160. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-9 (GalNAc$_3$-9$_a$) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-. Cấu trúc của GalNAc$_3$-9 (GalNAc$_3$-9$_a$-CM) được thể hiện dưới đây:



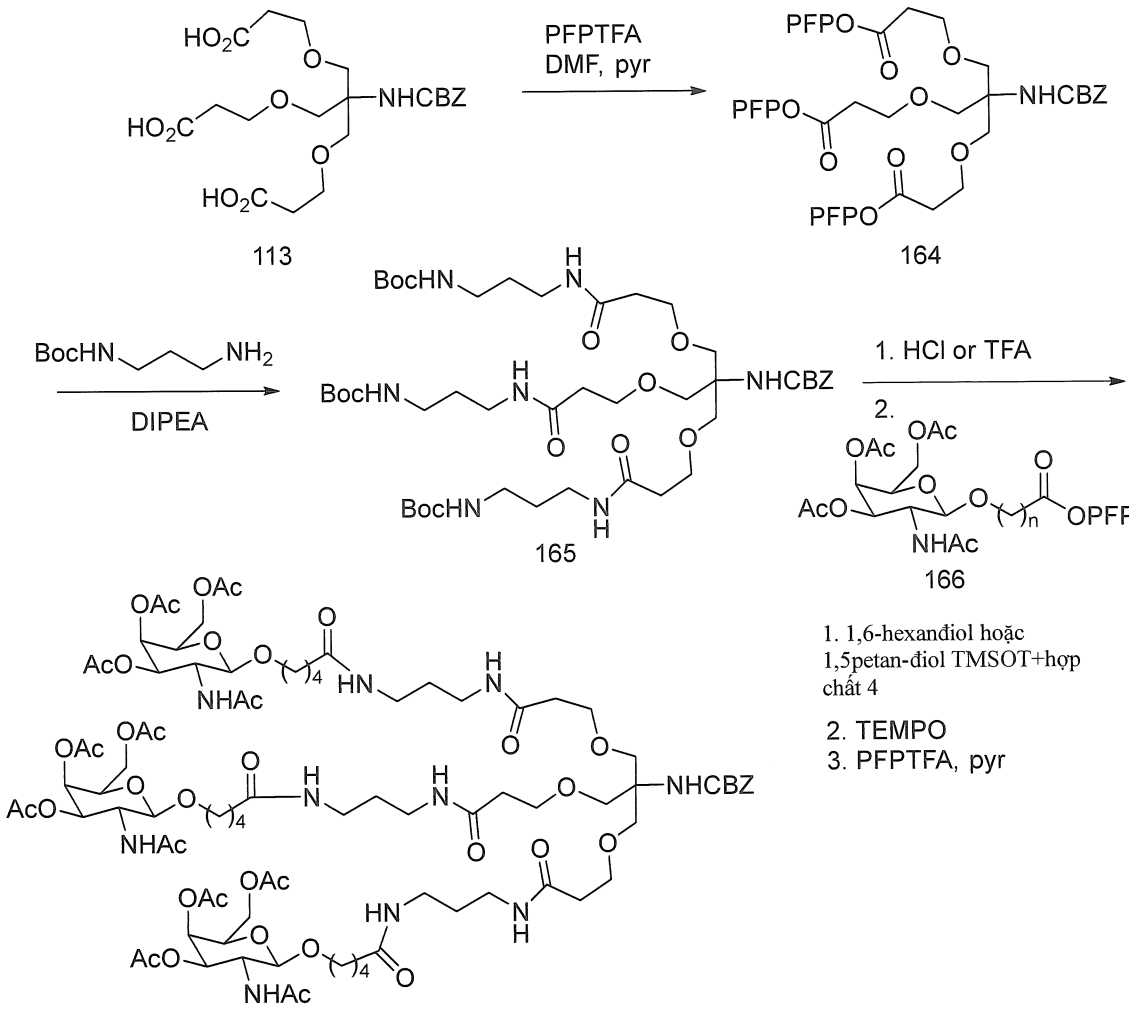
Ví dụ 53: Quy trình khác để điều chế hợp chất có công thức 18 (GalNAc$_3$-1a và GalNAc$_3$-3a)



Lacton có công thức161 được cho phản ứng với điamino propan (3-5 đương lượng) hoặc điamino propan được bảo vệ Mono-Boc (1 đương lượng) để tạo ra rượu 162a hoặc 162b. Khi propanđiamin không được bảo vệ được sử dụng cho phản ứng nêu trên, lượng dư điamin được loại bỏ bằng cách làm bay hơi trong chân không cao và nhóm amin tự do trong 162a được bảo vệ bằng cách sử dụng CbzCl để tạo ra 162b ở dạng rắn màu trắng sau khi tinh chế theo phương pháp sắc ký cột. Rượu 162b còn phản ứng với hợp chất có công thức 4 với sự có mặt của TMSOTf để tạo ra 163a mà được chuyển hóa

đến 163b bằng cách loại bỏ nhóm Cbz bằng cách sử dụng hyđro hóa có xúc tác. Pentaflorophenyl (PFP) este 164 được điều chế bằng cách cho phản ứng với triaxit 113 (xem ví dụ 48) bằng PFPTFA (3,5 đương lượng) và pyriđin (3,5 đương lượng) trong DMF (0,1M đến 0,5M). Trieste 164 được phản ứng trực tiếp với amin 163b (3 đến 4 đương lượng) và DIPEA (3 đến 4 đương lượng) để tạo ra hợp chất có công thức 18. Phương pháp nêu trên rất thuận tiện để tinh chế các chất trung gian và làm giảm đến mức tạo ra sản phẩm phụ tối thiểu sự mà thu được bằng cách áp dụng quy trình được bộc lộ trong Ví dụ 4.

Ví dụ 54: Quy trình khác để điều chế hợp chất có công thức 18 (GalNAc$_3$-1a và GalNAc$_3$-3a)



TriPFP este 164 được điều chế từ axit 113 bằng cách áp dụng quy trình được phác thảo trong Ví dụ 53 nêu trên và phản ứng với điamin được bảo vệ Boc đơn để tạo ra 165 với hiệu suất định lượng. Các nhóm Boc được loại bỏ bằng axit clohyđric hoặc axit trifloaxetic để tạo ra triamin mà được cho phản ứng với PFP được hoạt hóa axit 166 với sự có mặt của bazơ thích hợp như DIPEA để tạo ra hợp chất có công thức 18.

PFP được bảo vệ Gal-NAc axit 166 được điều chế từ axit tương ứng bằng cách xử lý bằng PFPTFA (1 đến 1,2 đương lượng) và pyriđin (1 đến 1,2 đương lượng) trong

DMF. Về phần mình, tiền chất axit được điều chế từ rượu tương ứng bằng cách oxy hóa bằng cách sử dụng TEMPO (0,2 đương lượng) và BAIB trong axetonitril và nước. Tiền chất alcohol được điều chế từ đường trung gian 4 theo phản ứng với 1,6-hexanđiol (hoặc 1,5-pentanđiol hoặc điol khác với các giá trị n khác) (2 đến 4 đương lượng) và TMSOTf bằng cách áp dụng các điều kiện được mô tả trên đây trong Ví dụ 47.

Ví dụ 55: Nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng trên các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp 3' hoặc 5'(so sánh $GalNAc_3$-1, 3, 8 và 9) hướng đích SRB-1 *in vivo*

Các oligonucleotit được nêu dưới đây được thử trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng đối với việc ức chế đối nghĩa của SRB-1 ở chuột nhắt. ISIS 353382 không tiếp hợp được lấy làm chuẩn. Mỗi nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$ khác nhau được gắn vào điểm cuối 3' hoặc 5' của oligonucleotit tương ứng bằng phosphođieste được liên kết 2'-đeoxyađenosin nucleosit (gốc phân cắt được).

Bảng 26

ASO cải biến hướng đích SRB-1

ASO	Trình tự (5' đến 3')	Kiểu	Thể tiếp hợp	SEQ ID No.
ISIS 353382 (gốc)	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	không	28
ISIS 655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-$GalNAc_3$-$\mathbf{1_a}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-1**	29
ISIS 664078	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-$GalNAc_3$-$\mathbf{9_a}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-9**	29
ISIS 661161	$GalNAc_3$-$\mathbf{3_{a\text{-}o'}A_{do}}$ $G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-3**	30
ISIS 665001	$GalNAc_3$-$\mathbf{8_{a\text{-}o'}A_{do}}$ $G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-8**	30

Các chữ cái viết hoa biểu thị nucleobazơ với mỗi nucleosit và ${}^{m}C$ biểu thị 5-metyl xytosin. Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE; "d" biểu thị β-D-2'-

đeoxyribonucleosit; "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa nucleosit (PS); "o" biểu thị liên kết giữa nucleosit phosphođieste (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. Các nhóm tiếp hợp được in đậm.

Cấu trúc của GalNAc$_3$-**1**$_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 9. Cấu trúc của GalNAc$_3$-9 được thể hiện trên đây trong Ví dụ 52. Cấu trúc của GalNAc$_3$-3 được thể hiện trên đây trong Ví dụ 39. Cấu trúc của GalNAc$_3$-8 được thể hiện trên đây trong Ví dụ 47.

Điều trị bệnh

Các con chuột đực Balb/c sáu tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được tiêm dưới da một lần ISIS 353382, 655861, 664078, 661161, 665001 với liều lượng được thể hiện bằng hoặc bằng nước muối. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng để xác định lượng ARN thông tin của SRB-1 ở gan bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng ARN thông tin của SRB-1 cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa với sự điều khiển nước muối.

Như được thể hiện trong Bảng 27, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của SRB-1 theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng. Thực vậy, các oligonucleotit đối nghĩa chứa phosphođieste được liên kết GalNAc$_3$-**1** và GalNAc$_3$-9 các thể tiếp hợp ở đầu tận cùng 3' (ISIS 655861 và ISIS 664078) và thể tiếp hợp GalNAc$_3$-3 và GalNAc$_3$-8 được liên kết ở đầu tận cùng 5' (ISIS 661161 và ISIS 665001) thể gần như nâng cao về hiệu nghiệm so với đối nghĩa không thể tiếp hợp của oligonucleotit (ISIS 353382). Hơn thế nữa, ISIS 664078, chứa GalNAc$_3$-9 thể tiếp hợp ở đầu tận cùng 3' gần như đẳng thế so với ISIS 655861, mà chứa thể tiếp hợp GalNAc$_3$-**1** ở đầu tận cùng 3'. các oligonucleotit đối nghĩa đã tiếp hợp ở đầu 5', ISIS 661161 và ISIS 665001, chứa lần lượt GalNAc$_3$-3 hoặc GalNAc$_3$-9 được tăng hiệu nghiệm so với các oligonucleotit đối nghĩa đã tiếp hợp ở đầu tận cùng 3' (ISIS 655861 và ISIS 664078).

Bảng 27

ASOs chứa $GalNAc_3$-1, 3, 8 hoặc 9 hướng đích SRB-1

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ARN thông tin của SRB-1 (% nước muối)	Thể tiếp hợp
Nước muối	n/a	100	
353382	3	88	không
	10	68	
	30	36	
655861	0,5	98	**$GalNac_3$ -1** (3')
	1,5	76	
	5	31	
	15	20	
664078	0,5	88	**$GalNAc_3$-9** (3')
	1,5	85	
	5	46	
	15	20	
661161	0,5	92	**$GalNAc_3$-3** (5')
	1,5	59	
	5	19	
	15	11	
665001	0,5	100	**$GalNAc_3$-8** (5')
	1,5	73	
	5	29	
	15	13	

Các mức traxaminaza của gan, alanin aminotransferaza (ALT) và aspartat aminotransferaza (AST), trong huyết thanh được đo so với nước muối được tiêm vào chuột nhắt bằng cách sử dụng các cách thức chuẩn. Tổng bilirubin và BUN sẽ được đánh giá. Thay đổi về thể trọng được đánh giá không có khác biệt đáng kể so với nhóm nước muối. Các ALT, AST, tổng bilirubin và giá trị BUN được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 28

ISIS số	Liều lượng mg/kg	ALT	AST	Tổng Bilirubin	BUN	Thể tiếp hợp
Nước muối		24	59	0,1	37,52	
353382	3	21	66	0,2	34,65	không
	10	22	54	0,2	34,2	
	30	22	49	0,2	33,72	
655861	0,5	25	62	0,2	30,65	**GalNAc$_3$-1 (3')**
	1,5	23	48	0,2	30,97	
	5	28	49	0,1	32,92	
	15	40	97	0,1	31,62	
664078	0,5	40	74	0,1	35,3	**GalNAc$_3$-9** (3')
	1,5	47	104	0,1	32,75	
	5	20	43	0,1	30,62	
	15	38	92	0,1	26,2	
661161	0,5	101	162	0,1	34,17	**GalNAc$_3$-3** (5')
	1,5 g	42	100	0,1	33,37	
	5 g	23	99	0,1	34,97	
	15	53	83	0,1	34,8	
665001	0,5	28	54	0,1	31,32	**GalNAc$_3$-8** (5')
	1,5	42	75	0,1	32,32	
	5	24	42	0,1	31,85	
	15	32	67	0,1	31.	

Ví dụ 56: Nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng của các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp 3' hoặc 5' (so sánh GalNAc$_3$-1, 2, 3, 5, 6, 7 và 10) hướng đích SRB-1 *in vivo*

Các oligonucleotit được nêu dưới đây được thử trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng đối với việc ức chế đối nghĩa của SRB-1 ở chuột nhắt. ISIS 353382 không tiếp hợp được dùng làm chuẩn. Mỗi nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$ khác nhau được gắn vào đầu tận cùng 5' của oligonucleotit tương ứng bằng phosphođieste được liên kết 2'-đeoxyađenosin

nucleosit (gốc phân cắt được) trừ ISIS 655861 mà có nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$ được gắn ở đầu tận cùng 3'.

Bảng 29

ASO cải biến hướng đích SRB-1

ASO	Trình tự (5' đến 3')	Kiểu	**Thể tiếp hợp**	SEQ ID No.
ISIS 353382 (gốc)	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	Không có thể tiếp hợp	28
ISIS 655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-$GalNAc_3$-**1**$_a$	5/10/5	**$GalNAc_3$-1**	29
ISIS 664507	$GalNAc_3$-**2**$_{a\text{-}o}$-$\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-2**	30
ISIS 661161	$GalNAc_3$-**3**$_{a\text{-}o}$-$\mathbf{A_{do}}$ $G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-3**	30
ISIS 666224	$GalNAc_3$-**5**$_{a\text{-}o}$-$\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-5**	30
ISIS 666961	$GalNAc_3$-**6**$_{a\text{-}o}$-$\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-6**	30
ISIS 666981	$GalNAc_3$-**7**$_{a\text{-}o}$-$\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-7**	30
ISIS 666881	$GalNAc_3$-**10**$_{a\text{-}o}$-$\mathbf{A_{do}}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**$GalNAc_3$-10**	30

Các chữ cái viết hoa biểu thị nucleobazơ đối với mỗi nucleosit và ^{m}C biểu thị 5-metyl xytosin. Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE; "d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa nucleosit (PS); "o" biểu thị liên kết giữa nucleosit phosphođieste (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. các nhóm tiếp hợp được in đậm.

Cấu trúc của $GalNAc_3$-**1**$_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 9. Cấu trúc của $GalNAc_3$-2_a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 37. Cấu trúc của $GalNAc_3$-3_a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 39. Cấu trúc của $GalNAc_3$-5_a được thể hiện trên đây trong Ví dụ

49. Cấu trúc của $GalNAc_3$-6_a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 51. Cấu trúc của $GalNAc_3$-7_a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 48. Cấu trúc của $GalNAc_3$-10_a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 46.

Điều trị bệnh

Các con chuột nhắt Balb/c đực sáu tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được tiêm dưới da một lần với liều lượng được thể hiện dưới đây bằng ISIS 353382, 655861, 664507, 661161, 666224, 666961, 666981, 666881 hoặc bằng nước muối. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng để xác định lượng ARN thông tin của SRB-1 ở gan bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Các kết quả dưới đây được đưa ra theo phần trăm trung bình của lượng ARN thông tin của SRB-1 cho mỗi nhóm thử nghiệm, theo nước muối đối chứng.

Như được thể hiện trong Bảng 30, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của SRB-1 theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng. Thực vậy, các oligonucleotit đối nghĩa đã tiếp hợp thể hiện hiệu lực về cơ bản tăng so với oligonucleotit đối nghĩa chưa tiếp hợp (ISIS 353382). Các oligonucleotit đối nghĩa đã tiếp hợp ở đầu tận cùng 5' có hiệu lực tăng so với oligonucleotit đối nghĩa đã tiếp hợp ở đầu tận cùng 3'.

Bảng 30

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ARN thông tin của SRB-1 (% Nước muối)	Thể tiếp hợp
Nước muối	n/a	100,0	
353382	3	96,0	không
	10	73,1	
	30	36,1	
655861	0,5	99,4	**$GalNAc_3$-1 (3')**
	1,5	81,2	

	5	33,9	
	15	15,2	
664507	0,5	102,0	**GalNAc$_3$-2 (5')**
	1,5	73,2	
	5	31,3	
	15	10,8	
661161	0,5	90,7	**GalNAc$_3$-3 (5')**
	1,5	67,6	
	5	24,3	
	15	11,5	
666224	0,5	96,1	**GalNAc$_3$-5 (5')**
	1,5	61,6	
	5	25,6	
	15	11,7	
666961	0,5	85,5	**GalNAc$_3$-6 (5')**
	1,5	56,3	
	5	34,2	
	15	13,1	
666981	0,5	84,7	**GalNAc$_3$-7 (5')**
	1,5	59,9	
	5	24,9	
	15	8,5	
666881	0,5	100,0	**GalNAc$_3$-10 (5')**
	1,5	65,8	
	5	26,0	
	15	13,0	

Các mức traxaminaza của gan, alanin aminotransferaza (ALT) và aspartat aminotransferaza (AST), trong huyết thanh được đo so với nước muối được tiêm vào chuột nhắt bằng cách sử dụng các cách thức chuẩn. Tổng bilirubin và BUN sẽ được đánh giá. Thay đổi về thể trọng được đánh giá không có khác biệt đáng kể so với nhóm nước muối. ALTs, ASTs, tổng bilirubin và giá trị BUN được thể hiện trong Bảng 31 dưới đây.

Bảng 31

ISIS số	Liều lượng mg/kg	ALT	AST	Tổng bilirubin	BUN	Thể tiếp hợp
Nước muối		26	57	0,2	27	
353382	3	25	92	0,2	27	không
	10	23	40	0,2	25	
	30	29	54	0,1	28	
655861	0,5	25	71	0,2	34	**GalNAc$_3$-1 (3')**
	1,5	28	60	0,2	26	
	5	26	63	0,2	28	
	15	25	61	0,2	28	
664507	0,5	25	62	0,2	25	**GalNAc$_3$-2 (5')**
	1,5	24	49	0,2	26	
	5	21	50	0,2	26	
	15	59	84	0,1	22	
661161	0,5	20	42	0,2	29	**GalNAc$_3$-3 (5')**
	1,5 g	37	74	0,2	25	
	5 g	28	61	0,2	29	
	15	21	41	0,2	25	
666224	0,5	34	48	0,2	21	**GalNAc$_3$-5 (5')**
	1,5	23	46	0,2	26	
	5	24	47	0,2	23	
	15	32	49	0,1	26	
666961	0,5	17	63	0,2	26	**GalNAc$_3$-6 (5')**
	1,5	23	68	0,2	26	
	5	25	66	0,2	26	
	15	29	107	0,2	28	
666981	0,5	24	48	0,2	26	**GalNAc$_3$-7 (5')**
	1,5	30	55	0,2	24	
	5	46	74	0,1	24	

	15	29	58	0,1	26	
666881	0,5	20	65	0,2	27	**GalNAc$_3$-10 (5')**
	1,5	23	59	0,2	24	
	5	45	70	0,2	26	
	15	21	57	0,2	24	

Ví dụ 57: Khoảng thời gian nghiên cứu hoạt động của các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp 3' hướng đích ApoC III *in vivo*

Chuột nhắt được tiêm một lần với các liều lượng được thể hiện dưới đây và kiểm soát trong thời gian 42 ngày đối với các mức ApoC-III và triglyxerit trong huyết tương (Plasma TG). Nghiên cứu này được thực hiện bằng cách sử dụng 3 con chuột nhắt chuyển gen mà biểu hiện APOC-III của người ở mỗi nhóm.

Bảng 32

ASO cải biến hướng đích ApoC III

ASO	Trình tự (5' đến 3')	Các liên kết	SEQ ID No.
ISIS 304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	PS	20
ISIS 647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_3$-**1**$_a$	PS	21
ISIS 647536	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_3$-**1**$_a$	PO/PS	21

Các chữ cái viết hoa biểu thị nucleobazơ đối với mỗi nucleosit và ^{m}C biểu thị 5-metyl xytosin. Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE; "d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa nucleosit (PS); "o" biểu thị liên kết giữa nucleosit phosphođieste (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. các nhóm tiếp hợp được in đậm.

Cấu trúc của GalNAc$_3$-**1**$_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 9.

Bảng 33

Các mức ARN thông tin của ApoC III (% nước muối vào ngày thứ 1) và huyết tương TG (% nước muối vào ngày thứ 1)

ASO	Liều lượng	Target	Ngày thứ 3	Ngày thứ 7	Ngày thứ 14	Ngày thứ 35	Ngày thứ 42
Nước muối	0mg/kg	ApoC-III	98	100	100	95	116
ISIS 304801	30mg/kg	ApoC-III	28	30	41	65	74
ISIS 647535	10mg/kg	ApoC-III	16	19	25	74	94
ISIS 647536	10mg/kg	ApoC-III	18	16	17	35	51
Nước muối	0mg/kg	Plasma TG	121	130	123	105	109
ISIS 304801	30mg/kg	Plasma TG	34	37	50	69	69
ISIS 647535	10mg/kg	Plasma TG	18	14	24	18	71
ISIS 647536	10mg/kg	Plasma TG	21	19	15	32	35

Như có thể thấy trong bảng nêu trên khoảng thời gian hoạt động tăng khi bổ sung nhóm tiếp hợp ở đầu tận cùng 3' so với oligonucleotit không tiếp hợp. Khoảng thời gian hoạt động còn tăng đối với oligonucleotit PO/PS hỗn hợp đã tiếp hợp 647536 so với oligonucleotit PS đầy đủ đã tiếp hợp 647535.

Ví dụ 58: Nhiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng của các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp ở đầu tận cùng 3' (so sánh $GalNAc_3$-1 và $GalNAc_4$-11) hướng đích SRB-1 *in vivo*

Các oligonucleotit được nêu dưới đây được thử trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng đối với việc ức chế đối nghĩa của SRB-1 ở chuột nhắt. ISIS 440762 không tiếp hợp bao gồm chuẩn không tiếp hợp. Mỗi nhóm tiếp hợp được được gắn ở đầu tận cùng 3' của oligonucleotit tương ứng bằng phosphođieste được liên kết gốc phân cắt được 2'-đeoxyađenosin nucleosit.

Cấu trúc của $GalNAc_3$-$\mathbf{1}_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 9. Cấu trúc của $GalNAc_3$-$\mathbf{11}_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 50.

Điều trị bệnh

Các con chuột đực Balb/c sáu tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được tiêm dưới da một lần với liều lượng được thể hiện dưới đây bằng ISIS 440762, 651900, 663748 hoặc bằng nước muối. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng để xác định lượng ARN thông tin của SRB-1 ở gan bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng ARN thông tin của SRB-1 cho mỗi nhóm thử nghiệm, theo nước muối đối chứng.

Như được thể hiện trong Bảng 34, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của SRB-1 theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng. Các oligonucleotit đối nghĩa chứa phosphođieste được liên kết các thể tiếp hợp GalNAc$_3$-**1** và GalNAc$_4$-11 ở đầu tận cùng 3' (ISIS 651900 và ISIS 663748) thể hiện hiệu lực về cơ bản tăng so với oligonucleotit đối nghĩa không tiếp hợp (ISIS 440762). Hai oligonucleotit đã tiếp hợp, GalNAc$_3$-**1** và GalNAc$_4$-11, là có hiệu lực bằng nhau.

Bảng 34

ASO cải biến hướng đích SRB-1

ASO	Trình tự (5' đến 3')	Liều lượng mg/kg	% điều khiển nước muối	SEQ ID No.
Nước muối			100	
ISIS 440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	0,6	73,45	22
		2	59,66	
		6	23,50	
ISIS 651900	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ko}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_3$-**1**$_a$	0,2	62,75	23
		0,6	29,14	
		2	8,61	
		6	5,62	
ISIS 663748	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ko}\mathbf{A_{do'}}$-**GalNAc$_4$-11**$_a$	0,2	63,99	23
		0,6	33,53	
		2	7,58	
		6	5,52	

Các chữ cái viết hoa biểu thị nucleobazơ đối với mỗi nucleosit và ^{m}C biểu thị 5-metyl xytosin. Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE; "k" biểu thị 6'-(*S*)-CH_3 nucleosit hai vòng; "d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa nucleosit (PS); "o" biểu thị liên kết giữa nucleosit phosphođieste (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. các nhóm tiếp hợp được in đậm.

Các mức traxaminaza của gan, alanin aminotransferaza (ALT) và aspartat aminotransferaza (AST), trong huyết thanh được đo so với nước muối được tiêm vào chuột nhắt bằng cách sử dụng các cách thức chuẩn. Tổng bilirubin và BUN sẽ được đánh giá. Thay đổi về thể trọng được đánh giá không có khác biệt đáng kể so với nhóm nước muối. Các ALT, AST, tổng bilirubin và giá trị BUN được thể hiện trong Bảng 35 dưới đây.

Bảng 35

ISIS số	Liều lượng mg/kg	ALT	AST	Tổng bilirubin	BUN	Thể tiếp hợp
Nước muối		30	76	0,2	40	
440762	0,60	32	70	0,1	35	không
	2	26	57	0,1	35	
	6	31	48	0,1	39	
651900	0,2	32	115	0,2	39	**$GalNAc_3$-1 (3')**
	0,6	33	61	0,1	35	
	2	30	50	0,1	37	
	6	34	52	0,1	36	
663748	0,2	28	56	0,2	36	**$GalNac_4$-11 (3')**
	0,6	34	60	0,1	35	
	2	44	62	0,1	36	
	6	38	71	0,1	33	

Ví dụ 59: Các tác dụng của $GalNAc_3$-1 các ASO tiếp hợp hướng đích FXI *in vivo*

Các oligonucleotit được nêu dưới đây được thử trong nghiên cứu đa liều lượng đối với gen đối nghĩa trong việc ức chế FXI ở chuột nhắt. ISIS 404071 được chứa ở dạng

chất chuẩn chưa tiếp hợp. Mỗi các nhóm tiếp hợp được gắn vào ở đầu tận cùng 3' của oligonucleotit tương ứng bằng phosphođieste được liên kết gốc phân cắt được 2'-đeoxyađenosin nucleosit.

Bảng 36

Các ASO cải biến hướng đích FXI

ASO	Trình tự (5' đến 3')	Các liên kết	SEQ ID No.
ISIS 404071	$T_{es}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}A_{es}G_{es}G_{e}$	PS	31
ISIS 656172	$T_{es}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}A_{es}G_{es}G_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_{3}$-**1**$_{a}$	PS	32
ISIS 656173	$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_{3}$-**1**$_{a}$	PO/PS	32

Các chữ cái viết hoa biểu thị nucleobazơ đối với mỗi nucleosit và ^{m}C biểu thị 5-metyl xytosin. Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE; "d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa nucleosit (PS); "o" biểu thị liên kết giữa nucleosit phosphođieste (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. các nhóm tiếp hợp được in đậm.

Cấu trúc của GalNAc$_{3}$-**1**$_{a}$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 9.

Điều trị

Các con chuột đực Balb/c sáu tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được tiêm dưới da hai lần một tuần trong 3 tuần với liều lượng được thể hiện dưới đây bằng ISIS 404071, 656172, 656173 hoặc với đối chứng đã được xử lý bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng để xác định gan các lượng ARN thông tin của FXI bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Lượng protein của FXI huyết tương cũng được đo bằng cách sử dụng ELISA. các lượng ARN thông tin của FXI được xác định so với toàn bộ ARN (bằng cách sử dụng RIBOGREEN®), trước khi chuẩn tắc hóa với đối chứng đã được xử lý bằng PBS. Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của các lượng

ARN thông tin của FXI cho mỗi nhóm thử nghiệm. Dữ liệu được chuẩn tắc hóa theo đối chứng đã được xử lý bằng PBS và được biểu thị là "% PBS". ED_{50}s được đo bằng cách áp dụng các phương pháp tương tự như đã được bộc lộ trên đây và được đưa ra dưới đây.

Bảng 37

ARN thông tin của nhân tố XI (% Nước muối)

ASO	Liều lượng mg/kg	% điều khiển	Thể tiếp hợp	Các liên kết
Nước muối		100	không	
ISIS 404071	3	92	không	PS
	10	40		
	30	15		
ISIS 656172	0,7	74	**$GalNAc_3$-1**	PS
	2	33		
	6	9		
ISIS 656173	0,7	49	**$GalNAc_3$-1**	PO/PS
	2	22		
	6	1		

Như được thể hiện trong Bảng 37, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm các lượng ARN thông tin của FXI theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng. Các oligonucleotit chứa 3'-$GalNAc_3$-**1** nhóm tiếp hợp thể gần như nâng cao về hiệu nghiệm so với đối nghĩa không thể tiếp hợp của oligonucleotit (ISIS 404071). Sự nâng cao về hiệu nghiệm giữa hai oligonucleotit đã tiếp hợp còn được tạo ra bằng cách thay thế một vài trong số các liên kết PS bằng PO (ISIS 656173).

Như được thể hiện trong Bảng 37a, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng protein của FXI theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng. Các oligonucleotit chứa 3'-$GalNAc_3$-**1** nhóm tiếp hợp thể gần như nâng cao về hiệu nghiệm so với đối nghĩa không thể tiếp hợp của oligonucleotit (ISIS 404071Mức gia tăng hiệu lực

giữa hai oligonucleotit đã tiếp hợp còn được tạo ra bằng cách thay thế một vài trong số các liên kết PS bằng PO (ISIS 656173).

Bảng 37a

Protein của nhân tố XI (% Nước muối)

ASO	Liều lượng mg/kg	Protein (% điều khiển)	Thể tiếp hợp	Các liên kết
Nước muối		100	không	
ISIS 404071	3	127	không	PS
	10	32		
	30	3		
ISIS 656172	0,7	70	**GalNAc$_3$-1**	PS
	2	23		
	6	1		
ISIS 656173	0,7	45	**GalNAc$_3$-1**	PO/PS
	2	6		
	6	0		

Các mức traxaminaza của gan, alanin aminotransferaza (ALT) và aspartat aminotransferaza (AST), trong huyết thanh được đo so với nước muối được tiêm vào chuột nhắt bằng cách sử dụng các cách thức chuẩn. Tổng bilirubin, tổng albumin, CRE và BUN sẽ được đánh giá. Thay đổi về thể trọng được đánh giá không có khác biệt đáng kể so với nhóm nước muối. Các ALT, AST, tổng bilirubin và giá trị BUN được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 38

ISIS số	Liều lượng mg/kg	ALT	AST	Tổng albumin	Tổng bilirubin	CRE	BUN	Thể tiếp hợp
Nước muối		71,8	84,0	3,1	0,2	0,2	22,9	
404071	3	152,8	176,0	3,1	0,3	0,2	23,0	không

	10	73,3	121,5	3,0	0,2	0,2	21,4	
	30	82,5	92,3	3,0	0,2	0,2	23,0	
656172	0,7	62,5	111,5	3,1	0,2	0,2	23,8	**GalNAc$_3$-1 (3')**
	2	33,0	51,8	2,9	0,2	0,2	22,0	
	6	65,0	71,5	3,2	0,2	0,2	23,9	
656173	0,7	54,8	90,5	3,0	0,2	0,2	24,9	**GalNAc$_3$-1 (3')**
	2	85,8	71,5	3,2	0,2	0,2	21,0	
	6	114,0	101,8	3,3	0,2	0,2	22,7	

Ví dụ 60: Các tác dụng củacác ASO tiếp hợp Hướng đích SRB-1 *in vitro*

Các oligonucleotit được nêu dưới đây được thử với nhiều nghiên cứu về liều lượng đối với việc ức chế đối nghĩa của SRB-1 trong các tế bào gan ban đầu của chuột. ISIS 353382 bao gồm chuẩn đã tiếp hợp. Mỗi nhóm tiếp hợp được gắn đầu tận cùng 3' hoặc 5' của oligonucleotit tương ứng bằng phosphođieste được liên kết gốc phân cắt được 2'-đeoxyađenosin nucleosit.

Bảng 39

ASO cải biến hướng đích SRB-1

ASO	Trình tự (5' đến 3')	Kiểu	Thể tiếp hợp	SEQ ID No.
ISIS 353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	không	28
ISIS 655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_3$-**1$_a$**	5/10/5	**GalNAc$_3$-1**	29
ISIS 655862	$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_3$-**1$_a$**	5/10/5	**GalNAc$_3$-1**	29
ISIS 661161	GalNAc$_3$-**3$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-3**	30
ISIS 665001	GalNAc$_3$-**8$_{a-o'}$A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-8**	30
ISIS	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-9**	29

664078	$^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_3$-**9$_a$**			
ISIS 666961	GalNAc$_3$-**6$_{a-o}$**-**A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-6**	30
ISIS 664507	GalNAc$_3$-**2$_{a-o}$**-**A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-2**	30
ISIS 666881	GalNAc$_3$-**10$_{a-o}$**-**A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-10**	30
ISIS 666224	GalNAc$_3$-**5$_{a-o}$**-**A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-5**	30
ISIS 666981	GalNAc$_3$-**7$_{a-o}$**-**A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	5/10/5	**GalNAc$_3$-7**	30

Các chữ cái viết hoa biểu thị nucleobazơ đối với mỗi nucleosit và ^{m}C biểu thị 5-metyl xytosin. Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE;"d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa nucleosit (PS); "o" biểu thị liên kết giữa nucleosit phosphođieste (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. các nhóm tiếp hợp được in đậm.

Cấu trúc của GalNAc$_3$-**1$_a$** được thể hiện trên đây trong Ví dụ 9. Cấu trúc của GalNAc$_3$-3a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 39. Cấu trúc của GalNAc$_3$-8a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 47. Cấu trúc của GalNAc$_3$-9a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 52. Cấu trúc của GalNAc$_3$-6a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 51. Cấu trúc của GalNAc$_3$-2a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 37. Cấu trúc của GalNAc$_3$-10a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 46. Cấu trúc của GalNAc$_3$-5a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 49. Cấu trúc của GalNAc$_3$-7a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 48.

Điều trị bệnh

Các oligonucleotit liệt kê trên đây được thử *in vitro* trong các tế bào của tế bào gan ban đầu của chuột được đặt ở mật độ 25.000 tế bào cho mỗi lỗ và xử lý bằng 0,03, 0,08, 0,24, 0,74, 2,22, 6,67 hoặc 20nM oligonucleotit cải biến. Sau giai đoạn điều trị trong khoảng 16 giờ, ARN phân lập được từ các tế bào và các lượng ARN thông tin được đo bằng số lượng PCR thời gian thực và lượng ARN thông tin của SRB-1 được điều chỉnh theo toàn bộ hàm lượng ARN, như đo được nhờ RIBOGREEN®.

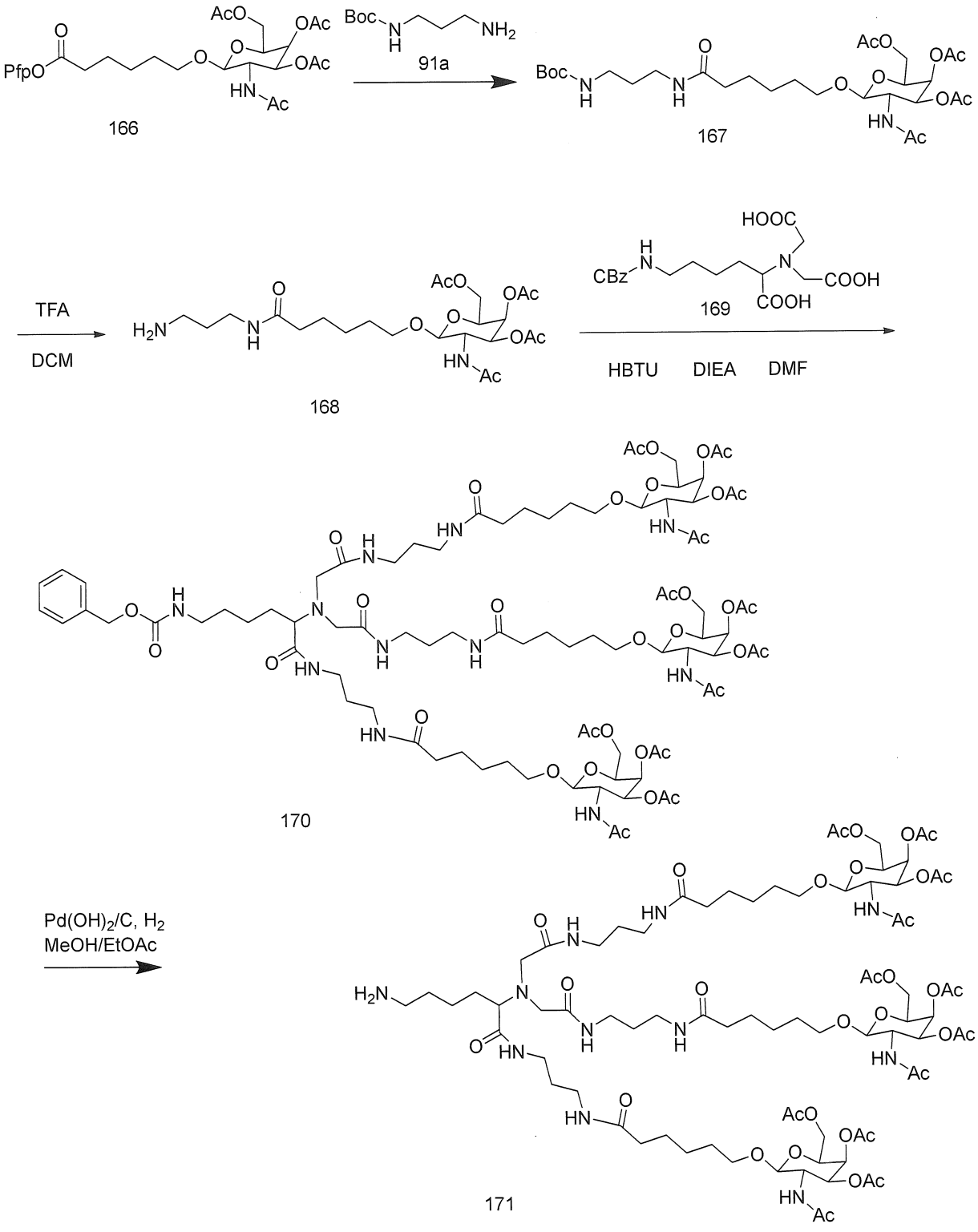
IC_{50} được tính bằng cách áp dụng các phương pháp chuẩn và các kết quả được thể hiện trong Bảng 40. Các kết quả thể hiện rằng, trong các điều kiện hấp thu tự do trong đó không có các chất phản ứng hoặc xung điện các kỹ thuật được sử dụng để đẩy mạnh một cách không tự nhiên toàn bộ các oligonucleotit bên trong các tế bào, các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc có hiệu lực trong các tế bào gan lớn hơn đáng kể so với oligonucleotit gốc (ISIS 353382) mà không bao gồm thể tiếp hợp GalNAc.

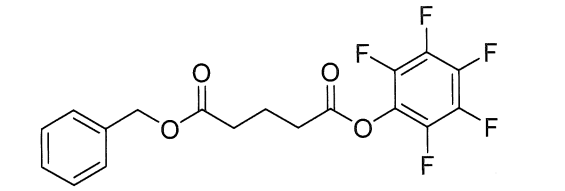
Bảng 40

ASO	IC_{50} (nM)	Các liên kết giữa nucleosit	Thể tiếp hợp	SEQ ID No.
ISIS 353382	190[a]	PS	không	28
ISIS 655861	11[a]	PS	**$GalNAc_3$-1**	29
ISIS 655862	3	PO/PS	**$GalNAc_3$-1**	29
ISIS 661161	15[a]	PS	**$GalNAc_3$-3**	30
ISIS 665001	20	PS	**$GalNAc_3$-8**	30
ISIS 664078	55	PS	**$GalNAc_3$-9**	29
ISIS 666961	22[a]	PS	**$GalNAc_3$-6**	30
ISIS 664507	30	PS	**$GalNAc_3$-2**	30
ISIS 666881	30	PS	**$GalNAc_3$-10**	30
ISIS 666224	30[a]	PS	**$GalNAc_3$-5**	30
ISIS 666981	40	PS	**$GalNAc_3$-7**	30

[a]Trung bình của nhiều loại.

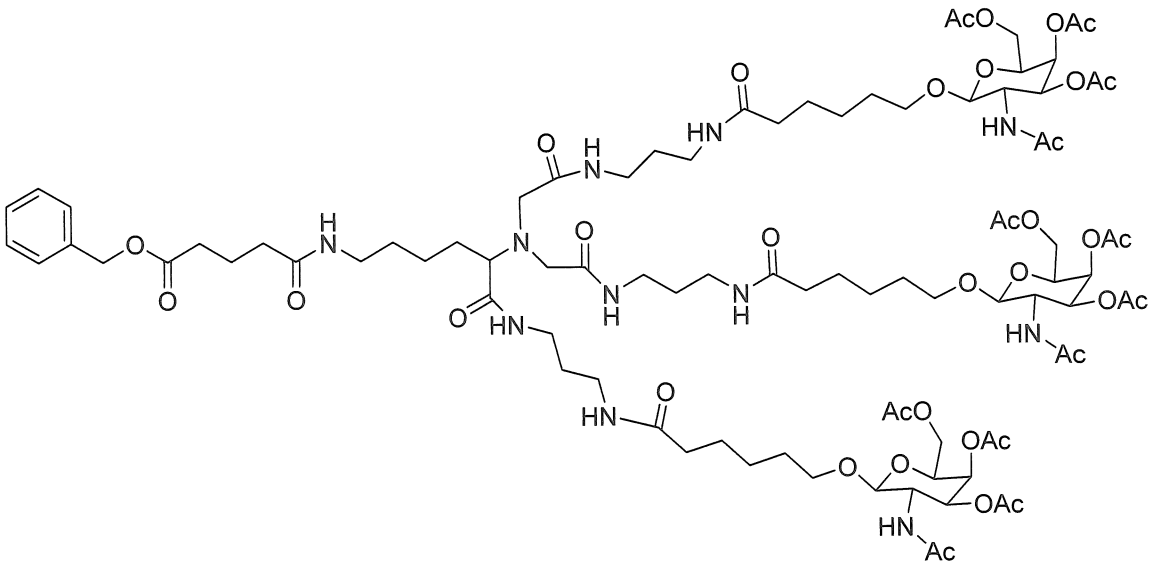
Ví dụ 61: Điều chế hợp chất oligome có công thức 175 chứa $GalNAc_3$-12


166
91a
167
TFA
DCM
168
169
HBTU
DIEA
DMF
170
Pd(OH)2/C, H2
MeOH/EtOAc
171

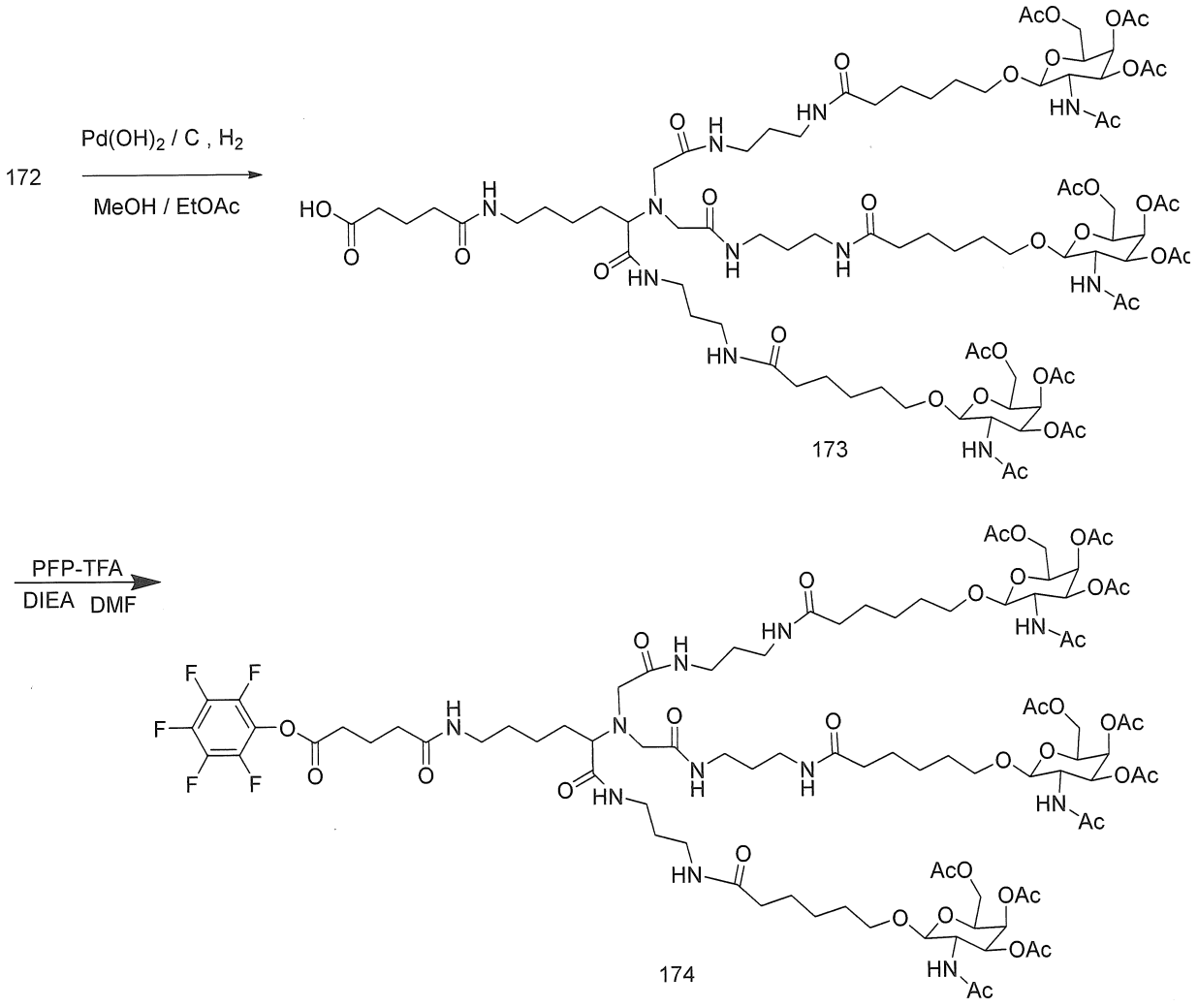


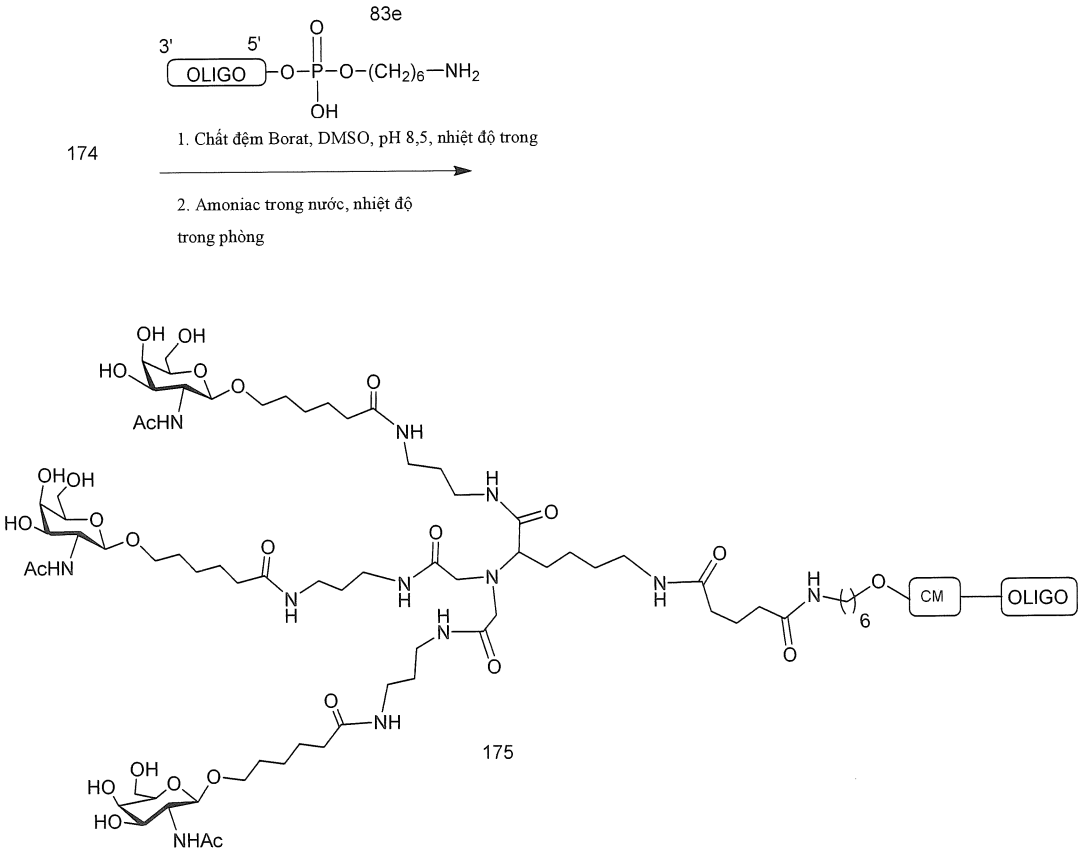
Benzyl (perflorophenyl) glutarat

DMF

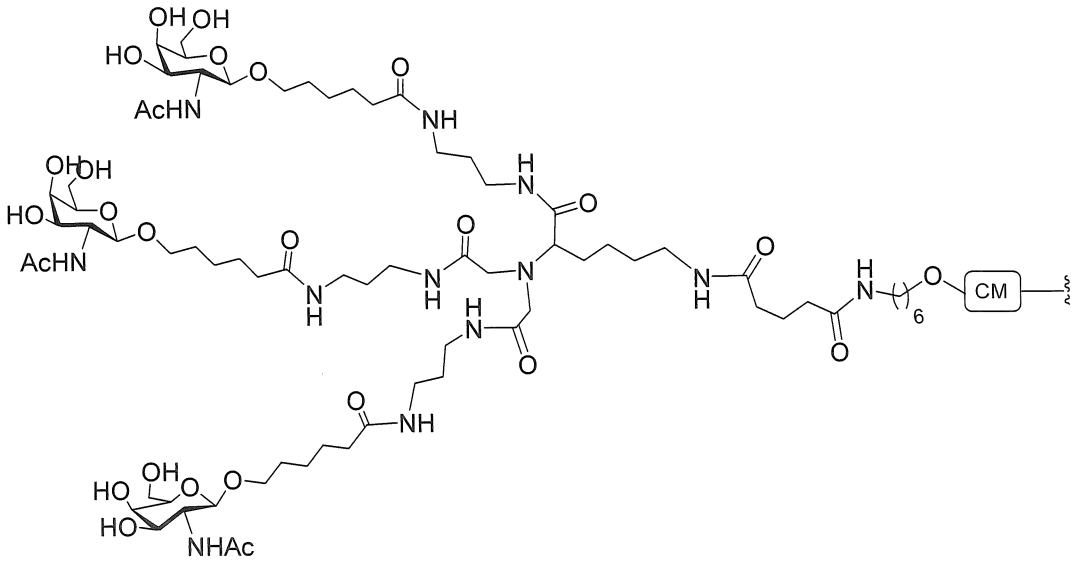


172

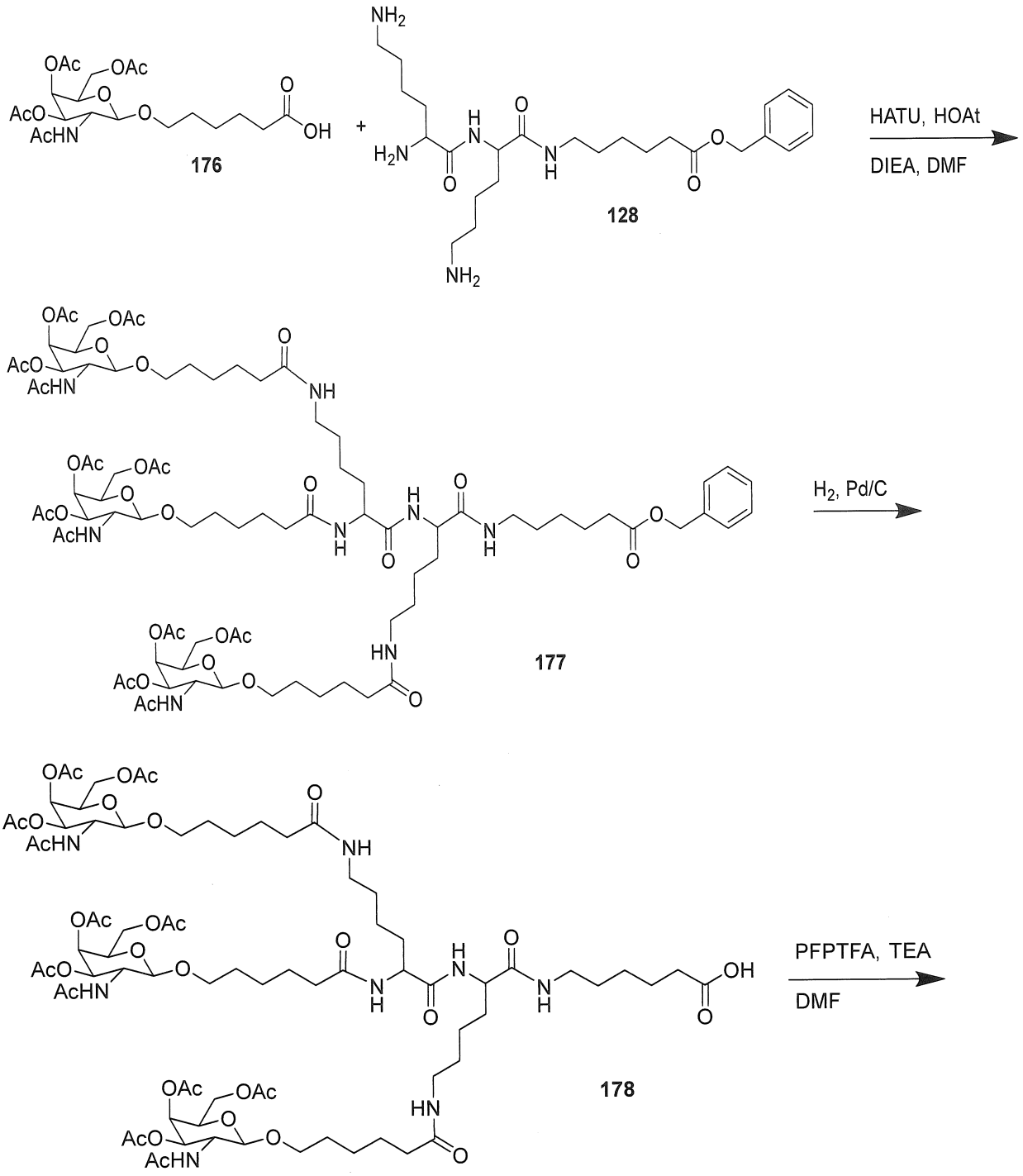

Pd(OH)2 / C , H2
MeOH / EtOAc
172
173
PFP-TFA
DIEA DMF
174

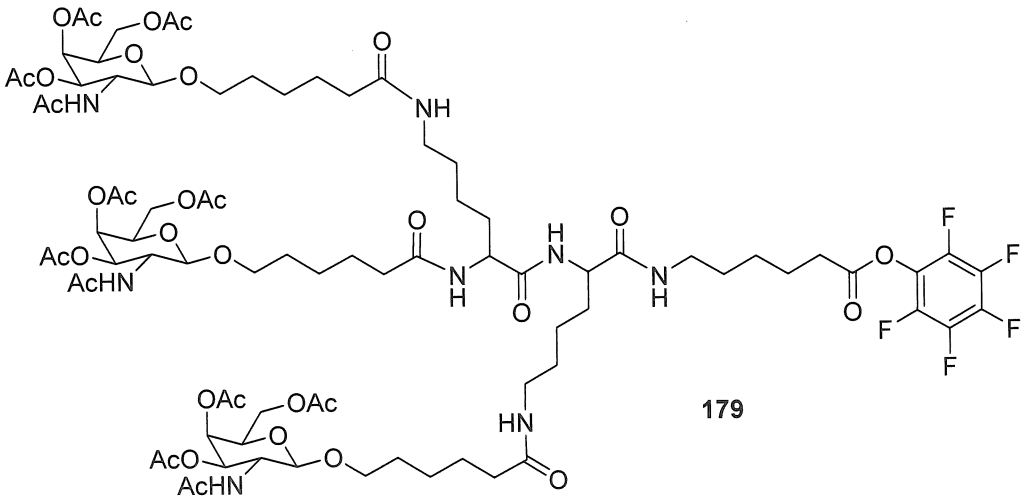


Hợp chất có công thức 169 có bán trên thị trường. Hợp chất có công thức 172 được điều chế bằng cách bổ sung benzyl (perflorophenyl) glutarat thành hợp chất có công thức 171. Benzyl (perflorophenyl) glutarat được điều chế bằng cách bổ sung PFP-TFA và DIEA thành axit 5-(benzyloxy)-5-oxopentanoic trong DMF. Hợp chất oligome có công thức 175, chứa nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-12, điều chế từ hợp chất có công thức 174 bằng cách áp dụng các quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 46. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-12 ($GalNAc_3$-12_a) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Cấu trúc của $GalNAc_3$-12 ($GalNAc_3$-12_a-CM-) được thể hiện dưới đây:

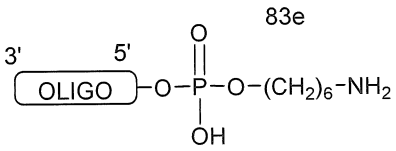

OH
OH
HO
O
O
AcHN
O
NH
H
N
O
OH
OH
HO
O
O
AcHN
O
N
H
O
N
H
N
O
N
H
O
H
N
6
O
CM
H
N
O
O
NH
OH
HO
O
O
HO
NHAc

Ví dụ 62: Điều chế hợp chất oligome có công thức 180 chứa $GalNAc_3$-13





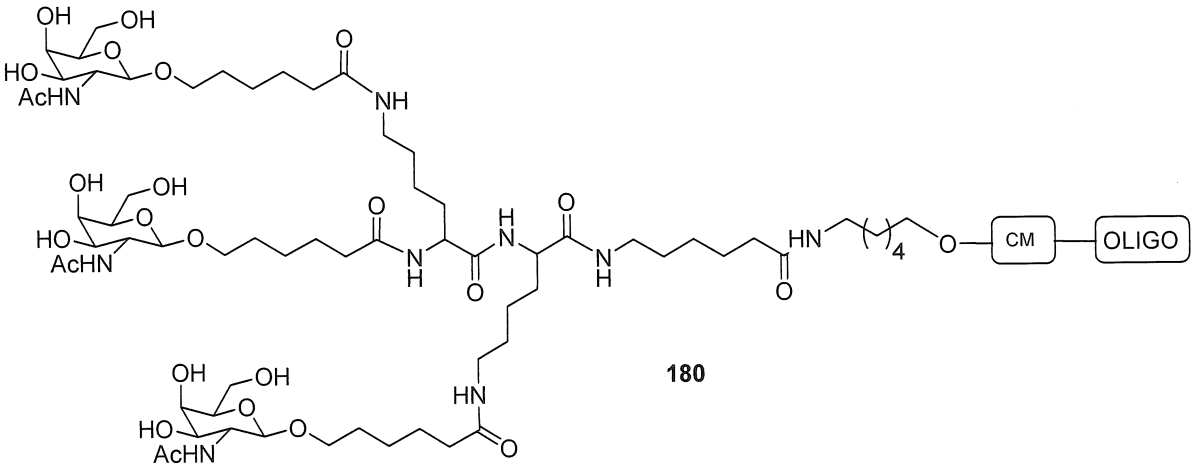
179



83e

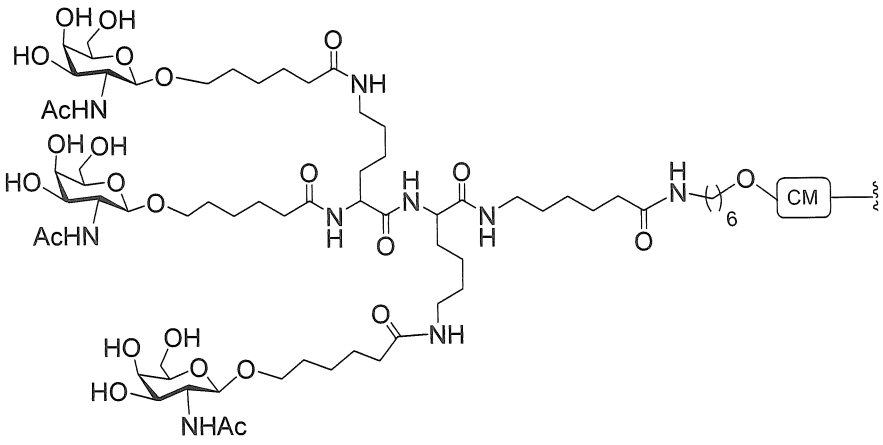
1. Chất đệm Borat, DMSO, pH 8,5, nhiệt độ trong phòng

2. Amoniac trong nước, nhiệt độ trong phòng

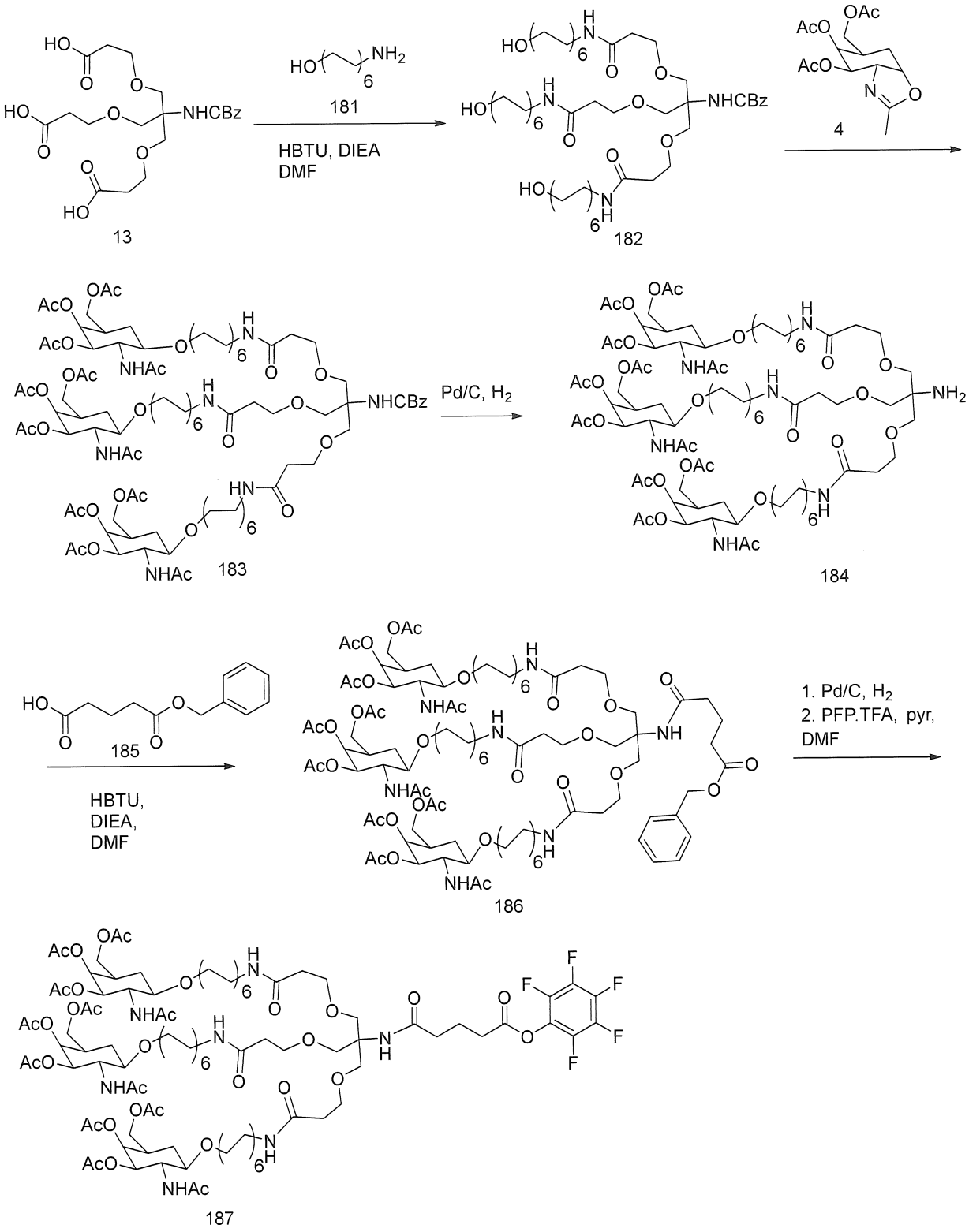


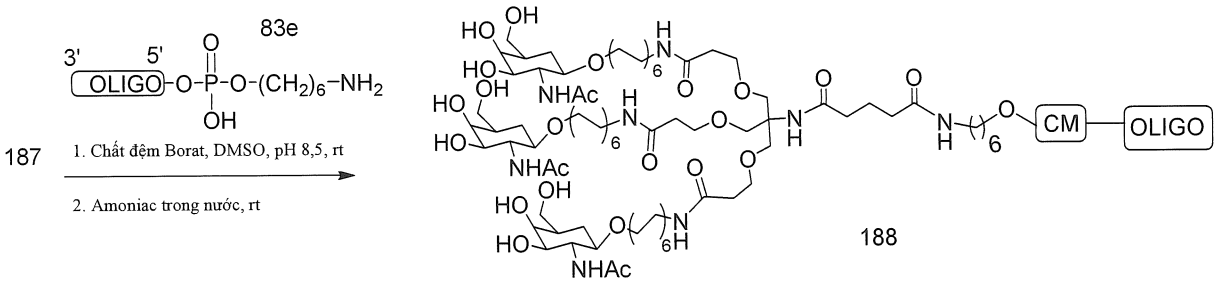
180

Hợp chất có công thức 176 được điều chế bằng cách áp dụng quy trình chung thể hiện trong Ví dụ 2. Hợp chất oligome có công thức 180, chứa nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-13, điều chế từ hợp chất có công thức 177 bằng cách áp dụng các quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 49. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-13 ($GalNAc_3$-13_a) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Cấu trúc của $GalNAc_3$-13 ($GalNAc_3$-13_a-CM-) được thể hiện dưới đây:

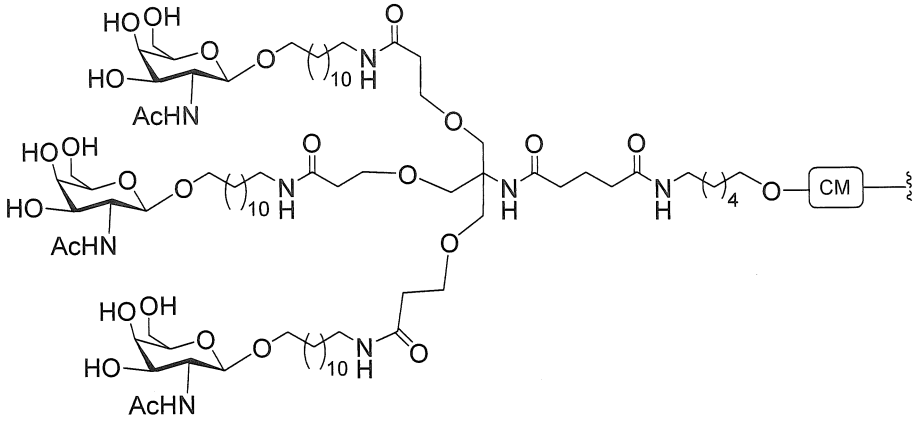


Ví dụ 63: Điều chế hợp chất oligome có công thức 188 chứa $GalNAc_3$-14

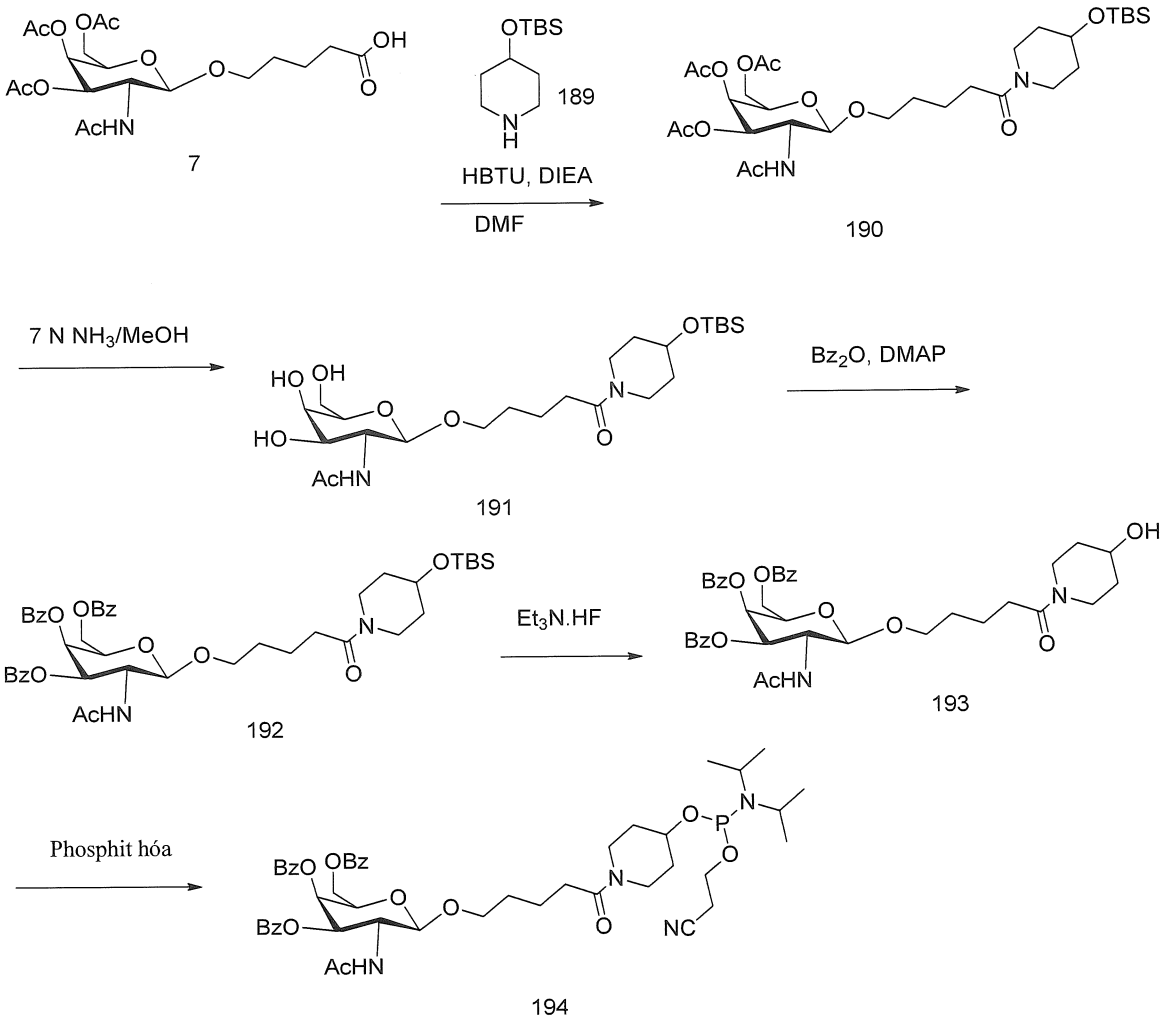


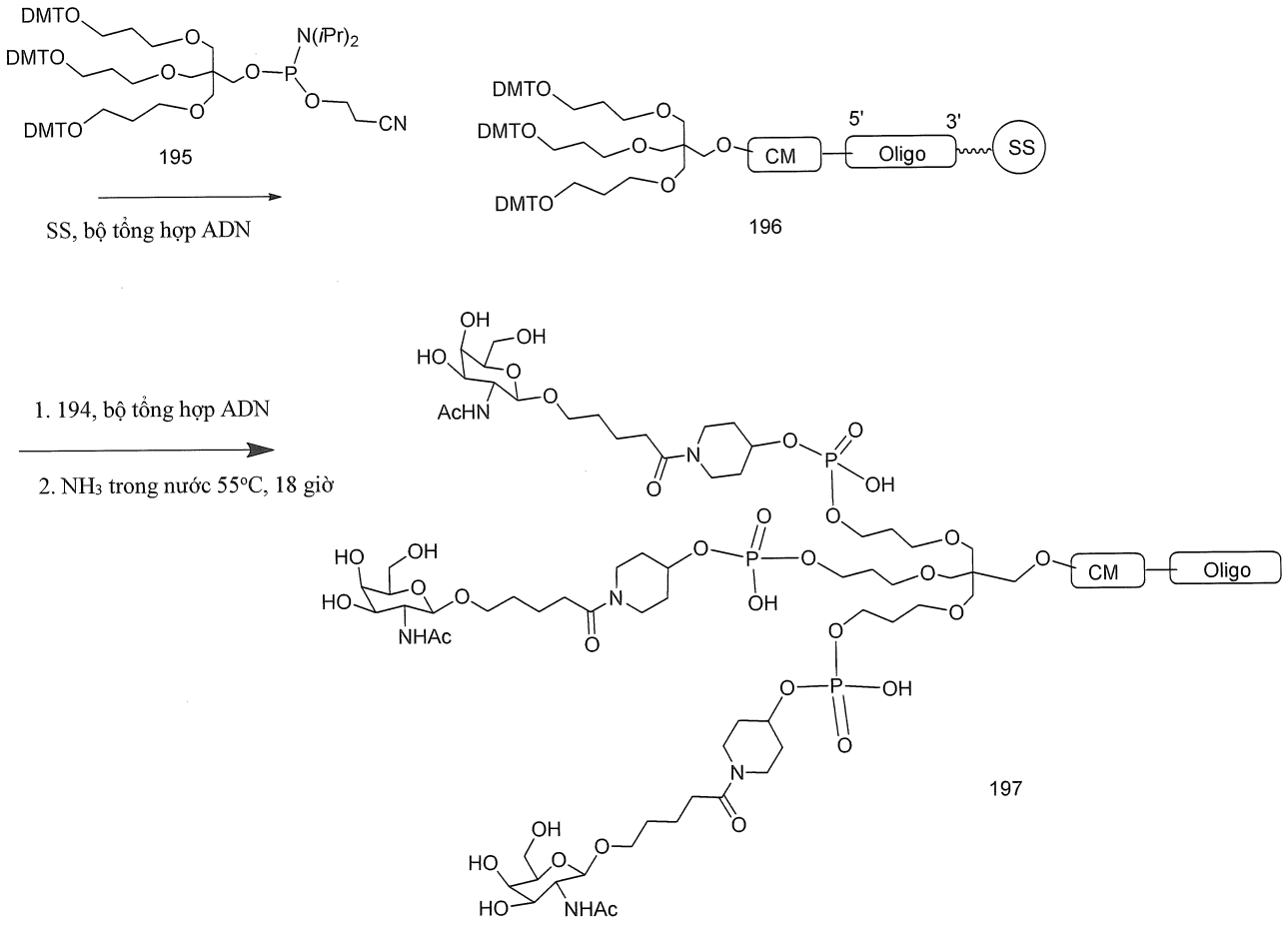


Các hợp chất có công thức 181 và 185 có thể mua được trên thị trường. Hợp chất oligome có công thức 188, chứa nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-14, điều chế từ hợp chất có công thức 187 bằng cách áp dụng các quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 46. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-14 (GalNAc$_3$-14$_a$) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-. Cấu trúc của GalNAc$_3$-14 (GalNAc$_3$-14$_a$-CM-) được thể hiện dưới đây:

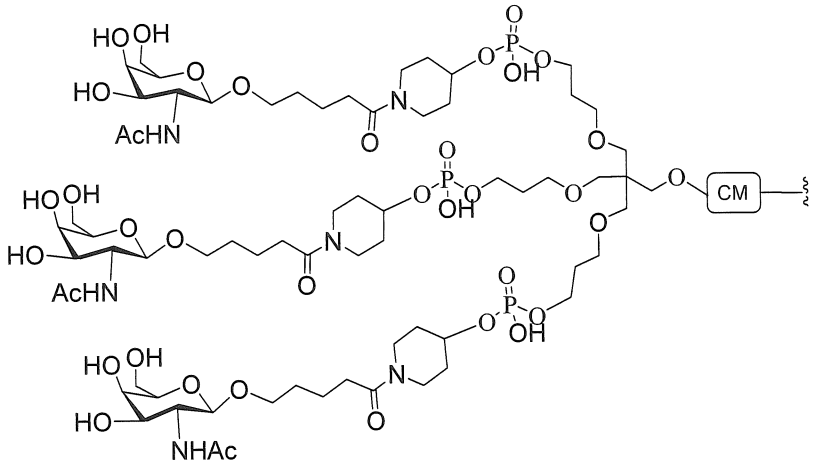


Ví dụ 64: Điều chế hợp chất oligome có công thức 197 chứa $GalNAc_3$-15





Hợp chất có công thức 189 có bán trên thị trường. Hợp chất có công thức 195 được điều chế bằng cách áp dụng quy trình chung thể hiện trong Ví dụ 31. Hợp chất oligome có công thức 197, chứa nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-15, điều chế từ các hợp chất có công thức 194 và 195 bằng cách sử dụng các quy trình tổng hợp oligonucleotit tiêu chuẩn. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-**15** (GalNAc$_3$-**15**$_a$) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-. Cấu trúc của GalNAc$_3$-**15** (GalNAc$_3$-**15**$_a$-CM-) được thể hiện dưới đây:



Ví dụ 65: Nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng của các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp ở đầu tận cùng 5' (so sánh GalNAc$_3$-3, 12, 13, 14, và 15) hướng đích SRB-1 *in vivo*

Các oligonucleotit được nêu dưới đây được thử trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng đối với việc ức chế đối nghĩa của SRB-1 ở chuột nhắt. ISIS 353382 không tiếp hợp được dùng làm chuẩn. Mỗi nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$ được gắn vào đầu tận cùng 5' của oligonucleotit tương ứng bằng phosphođieste được liên kết 2'-đeoxyađenosin nucleosit (gốc phân cắt được).

Bảng 41

Các ASO cải biến hướng đích SRB-1

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Thể tiếp hợp	SEQ ID No.
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	không	28
661161	GalNAc$_3$-**3$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-3	30
671144	GalNAc$_3$-12$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-12	30
670061	GalNAc$_3$-13$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-13	30

671261	GalNAc$_3$-**14**$_{a-o}$,**A**$_{do}$G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-**14**	30
671262	GalNAc$_3$-**15**$_{a-o}$,**A**$_{do}$G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-**15**	30

Các chữ cái viết hoa biểu thị nucleobazơ đối với mỗi nucleosit và ^{m}C biểu thị 5-metyl xytosin. Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE;"d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa nucleosit (PS); "o" biểu thị liên kết giữa nucleosit phosphođieste (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. các nhóm tiếp hợp được in đậm.

Cấu trúc của GalNAc$_3$-3$_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 39. Cấu trúc của GalNAc$_3$-12a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 61. Cấu trúc của GalNAc$_3$-13a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 62. Cấu trúc của GalNAc$_3$-14a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 63. Cấu trúc của GalNAc$_3$-15a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 64.

Điều trị

Chuột nhắt C$_5$7bl6 sáu đến tám tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được tiêm dưới da một lần hoặc hai lần với liều lượng được thể hiện dưới đây bằng ISIS 353382, 661161, 671144, 670061, 671261, 671262, hoặc bằng nước muối. chuột nhắt được cho dùng hai lần liều lượng tiếp nhận liều lượng thứ hai ba ngày sau liều lượng thứ nhất. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng để xác định lượng ARN thông tin của SRB-1 ở gan bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng ARN thông tin của SRB-1 cho mỗi nhóm thử nghiệm, theo nước muối đối chứng.

Như được thể hiện trong Bảng 42, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của SRB-1 theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng. Không có các khác biệt đáng kể về đích tối thiểu được quan sát giữa động vật mà tiếp nhận một liều và động vật mà tiếp nhận hai liều lượng (xem liều lượng ISIS 353382 30

và 2 x 15mg/kg; và liều lượng ISIS 661161 5 và 2 x 2,5mg/kg). Các oligonucleotit đối nghĩa chứa phosphođieste được liên kết các thể tiếp hợp thể $GalNAc_3$-3, 12, 13, 14, và 15 có hiệu lực về cơ bản tăng so với oligonucleotit đối nghĩa không tiếp hợp (ISIS 335382).

Bảng 42

ARN thông tin của SRB-1 (% Nước muối)

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ARN thông tin của SRB-1 (% Nước muối)	ED_{50} (mg/kg)	Thể tiếp hợp
Nước muối	n/a	100,0	n/a	n/a
353382	3	85,0	22,4	không
	10	69,2		
	30	34,2		
	2 x 15	36,0		
661161	0,5	87,4	2,2	$GalNAc_3$-3
	1,5	59,0		
	5	25,6		
	2 x 2,5	27,5		
	15	17,4		
671144	0,5	101,2	3,4	$GalNAc_3$-12
	1,5	76,1		
	5	32,0		
	15	17,6		
670061	0,5	94,8	2,1	$GalNAc_3$-13
	1,5	57,8		
	5	20,7		
	15	13,3		
671261	0,5	110,7	4,1	$GalNAc_3$-14
	1,5	81,9		
	5	39,8		
	15	14,1		
671262	0,5	109,4	9,8	$GalNAc_3$-15
	1,5	99,5		

	5	69,2		
	15	36,1		

Các mức traxaminaza của gan, alanin aminotransferaza (ALT) và aspartat aminotransferaza (AST), trong huyết thanh được đo so với nước muối được tiêm vào chuột nhắt bằng cách sử dụng các cách thức chuẩn. Tổng bilirubin và BUN sẽ được đánh giá. Các thay đổi về thể trọng được đánh giá mà không có khác biệt đáng kể so với nhóm nước muối (dữ liệu không được thể hiện). Các ALT, AST, tổng bilirubin và giá trị BUN được thể hiện trong Bảng 43 dưới đây.

Bảng 43

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Tổng bilirubin (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Thể tiếp hợp
Nước muối	n/a	28	60	0,1	39	n/a
353382	3	30	77	0,2	36	không
	10	25	78	0,2	36	
	30	28	62	0,2	35	
	2 x 15	22	59	0,2	33	
661161	0,5	39	72	0,2	34	$GalNAc_3$-3
	1,5	26	50	0,2	33	
	5	41	80	0,2	32	
	2 x 2,5	24	72	0,2	28	
	15	32	69	0,2	36	
671144	0,5	25	39	0,2	34	$GalNAc_3$-12
	1,5	26	55	0,2	28	
	5	48	82	0,2	34	
	15	23	46	0,2	32	
670061	0,5	27	53	0,2	33	$GalNAc_3$-13
	1,5	24	45	0,2	35	
	5	23	58	0,1	34	

	15	24	72	0,1	31	
671261	0,5	69	99	0,1	33	GalNAc$_3$-14
	1,5	34	62	0,1	33	
	5	43	73	0,1	32	
	15	32	53	0,2	30	
671262	0,5	24	51	0,2	29	GalNAc$_3$-15
	1,5	32	62	0,1	31	
	5	30	76	0,2	32	
	15	31	64	0,1	32	

Ví dụ 66: Tác động của các gốc phân cắt được khác nhau trên sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích SRB-1 chứa chùm 5'-GalNAc3

Các oligonucleotit được nêu dưới đây được thử trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng đối với việc ức chế đối nghĩa của SRB-1 ở chuột nhắt. Mỗi nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$ được gắn vào đầu tận cùng 5' của oligonucleotit tương ứng bằng phosphođieste được liên kết nucleosit (gốc phân cắt được (CM)).

Bảng 44

Các ASO cải biến hướng đích SRB-1

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm GalNAc$_3$	CM	SEQ ID No.
661161	GalNAc$_3$-**3$_{a-o}$,A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-3a	A$_d$	30
670699	GalNAc$_3$-**3$_{a-o}$,T$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-3a	T$_d$	33
670700	GalNAc$_3$-**3$_{a-o}$,A$_{eo}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-3a	A$_e$	30
670701	GalNAc$_3$-**3$_{a-o}$,T$_{eo}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-3a	T$_e$	33
671165	GalNAc$_3$-13$_{a-o}$,A$_{do}$G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{e}$	GalNAc$_3$-13a	A$_d$	30

Các chữ cái viết hoa biểu thị nucleobazơ đối với mỗi nucleosit và ^{m}C biểu thị 5-metyl xytosin. Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE;"d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa nucleosit (PS); "o" biểu thị liên kết giữa nucleosit phosphođieste (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. Các nhóm tiếp hợp được in đậm.

Cấu trúc của $GalNAc_3$-3_a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 39. Cấu trúc của $GalNAc_3$-13a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 62.

Điều trị bệnh

Chuột nhắt $C_5$7bl6 sáu đến tám tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được tiêm dưới da một lần với liều lượng được thể hiện dưới đây bằng ISIS 661161, 670699, 670700, 670701, 671165, hoặc bằng nước muối. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng để xác định lượng ARN thông tin của SRB-1 ở gan bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng ARN thông tin của SRB-1 cho mỗi nhóm thử nghiệm, theo nước muối đối chứng.

Như được thể hiện trong Bảng 45, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của SRB-1 theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng. Các oligonucleotit đối nghĩa chứa tất cả các gốc phân cắt được khác nhau thể hiện hiệu lực tương tự.

Bảng 45

ARN thông tin của SRB-1 (% Nước muối)

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ARN thông tin của SRB-1 (% Nước muối)	Cụm $GalNAc_3$	CM
Nước muối	n/a	100,0	n/a	n/a
661161	0,5	87,8	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	61,3		
	5	33,8		
	15	14,0		

670699	0,5	89,4	$GalNAc_3$-3a	T_d
	1,5	59,4		
	5	31,3		
	15	17,1		
670700	0,5	79,0	$GalNAc_3$-3a	A_e
	1,5	63,3		
	5	32,8		
	15	17,9		
670701	0,5	79,1	$GalNAc_3$-3a	T_e
	1,5	59,2		
	5	35,8		
	15	17,7		
671165	0,5	76,4	$GalNAc_3$-13a	A_d
	1,5	43,2		
	5	22,6		
	15	10,0		

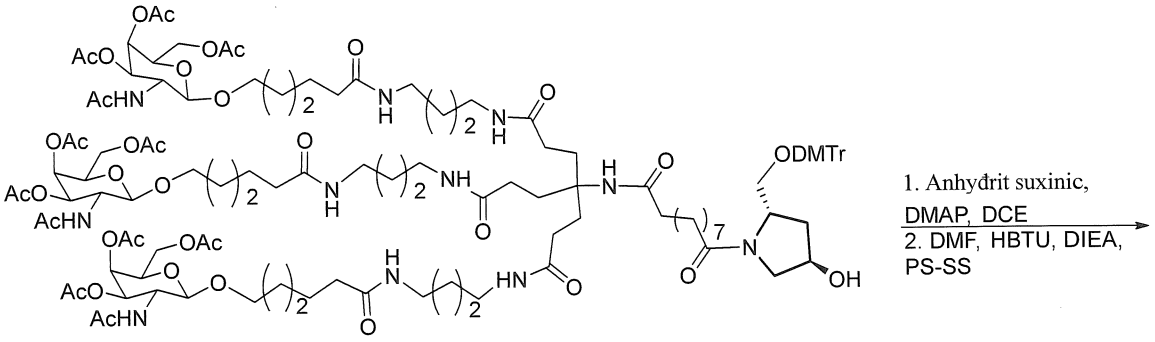
Các mức traxaminaza của gan, alanin aminotransferaza (ALT) và aspartat aminotransferaza (AST), trong huyết thanh được đo so với nước muối được tiêm vào chuột nhắt bằng cách sử dụng các cách thức chuẩn. Tổng bilirubin và BUN sẽ được đánh giá. Các thay đổi về thể trọngs được đánh giá mà không có khác biệt đáng kể so với nhóm nước muối (dữ liệu không được thể hiện). Các ALT, AST, tổng bilirubin và giá trị BUN được thể hiện trong Bảng 46 dưới đây.

Bảng 46

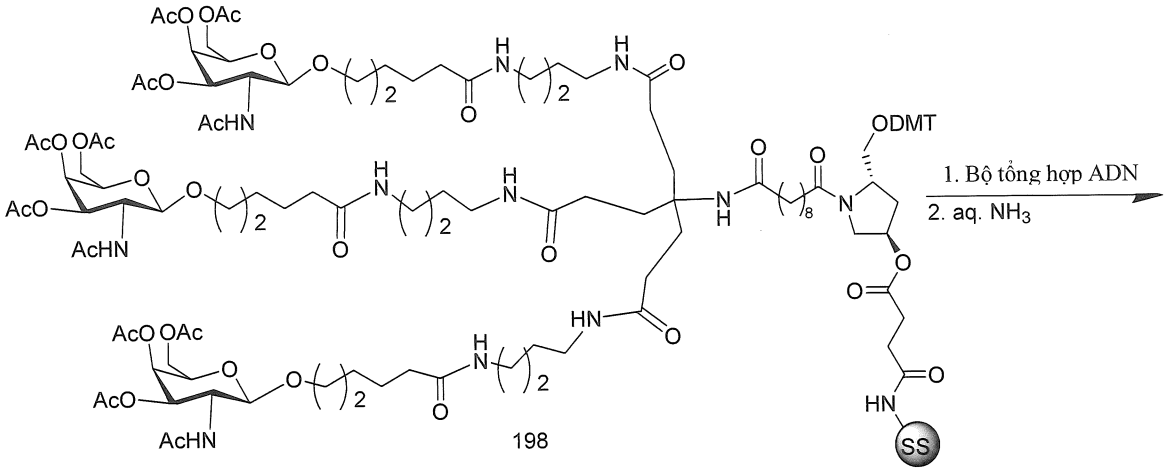
ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Tổng bilirubin (mg/dL)	BUN (mg/dL)	$GalNAc_3$ Chùm	CM
Nước muối	n/a	24	64	0,2	31	n/a	n/a
661161	0,5	25	64	0,2	31	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	24	50	0,2	32		

	5	26	55	0,2	28		
	15	27	52	0,2	31		
670699	0,5	42	83	0,2	31	$GalNAc_3$-3a	T_d
	1,5	33	58	0,2	32		
	5	26	70	0,2	29		
	15	25	67	0,2	29		
670700	0,5	40	74	0,2	27	$GalNAc_3$-3a	A_e
	1,5	23	62	0,2	27		
	5	24	49	0,2	29		
	15	25	87	0,1	25		
670701	0,5	30	77	0,2	27	$GalNAc_3$-3a	T_e
	1,5	22	55	0,2	30		
	5	81	101	0,2	25		
	15	31	82	0,2	24		
671165	0,5	44	84	0,2	26	$GalNAc_3$-13a	A_d
	1,5	47	71	0,1	24		
	5	33	91	0,2	26		
	15	33	56	0,2	29		

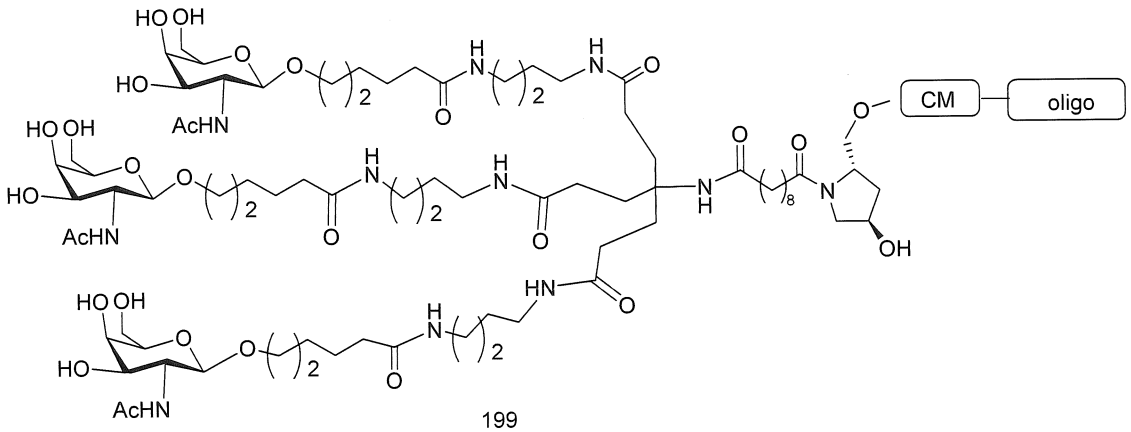
Ví dụ 67: Điều chế hợp chất oligome có công thức 199 chứa GalNAc$_3$-16



98d



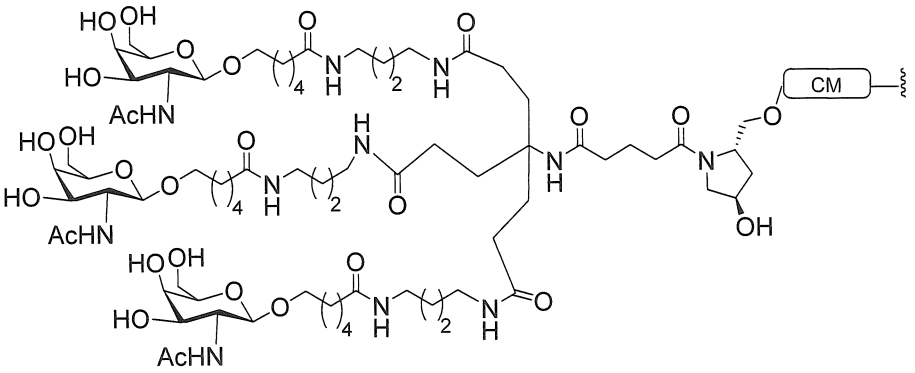
198



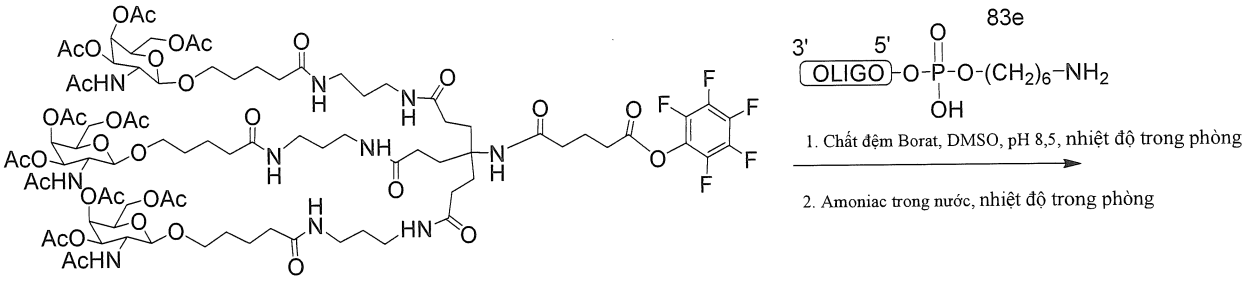
199

Hợp chất oligome có công thức 199, chứa nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-16, được điều chế bằng cách áp dụng các quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 7 và 9. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-**16** (GalNAc$_3$-**16**$_a$) có thể được kết hợp với một gốc

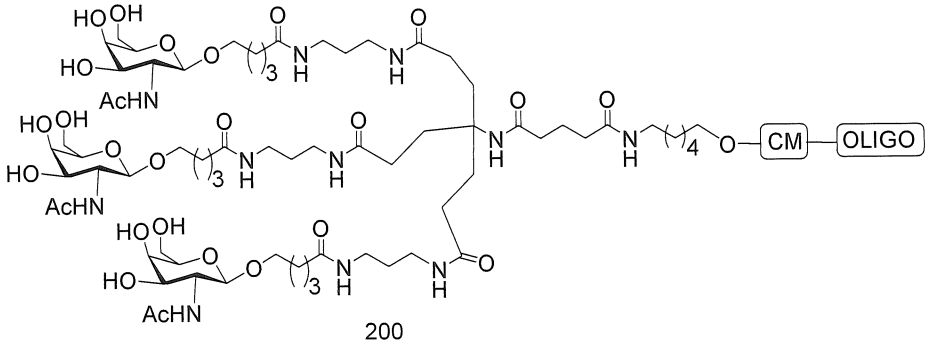
phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Cấu trúc của $GalNAc_3$-16 ($GalNAc_3$-16_a-CM-) được thể hiện dưới đây:



Ví dụ 68: Điều chế hợp chất oligome có công thức 200 chứa $GalNAc_3$-17

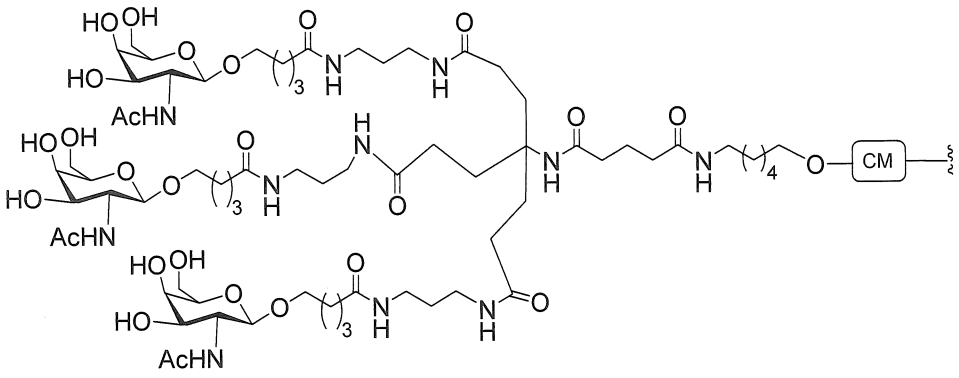


102a

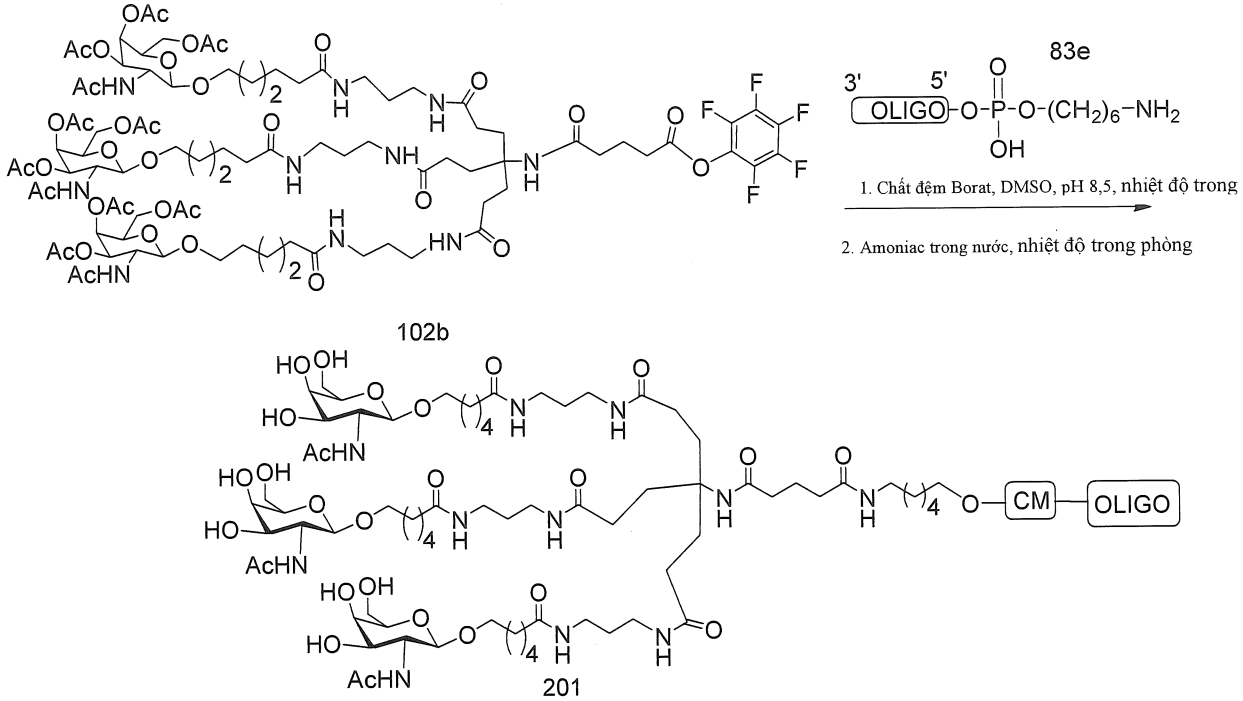


200

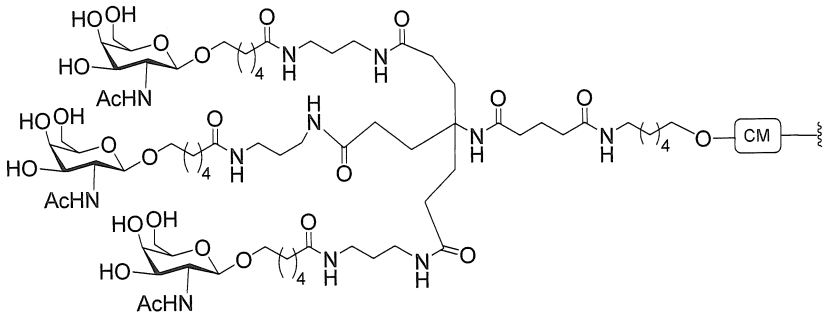
Hợp chất oligome có công thức 200, chứa nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-17, điều chế bằng cách áp dụng các quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 46. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-17 ($GalNAc_3$-17_a) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Cấu trúc của $GalNAc_3$-17 ($GalNAc_3$-17_a-CM-) được thể hiện dưới đây:



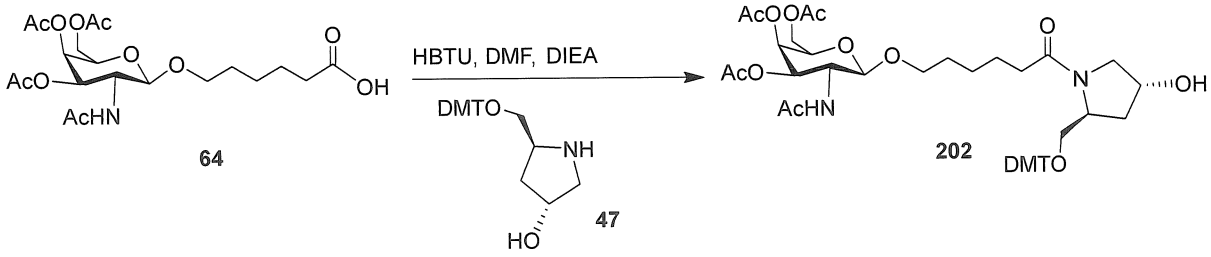
Ví dụ 69: Điều chế hợp chất oligome có công thức 201 chứa GalNAc$_3$-18

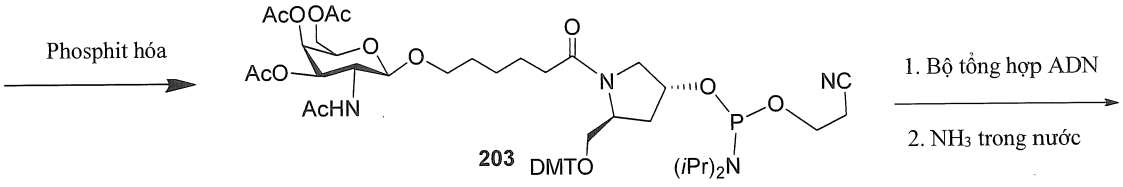


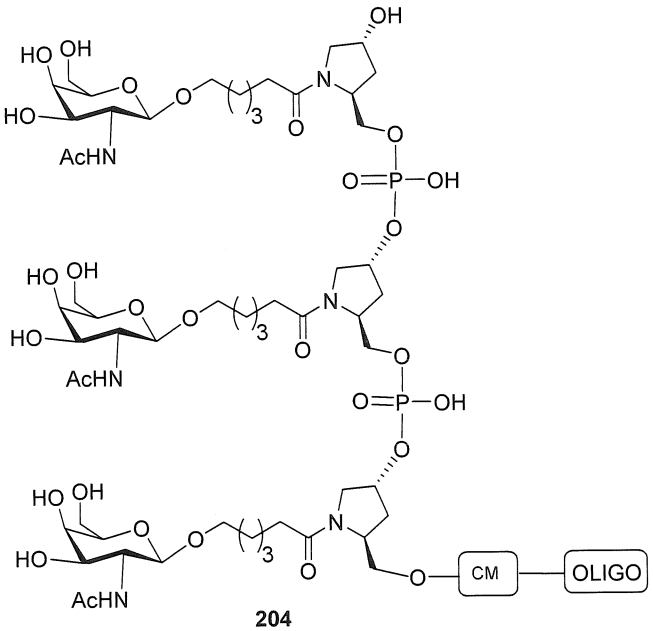
Hợp chất oligome có công thức 201, chứa nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-18, điều chế bằng cách áp dụng các quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 46. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-**18** (GalNAc$_3$-**18**$_a$) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-. Cấu trúc của GalNAc$_3$-**18** (GalNAc$_3$-**18**$_a$-CM-) được thể hiện dưới đây:



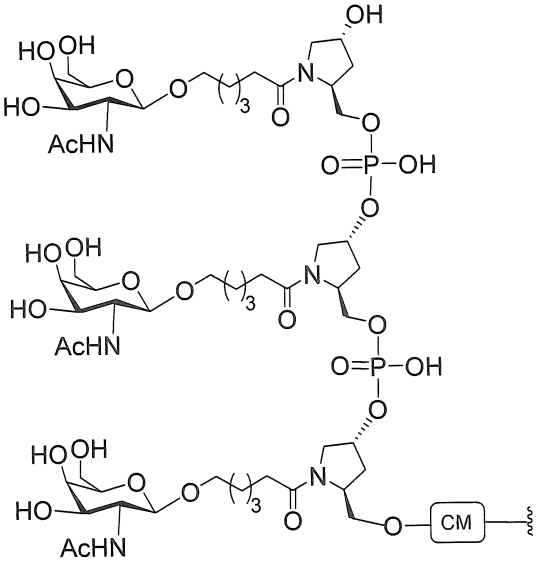
Ví dụ 70: Điều chế hợp chất oligome có công thức 204 chứa $GalNAc_3$-19



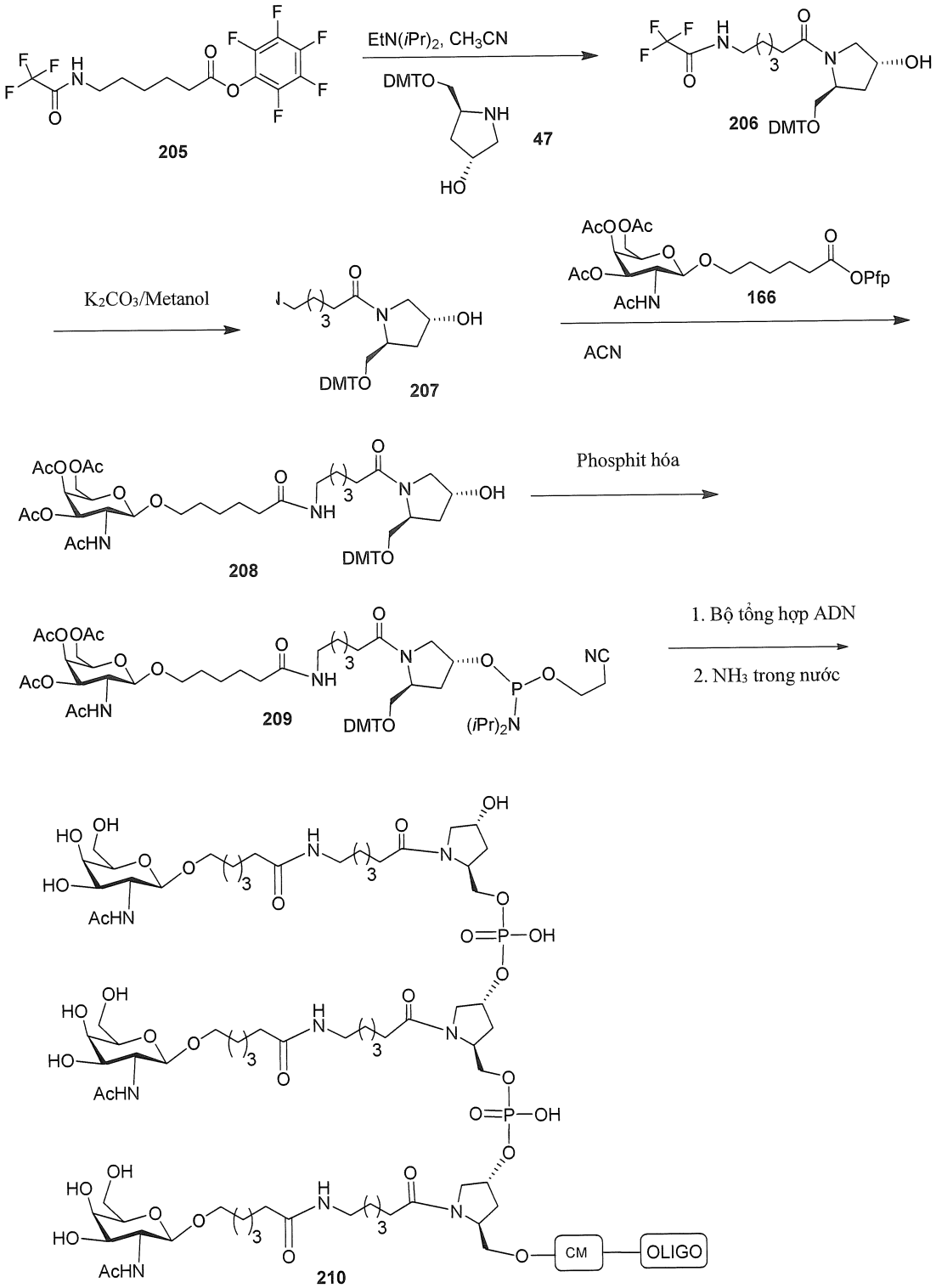




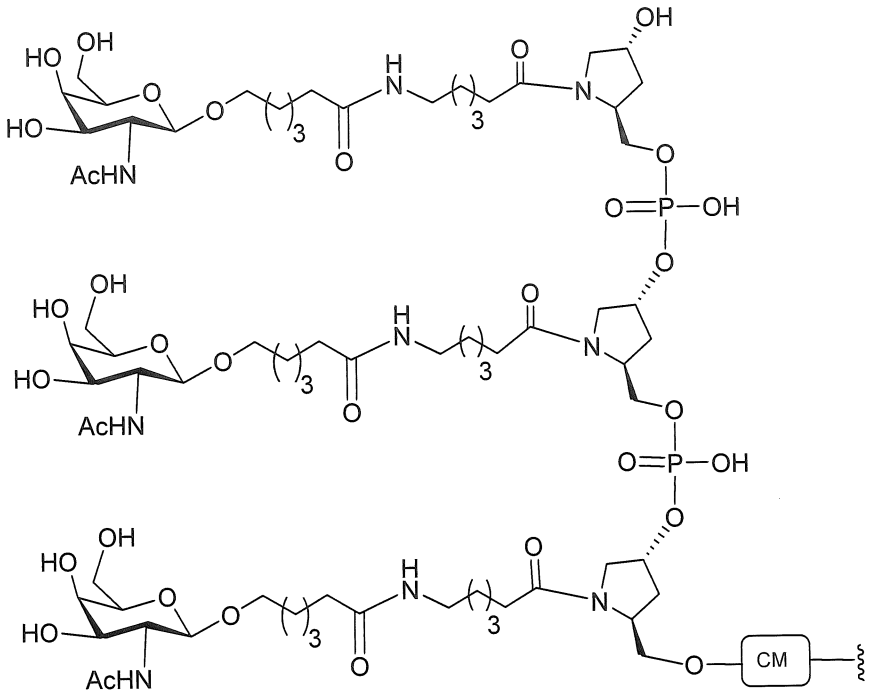
Hợp chất oligome có công thức 204, chứa nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-19, điều chế từ hợp chất 64 bằng cách áp dụng các quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 52. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-**19** (GalNAc$_3$-**19**$_a$) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-. Cấu trúc của GalNAc$_3$-**19** (GalNAc$_3$-**19**$_a$-CM-) được thể hiện dưới đây:



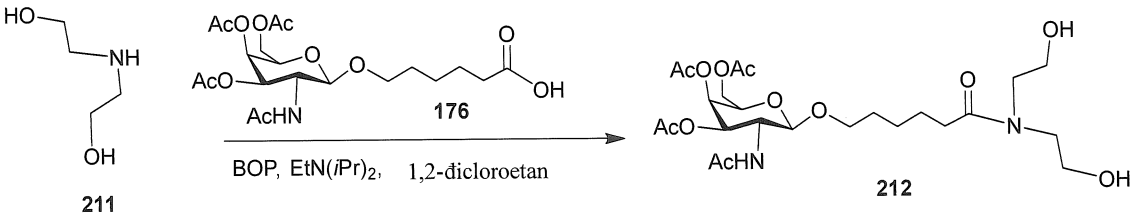
Ví dụ 71: Điều chế hợp chất oligome có công thức 210 chứa GalNAc$_3$-20

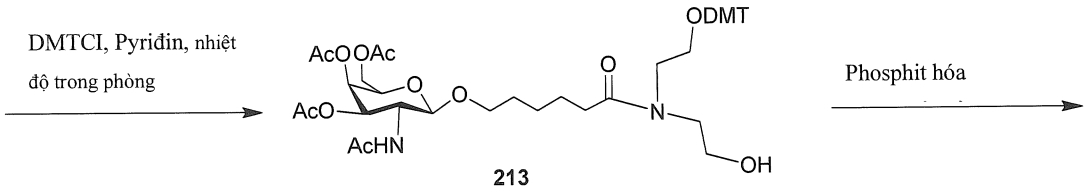


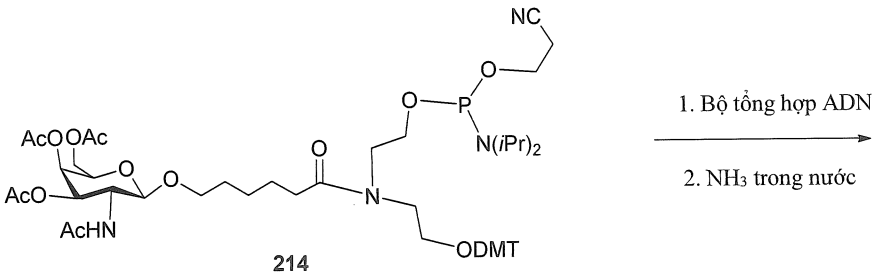
Hợp chất có công thức 205 được điều chế bằng cách bổ sung PFP-TFA và DIEA vào axit 6-(2,2,2-trifloaxetamiđo)hexanoic trong axetonitril, mà được điều chế bằng cách bổ sung triflic anhyđrit vào axit 6-aminohexanoic. Hỗn hợp phản ứng này được tăng nhiệt độ đến 80°C, sau đó được giảm nhiệt độ đến nhiệt độ trong phòng. Hợp chất oligome có công thức 210, chứa nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-20, điều chế từ hợp chất có công thức 208 bằng cách áp dụng các quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 52. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-20 (GalNAc$_3$-20$_a$) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-. Cấu trúc của GalNAc$_3$-20 (GalNAc$_3$-20$_a$-CM-) được thể hiện dưới đây:

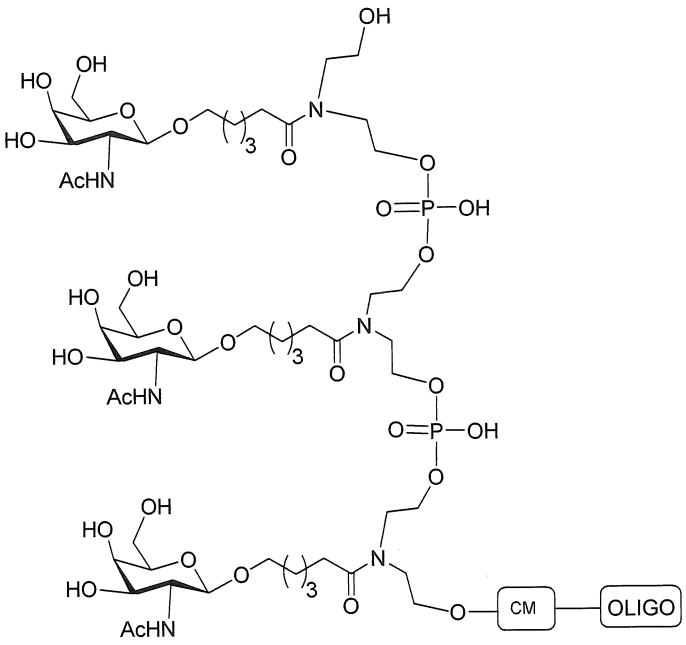


Ví dụ 72: Điều chế hợp chất oligome có công thức 215 chứa $GalNAc_3$-21

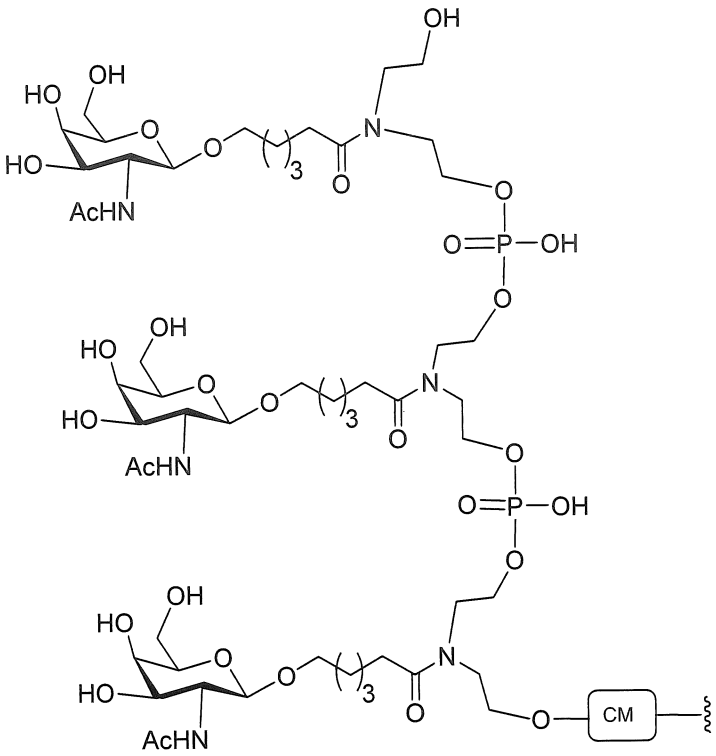




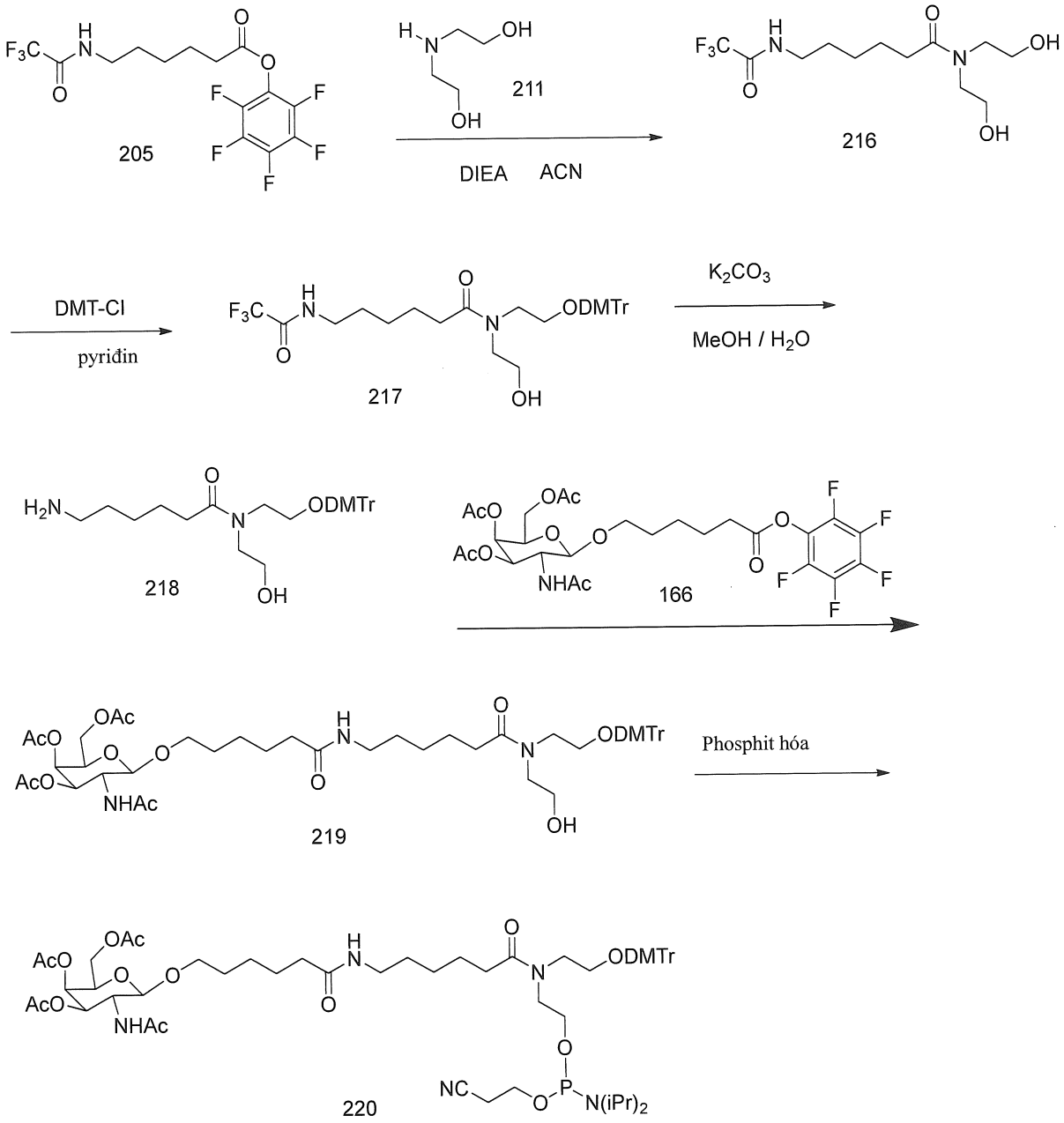


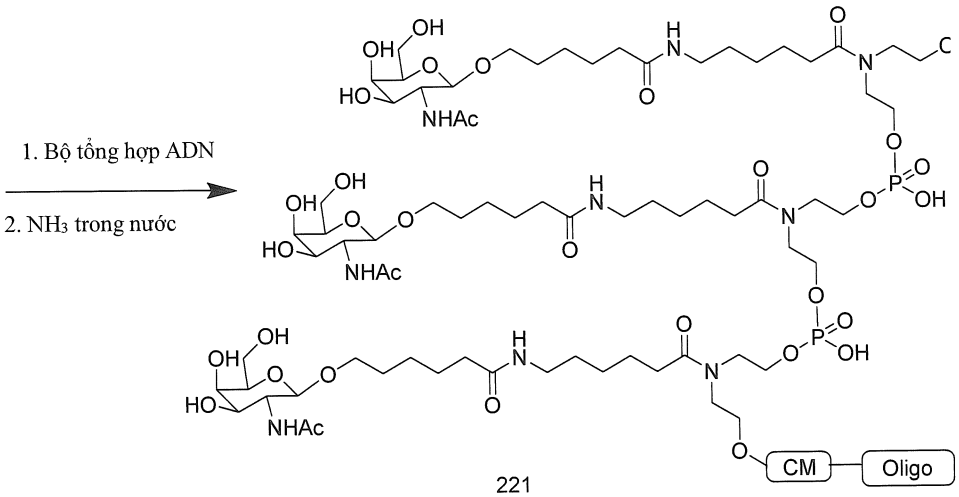


Hợp chất có công thức 211 có bán trên thị trường. Hợp chất oligome có công thức 215, chứa nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-21, điều chế từ hợp chất có công thức 213 bằng cách áp dụng các quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 52. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$-21 (GalNAc$_3$-21$_a$) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A$_d$-P(=O)(OH)-. Cấu trúc của GalNAc$_3$-21 (GalNAc$_3$-21$_a$-CM-) được thể hiện dưới đây:



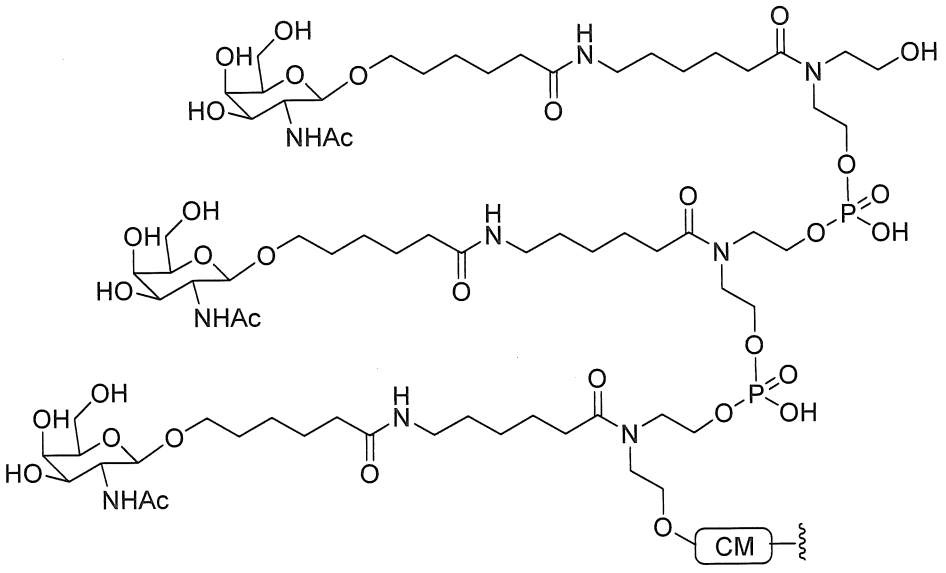
Ví dụ 73: Điều chế hợp chất oligome có công thức 221 chứa GalNAc3-22





221

Hợp chất có công thức 220 được điều chế từ hợp chất có công thức 219 bằng cách sử dụng điisopropylamoni tetrazolid. Hợp chất oligome có công thức 221, chứa nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-21, điều chế từ hợp chất có công thức 220 bằng cách áp dụng quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 52. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-22 ($GalNAc_3$-22_a) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là -P(=O)(OH)-A_d-P(=O)(OH)-. Cấu trúc của $GalNAc_3$-22 ($GalNAc_3$-22_a-CM-) được thể hiện dưới đây:



Ví dụ 74: Tác động của các gốc phân cắt được khác nhau trên sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích SRB-1 chứa thể tiếp hợp 5'-GalNAc$_3$

Các oligonucleotit được nêu dưới đây được thử trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng đối với việc ức chế đối nghĩa của SRB-1 ở chuột nhắt. Mỗi nhóm tiếp hợp GalNAc$_3$ được gắn vào đầu tận cùng 5' của oligonucleotit tương ứng.

Bảng 47

Các ASO cải biến hướng đích SRB-1

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	GalNAc$_3$ Chùm	CM	SEQ ID No.
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	n/a	n/a	28
661161	GalNAc$_3$-**3$_a$**-o'**A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-3a	A$_d$	30
666904	GalNAc$_3$-**3$_a$**-o'$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-3a	PO	28
675441	GalNAc$_3$-**17$_a$**-o'**A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-**17**a	A$_d$	30
675442	GalNAc$_3$-**18$_a$**-o'**A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-**18**a	A$_d$	30

Trong tất cả các bảng, các chữ cái viết hoa biểu thị nucleobazơ đối với mỗi nucleosit và ^{m}C biểu thị 5-metyl xytosin. Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE;"d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa nucleosit (PS); "o" biểu thị liên kết giữa nucleosit phosphođieste (PO); và "o'" biểu thị -O-P(=O)(OH)-. các nhóm tiếp hợp được in đậm.

Cấu trúc của GalNAc$_3$-3$_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 39. Cấu trúc của GalNAc$_3$-**17**a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 68, và cấu trúc của GalNAc$_3$-**18**a được thể hiện trong Ví dụ 69.

Điều trị bệnh

Chuột nhắt C57BL/6 sáu đến tám tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được tiêm dưới da một lần với liều lượng được thể hiện dưới đây bằng oligonucleotit liệt kê trong Bảng 47 hoặc bằng nước muối. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng để xác định lượng ARN thông tin của SRB-1 bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng ARN thông tin của SRB-1 cho mỗi nhóm thử nghiệm, theo nước muối đối chứng.

Như được thể hiện trong Bảng 48, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của SRB-1 theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng. Các oligonucleotit đối nghĩa chứa thể tiếp hợp GalNAc thể hiện hiệu lực tương tự và có hiệu lực cao hơn đáng kể so với gốc oligonucleotit không chứa thể tiếp hợp GalNAc.

Bảng 48

ARN thông tin của SRB-1 (% Nước muối)

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ARN thông tin của SRB-1 (% Nước muối)	$GalNAc_3$ Chùm	CM
Nước muối	n/a	100,0	n/a	n/a
353382	3	79,38	n/a	n/a
	10	68,67		
	30	40,70		
661161	0,5	79,18	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	75,96		
	5	30,53		
	15	12,52		
666904	0,5	91,30	$GalNAc_3$-3a	PO
	1,5	57,88		
	5	21,22		
	15	16,49		
675441	0,5	76,71	$GalNAc_3$-17a	A_d
	1,5	63,63		

	5	29,57		
	15	13,49		
675442	0,5	95,03	GalNAc$_3$-18a	A_d
	1,5	60,06		
	5	31,04		
	15	19,40		

Các mức traxaminaza của gan, alanin aminotransferaza (ALT) và aspartat aminotransferaza (AST), trong huyết thanh được đo so với nước muối được tiêm vào chuột nhắt bằng cách sử dụng các cách thức chuẩn. Tổng bilirubin và BUN sẽ được đánh giá. Thay đổi về thể trọng được đánh giá không có khác biệt đáng kể so với nhóm nước muối (dữ liệu không được thể hiện). Các ALT, AST, tổng bilirubin và giá trị BUN được thể hiện trong Bảng 49 dưới đây.

Bảng 49

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Tổng bilirubin (mg/dL)	BUN (mg/dL)	GalNAc$_3$ Chùm	CM
Nước muối	n/a	26	59	0,16	42	n/a	n/a
353382	3	23	58	0,18	39	n/a	n/a
	10	28	58	0,16	43		
	30	20	48	0,12	34		
661161	0,5	30	47	0,13	35	GalNAc$_3$-3a	A_d
	1,5	23	53	0,14	37		
	5	26	48	0,15	39		
	15	32	57	0,15	42		
666904	0,5	24	73	0,13	36	GalNAc$_3$-3a	PO
	1,5	21	48	0,12	32		
	5	19	49	0,14	33		
	15	20	52	0,15	26		
675441	0,5	42	148	0,21	36	GalNAc$_3$-17a	A_d
	1,5	60	95	0,16	34		

	5	27	75	0,14	37		
	15	24	61	0,14	36		
675442	0,5	26	65	0,15	37	$GalNAc_3$-18a	A_d
	1,5	25	64	0,15	43		
	5	27	69	0,15	37		
	15	30	84	0,14	37		

Ví dụ 75: Dược động học phân tích các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp ở đầu 5'

PK của các ASO trong các bảng 41, 44 và 47 nêu trên được đánh giá bằng cách sử dụng các mẫu gan mà thu được sau các quy trình xử lý được bộc lộ trong các ví dụ 65, 66, và 74. Các mẫu gan được nghiền và chiết bằng cách sử dụng các cách thức chuẩn và phân tích bằng IP-HPLC-MS dọc theo chất nội chuẩn. Lượng mô tổ hợp (μg/g) của tất cả các chất chuyển hóa được đo bằng cách hợp nhất các đỉnh UV thích hợp, và lượng mô của ASO có chiều dài đầy đủ thiếu thể tiếp hợp ("gốc, là ISIS số 353382 trong trường hợp này) được đo bằng cách sử dụng biểu đồ sắc ký tách ion thích hợp (EIC).

Bảng 50

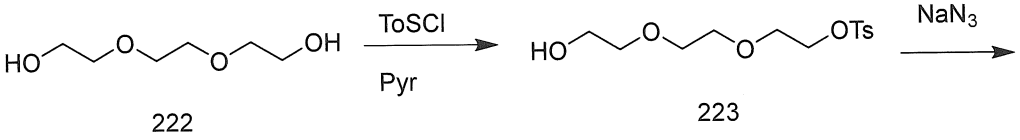
Phân tích PK ở gan

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Tổng lượng mô bằng UV (μg/g)	Lượng mô của ASO gốc bằng EIC (μg/g)	Cụm $GalNAc_3$	CM
353382	3	8,9	8,6	n/a	n/a
	10	22,4	21,0		
	30	54,2	44,2		
661161	5	32,4	20,7	$GalNAc_3$-3a	A_d
	15	63,2	44,1		
671144	5	20,5	19,2	$GalNAc_3$-12a	A_d
	15	48,6	41,5		
670061	5	31,6	28,0	$GalNAc_3$-13a	A_d
	15	67,6	55,5		
671261	5	19,8	16,8	$GalNAc_3$-14a	A_d
	15	64,7	49,1		

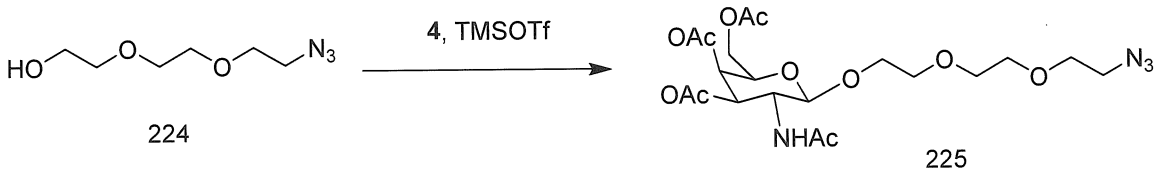
671262	5	18,5	7,4	$GalNAc_3$-15a	A_d
	15	52,3	24,2		
670699	5	16,4	10,4	$GalNAc_3$-3a	T_d
	15	31,5	22,5		
670700	5	19,3	10,9	$GalNAc_3$-3a	A_e
	15	38,1	20,0		
670701	5	21,8	8,8	$GalNAc_3$-3a	T_e
	15	35,2	16,1		
671165	5	27,1	26,5	$GalNAc_3$-13a	A_d
	15	48,3	44,3		
666904	5	30,8	24,0	$GalNAc_3$-3a	PO
	15	52,6	37,6		
675441	5	25,4	19,0	$GalNAc_3$-17a	A_d
	15	54,2	42,1		
675442	5	22,2	20,7	$GalNAc_3$-18a	A_d
	15	39,6	29,0		

Các kết quả trong Bảng 50 trên đây cho thấy rằng có lượng mô ở gan của các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp GalNAc3 lớn hơn so với lượng mô của oligonucleotit gốc mà không chứa nhóm tiếp hợp GalNAc3 (ISIS 353382) 72 giờ sau khi dùng oligonucleotit, đặc biệt là nếu cân nhắc cẩn thận về các khác biệt về liều lượng giữa các oligonucleotit có và không có nhóm tiếp hợp GalNAc3. Hơn thế nữa, 40% đến 98% mỗi oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp GalNAc3 được chuyển hóa thành hợp chất gốc trong thời gian 72 giờ, cho thấy rằng các nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$ được chia tách khỏi các oligonucleotit.

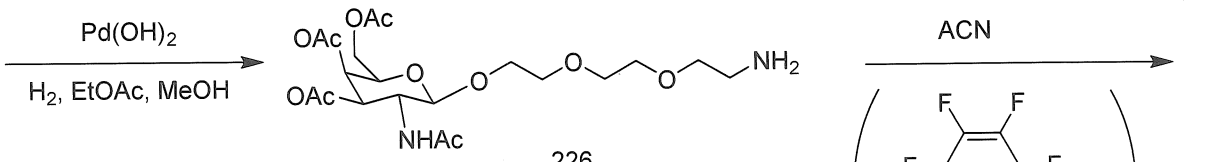
Ví dụ 76: Điều chế hợp chất oligome có công thức 230 chứa $GalNAc_3$-23



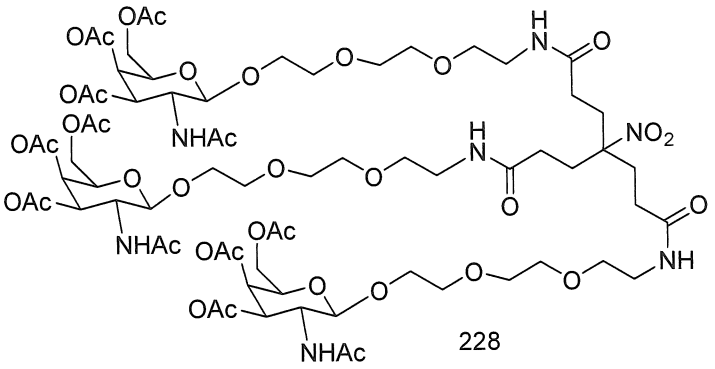
222 223



224 225

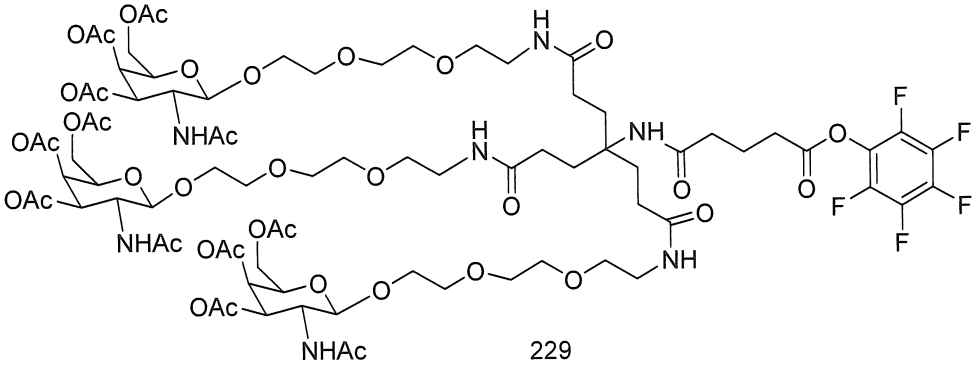


226 227

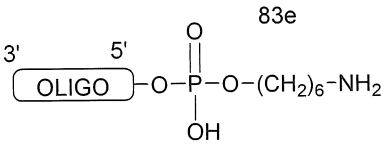


228

1. Giảm
2. Cặp Diaxit
3. Pd/C
4. PFPTFA

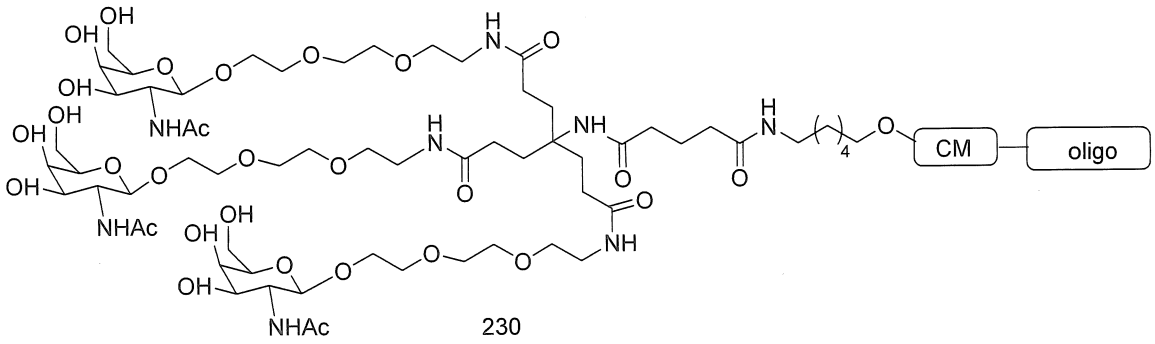


229



1. Chất đệm Borat, DMSO, pH 8,5, nhiệt độ trong phòng

2. Amoniac trong nước, nhiệt độ trong phòng



230

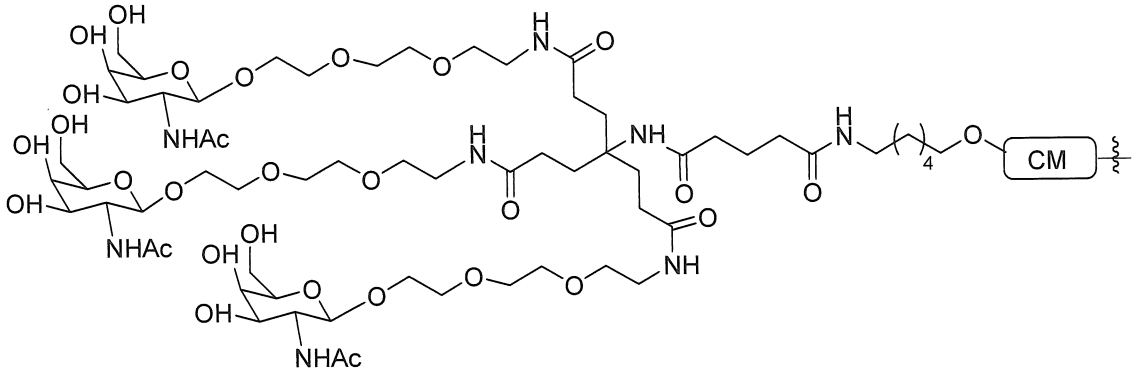
Hợp chất có công thức 222 có bán trên thị trường. 44,48ml (0,33mol) của hợp chất có công thức 222 được xử lý bằng tosyl clorua (25,39g, 0,13mol) trong pyriđin (500mL) trong thời gian 16 giờ. Sau đó, phản ứng được làm bay hơi thành dầu, hòa tan trong EtOAc và rửa bằng nước, dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa, nước muối, và làm khô trên Na_2SO_4. Etyl axetat được cô đến khô và tinh chế theo phương pháp sắc ký cột, rửa giải bằng EtOAc/hexan (theo tỷ lệ 1:1), tiếp theo là 10% metanol trong CH_2Cl_2 để tạo ra hợp chất có công thức 223 ở dạng dầu không màu. LCMS và NMR là phù hợp với cấu trúc. 10g (32,86mmol) 1-Tosyltrietylen glycol (Hợp chất có công thức 223) được xử lý bằng natri azit (10,68g, 164,28mmol) trong DMSO (100mL) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 17 giờ. Sau đó, hỗn hợp phản ứng này được được rót lên nước, và chiết bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước ba lần và làm khô trên Na_2SO_4. Lớp hữu cơ được cô đến khô để tạo ra 5,3g của hợp chất có công thức 224 (92%). LCMS và NMR là phù hợp với cấu trúc. 1-Aziđotrietylen glycol (Hợp chất có công thức 224, 5,53g, 23,69mmol) và hợp chất có công thức 4 (6g, 18,22mmol) được xử lý bằng rây phân tử 4A (5g), và TMSOTf (1,65mL, 9,11mmol) trong điclometan (100mL) trong khí quyển trơ. Sau 14 giờ, hỗn hợp phản ứng được lọc để loại bỏ rây, và lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ bão

hòa, nước, nước muối, và làm khô trên Na_2SO_4. Lớp hữu cơ được cô đến khô và tinh chế theo phương pháp sắc ký cột, rửa giải bằng građien 2% đến 4% metanol trong điclometan để tạo ra hợp chất có công thức 225. LCMS và NMR là phù hợp với cấu trúc. Hợp chất có công thức 225 (11,9g, 23,59mmol) được hyđro hóa trong EtOAc/Metanol (theo tỷ lệ 4:1, 250mL) trên chất xúc tác Pearlman. Sau 8 giờ, chất xúc tác được loại bỏ bằng cách lọc và các dung môi được loại ra đến khô để tạo ra hợp chất có công thức 226. LCMS và NMR là phù hợp với cấu trúc.

Để tạo ra hợp chất có công thức 227, dung dịch chứa nitrometantrisaxit propionic (4,17g, 15,04mmol) và bazơ Hunig (10,3ml, 60,17mmol) trong DMF (100mL) được xử lý nhỏ giọt bằng pentaflorotriflo axetat (9,05mL, 52,65mmol). Sau 30 phút, phản ứng được rót lên nước đá và chiết bằng EtOAc. Lớp hữu cơ được rửa bằng nước, nước muối, và làm khô trên Na_2SO_4. Lớp hữu cơ được cô đến khô và sau đó kết tinh lại ra khỏi heptan để tạo ra hợp chất có công thức 227 ở dạng rắn màu trắng. LCMS và NMR là phù hợp với cấu trúc. Hợp chất có công thức 227(1,5g, 1,93mmol) và hợp chất có công thức 226 (3,7g, 7,74mmol) được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong axetonitril (15mL) trong thời gian 2 giờ. Phản ứng sau đó được làm bay hơi đến khô và tinh chế theo phương pháp sắc ký cột, rửa giải bằng građien 2% đến10% metanol trong điclometan để tạo ra hợp chất có công thức 228. LCMS và NMR là phù hợp với cấu trúc. Hợp chất có công thức 228 (1,7g, 1,02mmol) được xử lý bằng niken Raney (khoảng 2g ướt) trong etanol (100mL) trong khí quyển hyđro. Sau 12 giờ, chất xúc tác được loại bỏ bằng cách lọc và lớp hữu cơ được làm bay hơi thành chất rắn mà được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo. LCMS và NMR là phù hợp với cấu trúc. Chất rắn (0,87g, 0,53mmol) được xử lý bằng axit benzylglutaric (0,18g, 0,8mmol), HBTU (0,3g, 0,8mmol) và DIEA (273,7µl, 1,6mmol) trong DMF (5mL). Sau 16 giờ, DMF được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm ở nhiệt độ 65°C thành dầu, và dầu được hòa tan trong điclometan. Lớp hữu cơ được rửa bằng dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa, nước muối, và làm khô trên Na_2SO_4. Sau khi làm bay hơi lớp hữu cơ, hợp chất này được tinh chế theo phương pháp sắc ký cột và rửa giải bằng građien 2% đến 20% metanol trong điclometan để tạo ra sản phẩm liên hợp. LCMS và NMR là phù hợp với cấu trúc. B este được khử bảo vệ bằng chất xúc tác Pearlman trong môi trường hyđro nguyên tử trong thời gian 1 giờ. Sau đó, chất xúc tác được loại ra bằng

cách lọc và các dung môi được loại ra đến khô để tạo ra axit. LCMS và NMR là phù hợp với cấu trúc. Axit (486mg, 0,27mmol) được hòa tan trong DMF khan (3ml). Pyriđin(53,61 µl, 0,66mmol) được bổ sung vào và phản ứng được sục argon. Pentaflorotrifloro axetat (46,39 µl, 0,4mmol) được bổ sung từ từ vào hỗn hợp phản ứng. Màu của phản ứng thay đổi từ vàng nhạt sang đỏ tía, và tỏa ra khói nhạt mà được thổi ra cùng vơi dòng argon. Hỗn hợp phản ứng này được để khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ (sự hoàn thành phản ứng được xác nhận bởi LCMS). Dung môi được loại bỏ trong điều kiện áp suất giảm (rotovap) ở nhiệt độ 70°C. Cặn được pha loãng bằng DCM và rửa lại bằng 1N $NaHSO_4$, nước muối, dung dịch natri bicacbonat bão hòa và nước muối. Các chất hữu cơ được làm khô trên Na_2SO_4, lọc, và cô đến khô để tạo ra 225mg Hợp chất có công thức 229 ở dạng bọt màu vàng sáng. LCMS và NMR là phù hợp với cấu trúc.

Hợp chất oligome có công thức 230, chứa nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-23, điều chế từ hợp chất có công thức 229 bằng cách áp dụng quy trình chung được thể hiện trong Ví dụ 46. Phần cụm GalNAc3 của nhóm tiếp hợp $GalNAc_3$-23 ($GalNAc_3$-23_a) có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Cấu trúc của $GalNAc_3$-23 ($GalNAc_3$-23_a-CM) được thể hiện dưới đây:



Ví dụ 77: Sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích SRB-1 chứa thể tiếp hợp GalNAc3

Các oligonucleotit được nêu dưới đây được thử trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng đối với việc ức chế đối nghĩa của SRB-1 ở chuột nhắt.

Bảng 51

Các ASO cải biến hướng đích SRB-1

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm GalNAc$_3$	CM	SEQ ID No.
661161	GalNAc$_3$-**3$_a$**-$_o$,**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	GalNAc$_3$-3a	A$_d$	30
666904	GalNAc$_3$-**3$_a$**-$_o$,G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	GalNAc$_3$-3a	PO	28
673502	GalNAc$_3$-**10$_a$**-$_o$,**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	GalNAc$_3$-10a	A$_d$	30
677844	GalNAc$_3$-**9$_a$**-$_o$,**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	GalNAc$_3$-9a	A$_d$	30
677843	GalNAc$_3$-**23$_a$**-$_o$,**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	GalNAc$_3$-23a	A$_d$	30
655861	G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C $_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{eo}$**A$_{do}$**,-GalNAc$_3$-**1$_a$**	GalNAc$_3$-**1**a	A$_d$	29
677841	G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C $_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{eo}$**A$_{do}$**,-GalNAc$_3$-**19$_a$**	GalNAc$_3$-**19**a	A$_d$	29
677842	G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{eo}$**A$_{do}$**,-GalNAc$_3$-2**0$_a$**	GalNAc$_3$-20a	A$_d$	29

Cấu trúc của GalNAc$_3$-**1**$_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 9, GalNAc$_3$-3$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 39, GalNAc$_3$-9a được thể hiện trong Ví dụ 52, GalNAc$_3$-10a được thể hiện trong Ví dụ 46, GalNAc$_3$-**19**$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 70, GalNAc$_3$-20$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 71, và GalNAc$_3$-23$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 76.

Điều trị bệnh

Chuột nhắt C$_5$7BL/6 sáu đến tám tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) mỗi con được tiêm dưới da một lần với liều lượng được thể hiện dưới đây bằng oligonucleotit liệt kê trong Bảng 51 hoặc bằng nước muối. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng để xác định lượng ARN thông tin của SRB-1 bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn.

Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng ARN thông tin của SRB-1 cho mỗi nhóm thử nghiệm, theo nước muối đối chứng.

Như được thể hiện trong Bảng 52, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của SRB-1 theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng.

Bảng 52

ARN thông tin của SRB-1 (% Nước muối)

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ARN thông tin của SRB-1 (% Nước muối)	Cụm $GalNAc_3$	CM
Nước muối	n/a	100,0	n/a	n/a
661161	0,5	89,18	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	77,02		
	5	29,10		
	15	12,64		
666904	0,5	93,11	$GalNAc_3$-3a	PO
	1,5	55,85		
	5	21,29		
	15	13,43		
673502	0,5	77,75	$GalNAc_3$-10a	A_d
	1,5	41,05		
	5	19,27		
	15	14,41		
677844	0,5	87,65	$GalNAc_3$-9a	A_d
	1,5	93,04		
	5	40,77		
	15	16,95		
677843	0,5	102,28	$GalNAc_3$-23a	A_d
	1,5	70,51		
	5	30,68		
	15	13,26		
655861	0,5	79,72	$GalNAc_3$-1a	A_d

	1,5	55,48		
	5	26,99		
	15	17,58		
677841	0,5	67,43	$GalNAc_3$-19a	A_d
	1,5	45,13		
	5	27,02		
	15	12,41		
677842	0,5	64,13	$GalNAc_3$-20a	A_d
	1,5	53,56		
	5	20,47		
	15	10,23		

Các mức traxaminaza của gan, alanin aminotransferaza (ALT) và aspartat aminotransferaza (AST), trong huyết thanh cũng được đo bằng cách sử dụng các cách thức chuẩn. Tổng bilirubin và BUN sẽ được đánh giá. Các thay đổi về thể trọng được đánh giá, không có khác biệt đáng kể so với nhóm nước muối (dữ liệu không được thể hiện). Các ALT, AST, tổng bilirubin và giá trị BUN được thể hiện trong Bảng 53 dưới đây.

Bảng 53

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Tổng bilirubin (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Cụm $GalNAc_3$	CM
Nước muối	n/a	21	45	0,13	34	n/a	n/a
661161	0,5	28	51	0,14	39	$GalNAc_3$-3a	A_d
	1,5	23	42	0,13	39		
	5	22	59	0,13	37		
	15	21	56	0,15	35		
666904	0,5	24	56	0,14	37	$GalNAc_3$-3a	PO
	1,5	26	68	0,15	35		
	5	23	77	0,14	34		
	15	24	60	0,13	35		

673502	0,5	24	59	0,16	34	$GalNAc_3$-10a	A_d
	1,5	20	46	0,17	32		
	5	24	45	0,12	31		
	15	24	47	0,13	34		
677844	0,5	25	61	0,14	37	$GalNAc_3$-9a	A_d
	1,5	23	64	0,17	33		
	5	25	58	0,13	35		
	15	22	65	0,14	34		
677843	0,5	53	53	0,13	35	$GalNAc_3$-23a	A_d
	1,5	25	54	0,13	34		
	5	21	60	0,15	34		
	15	22	43	0,12	38		
655861	0,5	21	48	0,15	33	$GalNAc_3$-1a	A_d
	1,5	28	54	0,12	35		
	5	22	60	0,13	36		
	15	21	55	0,17	30		
677841	0,5	32	54	0,13	34	$GalNAc_3$-19a	A_d
	1,5	24	56	0,14	34		
	5	23	92	0,18	31		
	15	24	58	0,15	31		
677842	0,5	23	61	0,15	35	$GalNAc_3$-20a	A_d
	1,5	24	57	0,14	34		
	5	41	62	0,15	35		
	15	24	37	0,14	32		

Ví dụ 78: Ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích Angiotensinogen chứa thể tiếp hợp GalNAc3

Các oligonucleotit được nêu dưới đây được thử trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng đối với ức chế đối nghĩa Angiotensinogen (AGT) trong chuột Sprague Dawley huyết áp bình thường.

Bảng 54

Các ASO cải biến hướng đích AGT

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cujm $GalNAc_3$	CM	SEQ ID No.
552668	$^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}G_{es}A_{es}T_{e}$	n/a	n/a	34
669509	$^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}G_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-$GalNAc_3$-$\mathbf{1_a}$	$GalNAc_3$-$\mathbf{1_a}$	A_d	35

Cấu trúc của $GalNAc_3$-$\mathbf{1_a}$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 9.

Điều trị bệnh

Mỗi con chuột đực Sprague Dawley sáu tuần tuổi được tiêm dưới da một lần mỗi tuần với liều lượng được thể hiện dưới đây, trong tổng cộng ba liều, bằng oligonucleotit liệt kê trong Bảng 54 hoặc bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Con chuột này bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng. Các lượng ARN thông tin của AGT ở gan được đo bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Lượng protein của AGT trong huyết tương được đo bằng cách sử dụng Total Angiotensinogen ELISA (Catalog # JP27412, IBL International, Toronto, ON) với huyết tương được pha loãng 1:20,000. Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của các lượng ARN thông tin của AGT ở gan hoặc lượng protein của AGT trong huyết tương cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa với sự điều khiển bằng PBS.

Như được thể hiện trong Bảng 55, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của AGT ở gan và lượng protein của AGT trong huyết tương theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng, và oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc có sự hiệu nghiệm nhiều hơn đáng kể so với gốc oligonucleotit không có thể tiếp hợp GalNAc.

Bảng 55

Lượng ARN thông tin của AGT ở gan và lượng protein của AGT trong huyết tương

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	AGT gan ARN thông tin (% PBS)	AGT huyết tương protein (% PBS)	Cụm $GalNAc_3$	CM
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a
552668	3	95	122	n/a	n/a
	10	85	97		
	30	46	79		
	90	8	11		
669509	0,3	95	70	$GalNAc_3$-1a	A_d
	1	95	129		
	3	62	97		
	10	9	23		

Các mức traxaminaza của gan, alanin aminotransferaza (ALT) và aspartat aminotransferaza (AST), trong huyết tương và thể trọng cũng được đo tại thời điểm giết bằng cách sử dụng các quy trình chuẩn. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 56 dưới đây.

Bảng 56

Các mức traxaminaza của gan và thể trọng của chuột

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Thể trọng (% cơ sở)	Cụm $GalNAc_3$	CM
PBS	n/a	51	81	186	n/a	n/a
552668	3	54	93	183	n/a	n/a
	10	51	93	194		
	30	59	99	182		
	90	56	78	170		
669509	0,3	53	90	190	$GalNAc_3$-1a	A_d
	1	51	93	192		
	3	48	85	189		
	10	56	95	189		

Ví dụ 79: Khoảng thời gian hoạt động *in vivo* của các oligonucleotit hướng đích APOC-III chứa thể tiếp hợp GalNAc3

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 57 dưới đây được thử trong một nghiên cứu một liều trong khoảng thời gian hoạt động ở chuột nhắt.

Bảng 57

Các ASO cải biến hướng đích APOC-III

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm $GalNAc_3$	CM	SEQ ID No.
304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	n/a	n/a	20
647535	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-$GalNAc_3$-$\mathbf{1_a}$	$GalNAc_3$-**1**a	A_d	21
663083	$GalNAc_3$-$\mathbf{3_{a\text{-}o}}$-$\mathbf{A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	A_d	36
674449	$GalNAc_3$-$7_{a\text{-}o}$-$\mathbf{A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-7a	A_d	36
674450	$GalNAc_3$-$10_{a\text{-}o}$-$\mathbf{A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-10a	A_d	36
674451	$GalNAc_3$-$13_{a\text{-}o}$-$\mathbf{A_{do}}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-13a	A_d	36

Cấu trúc của $GalNAc_3$-$\mathbf{1}_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 9, $GalNAc_3$-3_a được thể hiện trong Ví dụ 39, $GalNAc_3$-7_a được thể hiện trong Ví dụ 48, $GalNAc_3$-10_a được thể hiện trong Ví dụ 46, và $GalNAc_3$-13_a được thể hiện trong Ví dụ 62.

Điều trị bệnh

Mỗi con chuột nhắt chuyển gen có APOC-III của người sáu đến tám tuần tuổi được tiêm dưới da một lần bằng oligonucleotit liệt kê trong Bảng 57 hoặc bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 3 động vật. Máu được lấy ra trước khi dùng liều để xác định trị số cơ sở và ở 72 giờ, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần, và 6 tuần sau khi dùng liều. Triglyxerit trong huyết tương và lượng protein của APOC-III được đo như được mô tả trong Ví dụ 20. Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của triglyxerit trong huyết tương và các lượng APOC-III cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa thành lượng cơ sở, thể hiện rằng các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp GalNAc thể hiện khoảng thời gian hoạt động lâu hơn so với oligonucleotit gốc mà không có nhóm tiếp hợp

(ISIS 304801) mặc dù liều lượng gốc bằng ba lần liều lượng các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp GalNAc.

Bảng 58

Triglyxerit trong huyết tương và lượng protein của APOC-III ở chuột nhắt chuyển gen

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Mốc thời gian (ngày sau khi dùng liều)	Triglyxerit (% cơ sở)	Lượng protein của APOC-III (% cơ sở)	Cụm $GalNAc_3$	CM
PBS	n/a	3	97	102	n/a	n/a
		7	101	98		
		14	108	98		
		21	107	107		
		28	94	91		
		35	88	90		
		42	91	105		
304801	30	3	40	34	n/a	n/a
		7	41	37		
		14	50	57		
		21	50	50		
		28	57	73		
		35	68	70		
		42	75	93		
647535	10	3	36	37	$GalNAc_3$-1a	A_d
		7	39	47		
		14	40	45		
		21	41	41		
		28	42	62		
		35	69	69		
		42	85	102		
663083	10	3	24	18	$GalNAc_3$-3a	A_d
		7	28	23		
		14	25	27		
		21	28	28		
		28	37	44		
		35	55	57		
		42	60	78		
674449	10	3	29	26	$GalNAc_3$-7a	A_d
		7	32	31		
		14	38	41		

		21	44	44		
		28	53	63		
		35	69	77		
		42	78	99		
674450	10	3	33	30	GalNAc$_3$-10a	A_d
		7	35	34		
		14	31	34		
		21	44	44		
		28	56	61		
		35	68	70		
		42	83	95		
674451	10	3	35	33	GalNAc$_3$-13a	A_d
		7	24	32		
		14	40	34		
		21	48	48		
		28	54	67		
		35	65	75		
		42	74	97		

Ví dụ 80: Sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích Alpha-1 Antitrypsin (A1AT) chứa thể tiếp hợp GalNAc3

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 59 dưới đây được thử trong nghiên cứu về mức độ ức chế phụ thuộc liều lượng A1AT ở chuột nhắt.

Bảng 59

Các ASO cải biến hướng đích A1AT

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm GalNAc$_3$	CM	SEQ ID No.
476366	$A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}G_{es}G_{es}A_e$	n/a	n/a	37
656326	$A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}G_{es}G_{es}A_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_3$-$\mathbf{1_a}$	GalNAc$_3$-**1**a	A_d	38
678381	GalNAc$_3$-$\mathbf{3_a}$-$_{o'}\mathbf{A_{do}}A_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{es}A_{es}G_{es}G_{es}A_e$	GalNAc$_3$-3a	A_d	39

678382	GalNAc$_3$-7$_a$-o,**A$_{do}$**A$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{es}$A$_{ds}$T$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$ A$_{ds}$G$_{ds}$G$_{ds}$A$_{es}$A$_{es}$ G$_{es}$G$_{es}$A$_e$	GalNAc$_3$-7a	A$_d$	39
678383	GalNAc$_3$-10$_{a-o}$,**A$_{do}$**A$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{es}$A$_{ds}$T$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$G$_{ds}$ A$_{ds}$A$_{ds}$G$_{ds}$G$_{ds}$A$_{es}$A$_{es}$ G$_{es}$G$_{es}$A$_e$	GalNAc$_3$-10a	A$_d$	39
678384	GalNAc$_3$-13$_{a-o}$,**A$_{do}$**A$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{es}$A$_{ds}$T$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$G$_{ds}$ A$_{ds}$A$_{ds}$G$_{ds}$G$_{ds}$A$_{es}$A$_{es}$ G$_{es}$G$_{es}$A$_e$	GalNAc$_3$-13a	A$_d$	39

Cấu trúc của GalNAc$_3$-**1**$_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 9, GalNAc$_3$-3$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 39, GalNAc$_3$-7$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 48, GalNAc$_3$-10$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 46, và GalNAc$_3$-13$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 62.

Điều trị bệnh

Mỗi con chuột đực C57BL/6 sáu tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được tiêm dưới da một lần mỗi tuần với liều lượng được thể hiện dưới đây, tổng cộng ba liều, bằng oligonucleotit liệt kê trong Bảng 59 hoặc bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng. Các lượng ARN thông tin của A1AT ở gan được xác định bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Lượng protein của A1AT trong huyết tương được xác định bằng cách sử dụng chuột nhắt Alpha 1-Antitrypsin ELISA (catalog # 41-A1AMS-E01, Alpco, Salem, NH). Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng ARN thông tin của A1AT ở gan và lượng protein của A1AT trong huyết tương cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa với sự điều khiển bằng PBS.

Như được thể hiện trong Bảng 60, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của A1AT ở gan và lượng protein của A1AT trong huyết tương theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng. Các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc có lực cao hơn đáng kể so với oligonucleotit gốc (ISIS 476366).

Bảng 60

Lượng ARN thông tin của A1AT ở gan và lượng protein của A1T1 trong huyết tương

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Lượng ARN thông tin của A1AT ở gan (% PBS)	Lượng protein của A1AT trong huyết tương (% PBS)	Cụm $GalNAc_3$	CM
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a
476366	5	86	78	n/a	n/a
	15	73	61		
	45	30	38		
656326	0,6	99	90	$GalNAc_3$-1a	A_d
	2	61	70		
	6	15	30		
	18	6	10		
678381	0,6	105	90	$GalNAc_3$-3a	A_d
	2	53	60		
	6	16	20		
	18	7	13		
678382	0,6	90	79	$GalNAc_3$-7a	A_d
	2	49	57		
	6	21	27		
	18	8	11		
678383	0,6	94	84	$GalNAc_3$-10a	A_d
	2	44	53		
	6	13	24		
	18	6	10		
678384	0,6	106	91	$GalNAc_3$-13a	A_d
	2	65	59		
	6	26	31		
	18	11	15		

Lượng traxaminaza ở gan và BUN trong huyết tương được đo tại thời điểm giết bằng cách áp dụng các quy trình chuẩn. Thể trọng và trọng lượng cơ quan cũng được đo. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 61 dưới đây. Thể trọng được thể hiện bằng % so với cơ sở. Trọng lượng cơ quan được thể hiện bằng % thể trọng so với nhóm đối chứng PBS.

Bảng 61

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Thể trọng (% cơ sở)	Khối lượng gan (Rel % BW)	Khối lượng thận (Rel % BW)	Khối lượng lá lách (Rel % BW)
PBS	n/a	25	51	37	119	100	100	100
476366	5	34	68	35	116	91	98	106
	15	37	74	30	122	92	101	128
	45	30	47	31	118	99	108	123
656326	0,6	29	57	40	123	100	103	119
	2	36	75	39	114	98	111	106
	6	32	67	39	125	99	97	122
	18	46	77	36	116	102	109	101
678381	0,6	26	57	32	117	93	109	110
	2	26	52	33	121	96	106	125
	6	40	78	32	124	92	106	126
	18	31	54	28	118	94	103	120
678382	0,6	26	42	35	114	100	103	103
	2	25	50	31	117	91	104	117
	6	30	79	29	117	89	102	107
	18	65	112	31	120	89	104	113
678383	0,6	30	67	38	121	91	100	123
	2	33	53	33	118	98	102	121
	6	32	63	32	117	97	105	105
	18	36	68	31	118	99	103	108
678384	0,6	36	63	31	118	98	103	98
	2	32	61	32	119	93	102	114

	6	34	69	34	122	100	100	96
	18	28	54	30	117	98	101	104

Ví dụ 81: Khoảng thời gian hoạt động *in vivo* của các oligonucleotit hướng đích A1AT chứa cụm $GalNAc_3$

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 59 được thử trong nghiên cứu một liều về khoảng thời gian hoạt động ở chuột nhắt.

Điều trị

Mỗi con chuột đực C57BL/6 sáu tuần tuổi được tiêm dưới da một lần bằng oligonucleotit liệt kê trong Bảng 59 hoặc bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Máu được rút ra ngày trước khi dùng liều để xác định cơ sở và ở 5, 12, 19, và 25 ngày sau khi dùng liều. Lượng protein của A1AT trong huyết tương được đo qua ELISA (xem ví dụ 80). Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng protein của A1AT trong huyết tương cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa với lượng cơ sở. Các kết quả cho thấy rằng các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc có hiệu nghiệm hơn và có khoảng thời gian hoạt động lâu hơn so với oligonucleotit gốc không có thể tiếp hợp GalNAc (ISIS 476366). Hơn thế nữa, các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp 5'-GalNAc (ISIS 678381, 678382, 678383, và 678384) thường hiệu nghiệm hơn cùng với khoảng thời gian hoạt động lâu hơn so với oligonucleotit chứa thể tiếp hợp 3'-GalNAc (ISIS 656326).

Bảng 62

Lượng protein của A1AT trong huyết tương ở chuột nhắt

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Thời điểm (số ngày sau khi dùng liều)	A1AT (% cơ sở)	Cụm $GalNAc_3$	CM
PBS	n/a	5	93	n/a	n/a
		12	93		
		19	90		

		25	97		
476366	100	5	38	n/a	n/a
		12	46		
		19	62		
		25	77		
656326	18	5	33	$GalNAc_3$-1a	A_d
		12	36		
		19	51		
		25	72		
678381	18	5	21	$GalNAc_3$-3a	A_d
		12	21		
		19	35		
		25	48		
678382	18	5	21	$GalNAc_3$-7a	A_d
		12	21		
		19	39		
		25	60		
678383	18	5	24	$GalNAc_3$-10a	A_d
		12	21		
		19	45		
		25	73		
678384	18	5	29	$GalNAc_3$-13a	A_d
		12	34		
		19	57		
		25	76		

Ví dụ 82: Ức chế đối nghĩa *in vitro* bằng các oligonucleotit hướng đích SRB-1 chứa thể tiếp hợp GalNAc3

Tế bào gan ban đầu của chuột được gieo mầm trong các đĩa loại 96 lỗ với 15.000 tế bào/lỗ 2 giờ trước khi xử lý. Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 63 được bổ sung ở 2, 10, 50, hoặc 250nM trong phương tiện Williams E và các tế bào được ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong CO_2 5%. Các tế bào được phân giải 16 giờ sau khi thêm oligonucleotit, và

toàn bộ ARN được tinh chế bằng cách sử dụng RNease 3000 BioRobot (do Qiagen cung cấp). Lượng ARN thông tin của SRB-1 được xác định bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các quy trình chuẩn. Các giá trị IC_{50} được xác định bằng cách sử dụng phần mềm Prism 4 (GraphPad). Các kết quả cho thấy rằng các oligonucleotit chứa nhiều nhóm tiếp hợp GalNAc khác nhau và nhiều gốc có thể chia tách khác nhau có hiệu lực cao hơn đáng kể trong thử nghiệm hấp thu tự do *in vitro* so với các oligonucleotit gốc không có nhóm tiếp hợp GalNAc (ISIS 353382 và 666841).

Bảng 63

Việc ức chế sự biểu hiện SRB-1 *in vitro*

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Các liên kết	Cụm GalNAc	CM	IC_{50} (nM)	SEQ ID No.
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	n/a	n/a	250	28
655861	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_3$-**1$_a$**	PS	GalNAc$_3$-**1**$_a$	A_d	40	29
661161	GalNAc$_3$-**3$_{a-o}$**-**A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-3$_a$	A_d	40	30
661162	GalNAc$_3$-**3$_{a-o}$**-**A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PO/PS	GalNAc$_3$-3$_a$	A_d	8	30
664078	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_3$-**9$_a$**	PS	GalNAc$_3$-9$_a$	A_d	20	29
665001	GalNAc$_3$-**8$_{a-o}$**-**A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-8$_a$	A_d	70	30
666224	GalNAc$_3$-**5$_{a-o}$**-**A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-5$_a$	A_d	80	30
666841	$G_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PO/PS	n/a	n/a	>250	28
666881	GalNAc$_3$-10$_{a-o}$-**A_{do}**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-10$_a$	A_d	30	30

666904	GalNAc$_3$-**3$_a$-$_o$**,G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$^{m}C$_{ds}$ A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PS	GalNAc$_3$-3$_a$	PO	9	28
666924	GalNAc$_3$-**3$_a$-$_o$,T$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PS	GalNAc$_3$-3$_a$		15	33
666961	GalNAc$_3$-**6$_a$-$_o$,A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PS	GalNAc$_3$-6$_a$	A$_d$	150	30
666981	GalNAc$_3$-7$_a$-$_o$,**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PS	GalNAc$_3$-7$_a$	A$_d$	20	30
670061	GalNAc$_3$-13$_a$-$_o$,**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PS	GalNAc$_3$-13$_a$	A$_d$	30	30
670699	GalNAc$_3$-**3$_a$-$_o$,T$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PO/PS	GalNAc$_3$-3$_a$	T$_d$	15	33
670700	GalNAc$_3$-**3$_a$-$_o$,A$_{eo}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T	PO/PS	GalNAc$_3$-3$_a$	A$_e$	30	30
670701	GalNAc$_3$-**3$_a$-$_o$,T$_{eo}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PO/PS	GalNAc$_3$-3$_a$	T$_e$	25	33
671144	GalNAc$_3$-12$_a$-$_o$,**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PS	GalNAc$_3$-12$_a$	A$_d$	40	30
671165	GalNAc$_3$-13$_a$-$_o$,**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$ G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T	PO/PS	GalNAc$_3$-13$_a$	A$_d$	8	30
671261	GalNAc$_3$-**14$_a$-$_o$,A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PS	GalNAc$_3$-**14**$_a$	A$_d$	>250	30
671262	GalNAc$_3$-**15$_a$-$_o$,A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_{es}$^{m}C$_{es}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$ T$_{es}$^{m}C$_{es}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PS	GalNAc$_3$-**15**$_a$	A$_d$	>250	30
673501	GalNAc$_3$-7$_a$-$_o$,**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$ ^{m}C$_{ds}$A$_{ds}$T$_{ds}$G$_{ds}$A$_{ds}$^{m}C$_{ds}$T$_{ds}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$ ^{m}C$_{es}$T$_{es}$T$_e$	PO/PS	GalNAc$_3$-7$_a$	A$_d$	30	30
673502	GalNAc$_3$-10$_a$-$_o$,**A$_{do}$**G$_{es}$^{m}C$_{eo}$T$_{eo}$T$_{eo}$^{m}C$_{eo}$A$_{ds}$G$_{ds}$T$_{ds}$	PO/PS	GalNAc$_3$-10$_a$	A$_d$	8	30

	$^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$					
675441	GalNAc$_3$-**17$_{a-o}$**-**A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-**17$_a$**	A_d	30	30
675442	GalNAc$_3$-**18$_{a-o}$**-**A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-**18$_a$**	A_d	20	30
677841	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**A$_{do}$**'-GalNAc$_3$-**19$_a$**	PS	GalNAc$_3$-**19$_a$**	A_d	40	29
677842	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{eo}$**A$_{do}$**'-GalNAc$_3$-**20$_a$**	PS	GalNAc$_3$-**20$_a$**	A_d	30	29
677843	GalNAc$_3$-**23$_{a-o}$**-**A$_{do}$**$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	PS	GalNAc$_3$-**23$_a$**	A_d	40	30

Cấu trúc của GalNAc$_3$-**1$_a$** được thể hiện trên đây trong Ví dụ 9, GalNAc$_3$-3$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 39, GalNAc$_3$-5$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 49, GalNAc$_3$-6$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 51, GalNAc$_3$-7$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 48, GalNAc$_3$-8$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 47, GalNAc$_3$-9$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 52, GalNAc$_3$-10$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 46, GalNAc$_3$-12$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 61, GalNAc$_3$-13$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 62, GalNAc$_3$-**14$_a$** được thể hiện trong Ví dụ 63, GalNAc$_3$-**15$_a$** được thể hiện trong Ví dụ 64, GalNAc$_3$-**17$_a$** được thể hiện trong Ví dụ 68, GalNAc$_3$-**18$_a$** được thể hiện trong Ví dụ 69, GalNAc$_3$-**19$_a$** được thể hiện trong Ví dụ 70, GalNAc$_3$-20$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 71, và GalNAc$_3$-23$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 76.

Ví dụ 83: Sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích Factor XI chứa cụm GalNAc$_3$

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 64 dưới đây được thử trong nghiên cứu về mức độ ức chế phụ thuộc liều lượng Factor XI ở chuột nhắt.

Bảng 64

Yếu tố hướng đích oligonucleotit cải biến XI

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm GalNAc	CM	SEQ ID No.
404071	$T_{es}G_{es}G_{es}T_{es}A_{es}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{es}G_{es}$ $A_{es}G_{es}G_{e}$	n/a	n/a	31
656173	$T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}$ $A_{es}G_{es}G_{eo}\mathbf{A_{do}}$'-GalNAc$_3$-$\mathbf{1_a}$	GalNAc$_3$-$\mathbf{1}_a$	A_d	32
663086	GalNAc$_3$-$\mathbf{3_{a-o}}$-$\mathbf{A_{do}}T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	GalNAc$_3$-3$_a$	A_d	40
678347	GalNAc$_3$-$\mathbf{7_{a-o}}$-$\mathbf{A_{do}}T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	GalNAc$_3$-7$_a$	A_d	40
678348	GalNAc$_3$-$\mathbf{10_{a-o}}$-$\mathbf{A_{do}}T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	GalNAc$_3$-10$_a$	A_d	40
678349	GalNAc$_3$-$\mathbf{13_{a-o}}$-$\mathbf{A_{do}}T_{es}G_{eo}G_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{eo}G_{eo}A_{es}G_{es}G_{e}$	GalNAc$_3$-13$_a$	A_d	40

Cấu trúc của GalNAc$_3$-$\mathbf{1}_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 9, GalNAc$_3$-3$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 39, GalNAc$_3$-7$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 48, GalNAc$_3$-10$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 46, và GalNAc$_3$-13$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 62.

Điều trị bệnh

Mỗi con chuột nhắt sáu đến tám tuần tuổi được tiêm dưới da một lần mỗi tuần với liều lượng được thể hiện dưới đây, tổng cộng ba liều, bằng oligonucleotit được nêu dưới đây hoặc bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng. Các lượng ARN thông tin của Yếu tố XI ở gan được đo bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chuẩn tắc hóa với xyclophilin theo các cách thức chuẩn. Các lượng traxaminaza, BUN, và bilirubin ở gan cũng được đo. Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa với sự điều khiển bằng PBS.

Như được thể hiện trong Bảng 65, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của Factor XI ở gan theo kiểu phụ thuộc vào liều

lượng. Các kết quả cho thấy rằng các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc có hiệu lực cao hơn so với oligonucleotit gốc không có thể tiếp hợp GalNAc (ISIS 404071). Hơn thế nữa, các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp 5'-GalNAc (ISIS 663086, 678347, 678348, và 678349) cũng có hiệu lực cao hơn so với oligonucleotit chứa thể tiếp hợp 3'-GalNAc (ISIS 656173).

Bảng 65

Lượng ARN thông tin của Yếu tố XI ở gan, lượng traxaminaza, BUN, và bilirubin ở gan

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Lượng ARN thông tin của Yếu tố XI (% PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Bilirubin (mg/dL)	Cụm $GalNAc_3$	SEQ ID No.
PBS	n/a	100	63	70	21	0,18	n/a	n/a
404071	3	65	41	58	21	0,15	n/a	31
	10	33	49	53	23	0,15		
	30	17	43	57	22	0,14		
656173	0,7	43	90	89	21	0,16	$GalNAc_3$-1a	32
	2	9	36	58	26	0,17		
	6	3	50	63	25	0,15		
663086	0,7	33	91	169	25	0,16	$GalNAc_3$-3a	40
	2	7	38	55	21	0,16		
	6	1	34	40	23	0,14		
678347	0,7	35	28	49	20	0,14	$GalNAc_3$-7a	40
	2	10	180	149	21	0,18		
	6	1	44	76	19	0,15		
678348	0,7	39	43	54	21	0,16	$GalNAc_3$-10a	40
	2	5	38	55	22	0,17		
	6	2	25	38	20	0,14		
678349	0,7	34	39	46	20	0,16	$GalNAc_3$-13a	40
	2	8	43	63	21	0,14		
	6	2	28	41	20	0,14		

Ví dụ 84: Khoảng thời gian hoạt động *in vivo* của các oligonucleotit hướng đích Factor XI chứa thể tiếp hợp GalNAc3

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 64 được thử trong nhiên cứau một liều về khoảng thời gian hoạt động ở chuột nhắt.

Điều trị bệnh

Mỗi con chuột nhắt sáu đến tám tuần tuổi được tiêm dưới da một lần bằng oligonucleotit liệt kê trong Bảng 64 hoặc bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Máu được rút ra bằng các lấy máu ở đuôi ngày trước khi dùng liều để xác định cơ sở và ở 3, 10, và 17 ngày sau khi dùng liều. Lượng protein của Factor XI trong huyết tương được đo theo phương pháp ELISA bằng cách sử dụng bẫy Yếu tố XI và được biotinyl hóa dò các kháng thể từ R & D Systems, Minneapolis, MN (catalog # AF2460 và # BAF2460, lần lượt) và OptEIA Reagent Set B (Catalog # 550534, BD Biosciences, San Jose, CA). Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng protein của Factor XI trong huyết tương cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa với lượng cơ sở. Các kết quả cho thấy rằng các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc có hiệu lực lớn hơn với khoảng thời gian hoạt động lâu hơn so với oligonucleotit gốc không có thể tiếp hợp GalNAc (ISIS 404071). Hơn thế nữa, các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp 5'-GalNAc (ISIS 663086, 678347, 678348, và 678349) thậm chí có hiệu lực lớn hơn cùng với khoảng thời gian hoạt động lâu hơn so với oligonucleotit chứa thể tiếp hợp 3'-GalNAc (ISIS 656173).

Bảng 66

Lượng protein của Factor XI trong huyết tương ở chuột nhắt

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Mốc thời gian (ngày sau khi dùng liều)	Factor XI (% cơ sở)	Cụm $GalNAc_3$	CM	SEQ ID No.
PBS	n/a	3	123	n/a	n/a	n/a
		10	56			
		17	100			
404071	30	3	11	n/a	n/a	31
		10	47			

		17	52			
656173	6	3	1	$GalNAc_3$-1a	A_d	32
		10	3			
		17	21			
663086	6	3	1	$GalNAc_3$-3a	A_d	40
		10	2			
		17	9			
678347	6	3	1	$GalNAc_3$-7a	A_d	40
		10	1			
		17	8			
678348	6	3	1	$GalNAc_3$-10a	A_d	40
		10	1			
		17	6			
678349	6	3	1	$GalNAc_3$-13a	A_d	40
		10	1			
		17	5			

Ví dụ 85: Sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích SRB-1 chứa thể tiếp hợp GalNAc3

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 63 được thử trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng đối với việc ức chế đối nghĩa của SRB-1 ở chuột nhắt.

Điều trị bệnh

Mỗi con chuột nhắt C57BL/6 sáu đến tám tuần tuổi được tiêm dưới da một lần mỗi tuần với liều lượng được thể hiện dưới đây, tổng cộng ba liều, bằng oligonucleotit liệt kê trong Bảng 63 hoặc bằng nước muối. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Chuột nhắt bị giết 48 giờ sau khi dùng liều cuối cùng để xác định lượng ARN thông tin của SRB-1 bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Các kết quả dưới đây được đưa ra as phần trăm trung bình của lượng ARN thông tin của SRB-1 ở gan cho mỗi nhóm thử nghiệm, theo nước muối đối chứng.

Như được thể hiện trong các bảng 67 và 68, việc ử lý bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của SRB-1 theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng.

Bảng 67

Lượng ARN thông tin của SRB-1 ở gan

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ARN thông tin của SRB-1 (% Nước muối)	Cụm $GalNAc_3$	CM
Nước muối	n/a	100	n/a	n/a
655861	0,1	94	$GalNAc_3$-1a	A_d
	0,3	119		
	1	68		
	3	32		
661161	0,1	120	$GalNAc_3$-3a	A_d
	0,3	107		
	1	68		
	3	26		
666881	0,1	107	$GalNAc_3$-10a	A_d
	0,3	107		
	1	69		
	3	27		
666981	0,1	120	$GalNAc_3$-7a	A_d
	0,3	103		
	1	54		
	3	21		
670061	0,1	118	$GalNAc_3$-13a	A_d
	0,3	89		
	1	52		
	3	18		
677842	0,1	119	$GalNAc_3$-20a	A_d
	0,3	96		
	1	65		
	3	23		

Bảng 68

Lượng ARN thông tin của SRB-1 ở gan

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ARN thông tin của SRB-1 (% Nước muối)	Cụm $GalNAc_3$	CM
661161	0,1	107	$GalNAc_3$-3a	A_d
	0,3	95		
	1	53		
	3	18		
677841	0,1	110	$GalNAc_3$-19a	A_d
	0,3	88		
	1	52		
	3	25		

Các mức traxaminaza của gan, tổng bilirubin, BUN, và thể trọng cũng được đo bằng cách sử dụng các cách thức chuẩn. Các giá trị trung bình cho mỗi nhóm điều trị được thể hiện trong Bảng 69 dưới đây.

Bảng 69

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bilirubin (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Thể trọng (% cơ sở)	Cụm $GalNAc_3$	M
Nước muối	n/a	19	39	0,17	26	118	n/a	/a
655861	0,1	25	47	0,17	27	114	$GalNAc_3$-1a	d
	0,3	29	56	0,15	27	118		
	1	20	32	0,14	24	112		
	3	27	54	0,14	24	115		
661161	0,1	35	83	0,13	24	113	$GalNAc_3$-3a	d
	0,3	42	61	0,15	23	117		
	1	34	60	0,18	22	116		
	3	29	52	0,13	25	117		
666881	0,1	30	51	0,15	23	118	$GalNAc_3$-10a	

	0,3	49	82	0,16	25	119		d
	1	23	45	0,14	24	117		
	3	20	38	0,15	21	112		
666981	0,1	21	41	0,14	22	113	$GalNAc_3$-7a	d
	0,3	29	49	0,16	24	112		
	1	19	34	0,15	22	111		
	3	77	78	0,18	25	115		
670061	0,1	20	63	0,18	24	111	$GalNAc_3$-13a	d
	0,3	20	57	0,15	21	115		
	1	20	35	0,14	20	115		
	3	27	42	0,12	20	116		
677842	0,1	20	38	0,17	24	114	$GalNAc_3$-20a	d
	0,3	31	46	0,17	21	117		
	1	22	34	0,15	21	119		
	3	41	57	0,14	23	118		

Ví dụ 86: Sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích TTR chứa cụm $GalNAc_3$

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 70 dưới đây được thử trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng về việc ức chế đối nghĩa transthyretin của người (TTR) chuột nhắt chuyển gen có gen TTR của người.

Điều trị bệnh

Mỗi con chuột nhắt chuyển gen TTR tám tuần tuổi được tiêm dưới da một lần mỗi tuần trong ba tuần, tổng cộng ba liều, bằng oligonucleotit và liều lượng được liệt kê trong các bảng dưới đây hoặc bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng. Việc lấy máu ở đuôi được thực hiện tại các thời điểm khác nhau trong toàn bộ thử nghiệm, và lượngprotein của TTR trong huyết tương, ALT, và AST được đo và ghi lại trong các bảng từ 72 đến 74. Sau khi động vật bị giết, lượng ALT, AST, và TTR của người trong huyết tương được đo, như là thể trọng, trọng lượng cơ quan, và các lượng ARN thông tin của TTR của người ở gan. Lượng protein của

TTR được đo bằng cách sử dụng thiết bị phân tích lâm sàng (AU480, Beckman Coulter, CA). PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) được sử dụng theo các quy trình chuẩn để xác định các lượng ARN thông tin của TTR của người ở gan. Các kết quả được thể hiện trong các bảng 71 đến 74 là các giá trị trung bình cho mỗi nhóm thử nghiệm. Các lượng ARN thông tin là các giá trị trung bình so với giá trị trung bình đối với nhóm PBS. Lượng protein trong huyết tương là các giá trị trung bình so với giá trị trung bình đối với nhóm PBS tại giá trị cơ quan. Thể trọng là phần trăm trung bình khối lượng thay đổi từ giá trị cơ sở cho đến khi giết với mỗi nhóm cá thể điều trị. Khối lượng cơ quan thể hiện được chuẩn tắc hóa với thể trọng của động vật, và giá trị trung bình được chuẩn tắc hóa khối lượng cơ quan cho mỗi nhóm điều trị được đưa ra so với giá trị trung bình được chuẩn tắc hóa khối lượng cơ quan đối với nhóm PBS.

Trong các bảng 71-74, "BL" biểu thị cơ sở, các phép đo được lấy ngay trước liều lượng thứ nhất. Như được minh họa trong các bảng 71 và 72, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm mức độ biểu hiện TTR theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng. Các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc hiệu nghiệm hơn so với oligonucleotit gốc không có thể tiếp hợp GalNAc (ISIS 420915). Hơn thế nữa, các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc và liên kết giữa nucleosit PS/PO hỗn hợp cũng hiệu nghiệm hơn so với oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc và liên kết PS đầy đủ.

Bảng 70

Các oligonucleotit hướng đích TTR của người

ISIS số	Trình tự 5' đến 3'	Các liên kết	Cụm GalNAc	CM	SEQ ID No.
420915	$T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}G_{es}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}$ $A_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS	n/a	n/a	41
660261	$T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}G_{es}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}$ $A_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_{3}$-**1**$_{a}$	PS	GalNAc$_{3}$-**1**a	A_{d}	42
682883	GalNAc$_{3}$-**3**$_{a-o'}$$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_{3}$-3a	PO	74
682884	GalNAc$_{3}$-7$_{a-o'}$$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$	PS/PO	GalNAc$_{3}$-7a	PO	41

	$T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$				
682885	GalNAc$_3$-10$_{\mathbf{a\text{-}o}}$,$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-10a	PO	41
682886	GalNAc$_3$-13$_{\mathbf{a\text{-}o}}$,$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-13a	PO	41
684057	$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}$ $A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{eo}\mathbf{A_{do}}$-GalNAc$_3$-**19$_a$**	PS/PO	GalNAc$_3$-19a	A_d	42

Chú thích cho Bảng 72 có thể được thấy trong Ví dụ 74. Cấu trúc của GalNAc$_3$-**1** được thể hiện trong Ví dụ 9. Cấu trúc của GalNAc$_3$-3$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 39. Cấu trúc của GalNAc$_3$-7$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 48. Cấu trúc của GalNAc$_3$-10$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 46. Cấu trúc của GalNAc$_3$-13$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 62. Cấu trúc của GalNAc$_3$-**19**$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 70.

Bảng 71

Vệc ức chế đối nghĩa của TTR của người *in vivo*

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Lượng ARN thông tin của TTR (% PBS)	Lượng protein của TTR trong huyết tương (% PBS)	Cụm GalNAc	CM	SEQ ID No.
PBS	n/a	100	100	n/a	n/a	
420915	6	99	95	n/a	n/a	41
	20	48	65			
	60	18	28			
660261	0,6	113	87	GalNAc$_3$-**1**a	A_d	42
	2	40	56			
	6	20	27			
	20	9	11			

Bảng 72

Việc ức chế đối nghĩa TTR của người *in vivo*

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Lượng ARN thông tin của TTR (% PBS)	Lượng protein của TTR trong huyết tương (% PBS tại BL)				Cụm GalNAc	CM	SEQ ID No.
			BL	Ngày thứ 3	Ngày thứ 10	Ngày thứ 17 (Sau khi sac)			
PBS	n/a	100	100	96	90	114	n/a	n/a	
420915	6	74	106	86	76	83	n/a	n/a	41
	20	43	102	66	61	58			
	60	24	92	43	29	32			
682883	0,6	60	88	73	63	68	$GalNAc_{3}$-3a	PO	41
	2	18	75	38	23	23			
	6	10	80	35	11	9			
682884	0,6	56	88	78	63	67	$GalNAc_{3}$-7a	PO	41
	2	19	76	44	25	23			
	6	15	82	35	21	24			
682885	0,6	60	92	77	68	76	$GalNAc_{3}$-10a	PO	41
	2	22	93	58	32	32			
	6	17	85	37	25	20			
682886	0,6	57	91	70	64	69	$GalNAc_{3}$-13a	PO	41
	2	21	89	50	31	30			
	6	18	102	41	24	27			
684057	0,6	53	80	69	56	62	$GalNAc_{3}$-19a	A_d	42
	2	21	92	55	34	30			
	6	11	82	50	18	13			

Bảng 73

Các lượng traxaminaza, thay đổi thể trọng, và trọng lượng cơ quan tương ứng

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ALT (U/L)				AST (U/L)				Thân (% BL)	Gan (% PBS)	Lá lách (% PBS)	Thân (% PBS)	SEQ ID No.
		BL	Ngày thứ 3	Day 10	Day 17	BL	Ngày thứ 3	Ngày thứ 10	Ngày thứ 17					
PBS	n/a	33	34	33	24	58	62	67	52	105	100	100	100	n/a
420915	6	34	33	27	21	64	59	73	47	115	99	89	91	41
	20	34	30	28	19	64	54	56	42	111	97	83	89	
	60	34	35	31	24	61	58	71	58	113	102	98	95	
660261	0,6	33	38	28	26	70	71	63	59	111	96	99	92	42
	2	29	32	31	34	61	60	68	61	118	100	92	90	
	6	29	29	28	34	58	59	70	90	114	99	97	95	
	20	33	32	28	33	64	54	68	95	114	101	106	92	

Bảng 74

Các lượng traxaminaza, thay đổi thể trọng, và trọng lượng cơ quan tương ứng

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ALT (U/L)				AST (U/L)				Thân (% BL)	Gan (% PBS)	Lá lách (% PBS)	Thận (% PBS)	SEQ ID No.
		BL	Ngày thứ 3	Day 10	Day 17	BL	Ngày thứ 3	Ngàu thứ 10	Ngày thứ 17					
PBS	n/a	32	34	37	41	62	78	76	77	104	100	100	100	n/a
420915	6	32	30	34	34	61	71	72	66	102	103	102	105	41
	20	41	34	37	33	80	76	63	54	106	107	135	101	
	60	36	30	32	34	58	81	57	60	106	105	104	99	
682883	0,6	32	35	38	40	53	81	74	76	104	101	112	95	41
	2	38	39	42	43	71	84	70	77	107	98	116	99	

	6	35	35	41	38	62	79	103	65	105	103	143	97	
682884	0,6	33	32	35	34	70	74	75	67	101	100	130	99	41
	2	31	32	38	38	63	77	66	55	104	103	122	100	
	6	38	32	36	34	65	85	80	62	99	105	129	95	
682885	0,6	39	26	37	35	63	63	77	59	100	109	109	112	41
	2	30	26	38	40	54	56	71	72	102	98	111	102	
	6	27	27	34	35	46	52	56	64	102	98	113	96	
682886	0,6	30	40	34	36	58	87	54	61	104	99	120	101	41
	2	27	26	34	36	51	55	55	69	103	91	105	92	
	6	40	28	34	37	107	54	61	69	109	100	102	99	
684057	0,6	35	26	33	39	56	51	51	69	104	99	110	102	42
	2	33	32	31	40	54	57	56	87	103	100	112	97	
	6	39	33	35	40	67	52	55	92	98	104	121	108	

Ví dụ 87: Khoảng thời gian hoạt động *in vivo* bằng một liều lượng của các oligonucleotit hướng đích TTR chứa cụm $GalNAc_3$

Các ISIS số 420915 và 660261 (xem Bảng 70) được thử trong nghiên cứu một liều về khoảng thời gian hoạt động ở chuột nhắt. Các ISIS số 420915, 682883, và 682885 (xem Bảng 70) còn được thử trong nghiên cứu một liều về khoảng thời gian hoạt động ở chuột nhắt.

Điều trị bệnh

Mỗi con chuột đực chuyển gen có TTR của người được tiêm dưới da một lần bằng 100mg/kg ISIS số 420915 hoặc 13,5mg/kg ISIS số 660261. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Việc lấy máu ở đuôi được thực hiện trước khi dùng liều để xác định cơ sở và vào ngày thứ 3, 7, 10, 17, 24, và 39 sau khi dùng liều. Lượng protein của TTR trong huyết tương được đo như được mô tả trong Ví dụ 86. Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng TTR trong huyết tương cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa với lượng cơ sở.

Bảng 75

Lượng protein của TTR trong huyết tương

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Mốc thời gian (ngày sau khi dùng liều)	TTR (% cơ sở)	Cụm $GalNAc_3$	CM	SEQ ID No.
420915	100	3	30	n/a	n/a	41
		7	23			
		10	35			
		17	53			
		24	75			
		39	100			
660261	13,5	3	27	$GalNAc_3$-1a	A_d	42
		7	21			
		10	22			
		17	36			
		24	48			
		39	69			

Điều trị bệnh

Mỗi con chuột cái chuyển gen có TTR của người được tiêm dưới da một lần bằng 100mg/kg ISIS số 420915, 10,0mg/kg ISIS số 682883, hoặc 10,0mg/kg 682885. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Việc lấy máu dưới tai được thực hiện trước khi dùng liều để xác định cơ sở và vào ngày thứ 3, 7, 10, 17, 24, và 39 sau khi dùng liều. Lượng protein của TTR trong huyết tương được đo như được mô tả trong Ví dụ 86. Các kết quả dưới đây được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng TTR trong huyết tương cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa với lượng cơ sở.

Bảng 76

Lượng protein của TTR trong huyết tương

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Mốc thời gian (ngày sau khi dùng liều)	TTR (% cơ sở)	Cụm $GalNAc_3$	CM	SEQ ID No.
420915	100	3	48	n/a	n/a	41
		7	48			
		10	48			
		17	66			
		31	80			
682883	10,0	3	45	$GalNAc_3$-3a	PO	41
		7	37			
		10	38			
		17	42			
		31	65			
682885	10,0	3	40	$GalNAc_3$-10a	PO	41
		7	33			
		10	34			
		17	40			
		31	64			

Các kết quả trong các bảng 75 và 76 cho thấy rằng các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc có hiệu lực lớn hơn cùng với khoảng thời gian hoạt động lâu hơn so với oligonucleotit gốc oligonucleotit không có thể tiếp hợp (ISIS 420915).

Ví dụ 88: Sự điều biến cắt ghép *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích SMN chứa thể tiếp hợp GalNAc3

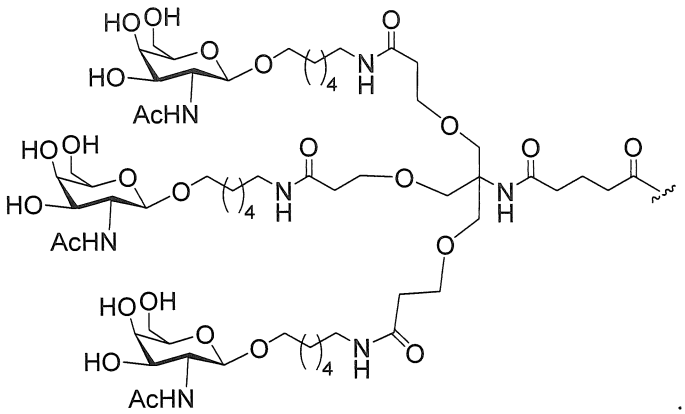
Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 77 được thử về điều biến cắt ghép về sự sống sót của nơron thần kinh (SMN) của người ở chuột nhắt.

Bảng 77

Các ASO cải biến hướng đích SMN

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm GalNAc$_3$	CM	SEQ ID No.
387954	$A_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{es}A_{es}A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}G_{e}$	n/a	n/a	43
699819	GalNAc$_3$-7$_{a}$-$_{o}$'$A_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{es}A_{es}A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}G_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	43
699821	GalNAc$_3$-7$_{a}$-$_{o}$'$A_{es}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}A_{eo}T_{eo}A_{eo}A_{eo}T_{eo}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{es}G_{es}G_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	43
700000	$A_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{es}A_{es}A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}G_{eo}\mathbf{A_{do}}$'-GalNAc$_3$-**1**$_{a}$	GalNAc$_3$-**1**a	A_d	44
703421	X-ATT^{m}CA^{m}CTTT^{m}CATAATG^{m}CTGG	n/a	n/a	43
703422	GalNAc$_3$-7$_{b}$-X-ATT^{m}CA^{m}CTTT^{m}CATAATG^{m}CTGG	GalNAc$_3$-7b	n/a	43

Cấu trúc của GalNAc$_3$-7$_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 48. "X" biểu thị 5' amin bậc nhất đã được tạo ra bởi Gene Tools (Philomath, OR), và GalNAc$_3$-7$_b$ biểu thị cấu trúc của GalNAc$_3$-7$_a$ không có phần nhóm liên kết –NH-C$_6$-O như được thể hiện dưới đây:



Các ISIS số 703421 và 703422 là các oligonucleotit morphlino, trong đó mỗi nucleotit trong số hai oligonucleotit là nucleotit morpholino.

Điều trị bệnh

Chuột nhắt chuyển gen có SMN của người sáu tuần tuổi được tiêm dưới da một lần với oligonucleotit liệt kê trong Bảng 78 hoặc bằng nước muối. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 2 con đực và 2 con cái. Chuột nhắt bị giết 3 ngày sau khi dùng liều để xác định các

lượng ARN thông tin của SMN của người ở gan cả có và không có exon 7 bằng cách sử dụng PCR thời gian thực theo các cách thức chuẩn. Toàn bộ ARN được đo bằng cách sử dụng chất phản ứng Ribogreen. Các lượng ARN thông tin của SMN được chuẩn tắc hóa với tổng ARN thông tin, và còn được chuẩn tắc hóa với các giá trị trung bình với nhóm điều trị bằng nước muối. Tỷ lệ trung bình của ARN thông tin của SMN bao gồm exon 7 với ARN thông tin của SMN thiếu exon 7 được thể hiện trong Bảng 78. Các kết quả cho thấy rằng các oligonucleotit cải biến hòan toàn mà điều biến cắt ghép và chứa thể tiếp hợp GalNAc hiệu lực trong việc làm thay đổi cắt ghép ở gan cao hơn đáng kể so với các oligonucleotit gốc không có thể tiếp hợp GlaNAc. Hơn thế nữa, xu hướng này được duy trì trong nhiều hóa học biến đổi, bao gồm các oligonucleotit cải biến 2'-MOE và morpholino.

Bảng 78

Tác động của các oligonucleotit hướng đích SMN của người *in vivo*

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	+Exon 7 / -Exon 7	Cụm $GalNAc_3$	CM	SEQ ID No.
Nước muối	n/a	1,00	n/a	n/a	n/a
387954	32	1,65	n/a	n/a	43
387954	288	5,00	n/a	n/a	43
699819	32	7,84	$GalNAc_3$-7a	PO	43
699821	32	7,22	$GalNAc_3$-7a	PO	43
700000	32	6,91	$GalNAc_3$-**1**a	A_d	44
703421	32	1,27	n/a	n/a	43
703422	32	4,12	$GalNAc_3$-7b	n/a	43

Ví dụ 89: Sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích Apolipoprotein A (Apo(a)) chứa thể tiếp hợp GalNAc3

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 79 dưới đây được thử trong nghiên cứu về mức độ ức chế phụ thuộc liều lượng Apo(a) ở chuột nhắt chuyển gen.

Bảng 79

Các ASO cải biến hướng đích Apo(a)

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm $GalNAc_3$	CM	SEQ ID No.
494372	$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	53
681257	$GalNAc_{3}\text{-}7_{a\text{-}o}$,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_{3}$-7a	PO	53

Cấu trúc của $GalNAc_{3}\text{-}7_{a}$ được thể hiện trong Ví dụ 48.

Điều trị bệnh

Mỗi con chuột cái C57BL/6 tám tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được tiêm dưới da một lần mỗi tuần với liều lượng được thể hiện dưới đây, tổng cộng sáu liều lượng, bằng oligonucleotit liệt kê trong Bảng 79 hoặc bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 3 đến 4 động vật. Việc lấy máu dưới tai được thực hiện ngày trước khi dùng liều lượng thứ nhất và hằng tuần sau mỗi khi dùng liều để xác định lượng protein của Apo(a) huyết tương. Chuột nhắt bị giết hai ngày sau khi dùng liều cuối cùng. các lượng ARN thông tin của Apo(a) ở gan được xác định bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) theo các cách thức chuẩn. Lượng protein của Apo(a) trong huyết tương được xác định bằng cách sử dụng ELISA, và các kết quả của lượng traxaminaza của gan được xác định. ARN thông tin và lượng protein trong huyết tương trong Bảng 80 được đưa ra là phần trăm trung bình của nhóm điều trị bệnh so với nhóm điều trị bằng PBS. Lượng protein trong huyết tương còn được chuẩn tắc hóa với giá trị cơ sở (BL) với nhóm PBS. Các lượng traxaminaza và thể trọng trung bình tuyệt đối (% so với giá trị cơ sở trung bình) được thể hiện trong Bảng 81.

Như được thể hiện trong Bảng 80, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit làm giảm lượng ARN thông tin của Apo(a) ở gan và lượng protein trong huyết tương theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng. Hơn thế nữa, oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc có hiệu lực cao hơn đáng kể cùng với khoảng thời gian hoạt động lâu hơn so với oligonucleotit gốc không có thể tiếp hợp GalNAc. Như được minh họa trong Bảng 81,

các lượng traxaminaza và thể trọng không bị thay đổi bởi các oligonucleotit, cho thấy rằng các oligonucleotit được dung nạp tốt.

Bảng 80

Lượng ARN thông tin của Apo(a) ở gan và protein trong huyết tương

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Lượng ARN thông tin của Apo(a) (% PBS)	Lượng protein của Apo(a) trong huyết tương (% PBS)						
			BL	Tuần thứ 1	Tuần thứ 2	Tuần thứ 3	Tuần thứ 4	Tuần thứ 5	Tuần thứ 6
PBS	n/a	100	100	120	119	113	88	121	97
494372	3	80	84	89	91	98	87	87	79
	10	30	87	72	76	71	57	59	46
	30	5	92	54	28	10	7	9	7
681257	0,3	75	79	76	89	98	71	94	78
	1	19	79	88	66	60	54	32	24
	3	2	82	52	17	7	4	6	5
	10	2	79	17	6	3	2	4	5

Bảng 81

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Thể trọng (% cơ sở)
PBS	n/a	37	54	103
494372	3	28	68	106
	10	22	55	102
	30	19	48	103
681257	0,3	30	80	104
	1	26	47	105
	3	29	62	102
	10	21	52	107

Ví dụ 90: Sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích TTR chứa $GalNAc_3$ chùm

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 82 dưới đây được thử trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng đối với gen đối nghĩa việc ức chế transthyretin của người (TTR) trong chuột nhắt chuyển gen có gen TTR của người.

Điều trị bệnh

Mỗi con chuột nhắt chuyển gen có TTR được tiêm dưới da một lần mỗi tuần trong ba tuần, tổng cộng ba liều, bằng oligonucleotit và liều lượng liệt kê trong Bảng 83 hoặc bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Trước khi dùng liều lượng thứ nhất, việc lấy máu ở đuôi được thực hiện để xác định lượng protein của TTR trong huyết tương tại thời điểm gốc (BL). Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng. Lượng protein của TTR được đo bằng cách sử dụng thiết bị phân tích lâm sàng (AU480, Beckman Coulter, CA). PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) được sử dụng theo các cách thức chuẩn để xác định các lượng ARN thông tin của TTR của người ở gan. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 83 là các giá trị trung bình cho mỗi nhóm thử nghiệm. Các lượng ARN thông tin là các giá trị trung bình so với trung bình đối với nhóm PBS. Lượng protein trong huyết tương là các giá trị trung bình so với giá trị trung bình đối với nhóm PBS tại giá trị cơ sở. "BL" biểu thị giá trị cơ sở, các phép đo được lấy ngay trước khi dùng liều lượng thứ nhất. Như được minh họa trong Bảng 83, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm mức độ biểu hiện TTR theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng. Các thể tiếp hợp chứa GalNAc có hiệu lực lớn hơn so với oligonucleotit gốc không có thể tiếp hợp GalNAc (ISIS 420915), và các gốc phân cắt chứa phosphođieste hoặc đeoxyađenosin thể hiện hiệu lực cao hơn đáng kể so với oligonucleotit gốc không có thể tiếp hợp (xem các ISIS số 682883 và 666943 vs 420915 và xem các Ví dụ 86 và 87).

Bảng 82

Các oligonucleotit hướng đích TTR của người

ISIS số	Trình tự 5' đến 3'	Các liên kết	Cụm GalNAc	CM	SEQ ID No.
420915	$T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}G_{es}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}$ $A_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS	n/a	n/a	41
682883	GalNAc$_3$-**3**$_{\mathbf{a\text{-}o}}$,$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-3a	PO	41
666943	GalNAc$_3$-**3**$_{\mathbf{a\text{-}o}}$,**A**$_{\mathbf{do}}$$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}$ $A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-3a	A_d	45
682887	GalNAc$_3$-7$_{\mathbf{a\text{-}o}}$,**A**$_{\mathbf{do}}$$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-7a	A_d	45
682888	GalNAc$_3$-10$_{\mathbf{a\text{-}o}}$,**A**$_{\mathbf{do}}$$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-10a	A_d	45
682889	GalNAc$_3$-13$_{\mathbf{a\text{-}o}}$,**A**$_{\mathbf{do}}$$T_{es}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}G_{eo}G_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}A_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	PS/PO	GalNAc$_3$-13a	A_d	45

Chú thích trong Bảng 82 có thể được thấy trong Ví dụ 74. Cấu trúc của GalNAc$_3$-3$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 39. Cấu trúc của GalNAc$_3$-7$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 48. Cấu trúc của GalNAc$_3$-10$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 46. Cấu trúc của GalNAc$_3$-13$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 62.

Bảng 83

Việc ức chế đối nghĩa của TTR của người *in vivo*

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Lượng ARN thông tin của TTR (% PBS)	Lượng protein của TTR (% BL)	Cụm GalNAc	CM
PBS	n/a	100	124	n/a	n/a
420915	6	69	114	n/a	n/a
	20	71	86		
	60	21	36		

682883	0,6	61	73	$GalNAc_3$-3a	PO
	2	23	36		
	6	18	23		
666943	0,6	74	93	$GalNAc_3$-3a	A_d
	2	33	57		
	6	17	22		
682887	0,6	60	97	$GalNAc_3$-7a	A_d
	2	36	49		
	6	12	19		
682888	0,6	65	92	$GalNAc_3$-10a	A_d
	2	32	46		
	6	17	22		
682889	0,6	72	74	$GalNAc_3$-13a	A_d
	2	38	45		
	6	16	18		

Ví dụ 91: Sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích Factor VII chứa thể tiếp hợp GalNAc3 trong các động vật linh trưởng không phải là người

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 84 dưới đây được thử trong nghiên cứu không cuối cùng liều lượng leo thang về việc ức chế đối nghĩa yếu tố VII ở khỉ.

Điều trị bệnh

Mỗi con khỉ Non-naïve được tiêm dưới da vào ngày thứ 0, 15, và 29 bằng các liều lượng oligonucleotit leo thang được liệt kê trong Bảng 84 hoặc bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 con đực và 1 con cái. Trước khi dùng liều lượng thứ nhất và tại các thời điểm khác nhau về sau, máu rút ra được thực hiện để xác định lượng protein của Factor VII trong huyết tương. lượng protein của Factor VII được đo theo phương pháp ELISA. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 85 là các giá trị trung bình cho mỗi nhóm điều trị so với giá trị trung bình đối với nhóm PBS tại thời điểm gốc (BL), các phép đo được thực hiện ngay trước khi dùng liều lượng thứ nhất. Như được minh họa trong Bảng 85, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm mức độ biểu hiện Factor VII theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng, và oligonucleotit chứa thể tiếp hợp

GalNAc có hiệu lực lớn hơn đáng kể ở khỉ so với oligonucleotit không có thể tiếp hợp GalNAc.

Bảng 84

Các oligonucleotit hướng đích Yếu tố VII

ISIS số	Trình tự 5' đến 3'	Các liên kết	Cụm GalNAc	CM	SEQ ID No.
407935	$A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{e}$	PS	n/a	n/a	46
686892	$GalNAc_{3}\text{-}10_{a\text{-}o}$,$A_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}$ $A_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}G_{es}A_{e}$	PS	$GalNAc_{3}\text{-}10a$	PO	46

Chú thích trong Bảng 84 có thể được thấy trong Ví dụ 74. Cấu trúc của $GalNAc_{3}\text{-}10_{a}$ được thể hiện trong Ví dụ 46.

Bảng 85

Lượng protein của Yếu tố VII trong huyết tương

ISIS số	Ngày	Liều lượng (mg/kg)	Yếu tố VII (% BL)
407935	0	n/a	100
	15	10	87
	22	n/a	92
	29	30	77
	36	n/a	46
	43	n/a	43
686892	0	3	100
	15	10	56
	22	n/a	29
	29	30	19
	36	n/a	15
	43	n/a	11

Ví dụ 92: Sự ức chế đối nghĩa trong các tế bào gan ban đầu bằng các oligonucleotit đối nghĩa hướng đích Apo-CIII chứa thể tiếp hợp GalNAc3

Các tế bào gan ban đầu của chuột được gieo mầm trong đĩa loại 96 lỗ ở 15.000 tế

bào cho mỗi lỗ, và các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 86, chuột có ApoC-III hướng đích, bổ sung ở 0,46, 1,37, 4,12, hoặc 12,35, 37,04, 111,11, hoặc 333,33nM hoặc 1,00μM. Sau khi ủ với các oligonucleotit trong thời gian 24 giờ, các tế bào được phân giải và toàn bộ ARN được tinh chế bằng cách sử dụng RNeasy (do Qiagen cung cấp). các lượng ARN thông tin của ApoC-III được xác định bằng cách sử dụng PCR thời gian thực và chất phản ứng định lượng ARN RIBOGREEN® (Molecular Probes, Inc.) theo các cách thức chuẩn. Các giá trị IC_{50} được xác định bằng cách sử dụng phần mềm Prism 4 (GraphPad). Các kết quả cho thấy rằng bất kể mặc dù gốc phân cắt được là phosphođieste hoặc phosphođieste-đã liên kết đeoxyađensin, song các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc có hiệu lực lớn hơn đáng kể so với oligonucleotit gốc không có thể tiếp hợp.

Bảng 86

Việc ức chế sự biểu hiện APOC-III của chuột trong tế bào gan ban đầu của chuột

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	CM	IC_{50} (nM)	SEQ ID No.
440670	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	n/a	13,20	47
661180	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{eo}\mathbf{A_{do}}$'-GalNAc$_3$-**1$_a$**	A_d	1,40	48
680771	GalNAc$_3$-**3$_{a-o}$**,$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	0,70	47
680772	GalNAc$_3$-7$_{a-o}$,$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	1,70	47
680773	GalNAc$_3$-10$_{a-o}$,$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	2,00	47
680774	GalNAc$_3$-13$_{a-o}$,$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	1,50	47
681272	GalNAc$_3$-**3$_{a-o}$**,$^{m}C_{es}A_{eo}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{eo}$ $A_{eo}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	< 0,46	47
681273	GalNAc$_3$-**3$_{a-o}$**-**A$_{do}$**$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}$ $^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	A_d	1,10	49
683733	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{eo}\mathbf{A_{do}}$'-GalNAc$_3$-**19$_a$**	A_d	2,50	48

Cấu trúc của GalNAc$_3$-**1**$_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 9, GalNAc$_3$-3$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 39, GalNAc$_3$-7$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 48, GalNAc$_3$-10$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 46, GalNAc$_3$-13$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 62, và GalNAc$_3$-**19**$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 70.

Ví dụ 93: Sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích SRB-1 chứa cánh hỗn hợp và thể tiếp hợp 5'-GalNAc$_3$

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 87 được thử trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng đối với việc ức chế đối nghĩa của SRB-1 ở chuột nhắt.

Bảng 87

Các ASO cải biến hướng đích SRB-1

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm GalNAc$_3$	CM	SEQ ID No.
449093	$T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\ A_{ds}T_{ds}\ G_{ds}\ A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	n/a	50
699806	GalNAc$_3$-**3**$_{a-o}$-$T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\ A_{ds}T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}\ T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-3a	PO	50
699807	GalNAc$_3$-7$_{a-o}$-$T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\ A_{ds}T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}\ T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-7a	PO	50
699809	GalNAc$_3$-7$_{a-o}$, $T_{ks}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\ A_{ds}T_{ds}\ G_{ds}\ A_{ds}{}^{m}C_{ds}\ T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	50
699811	GalNAc$_3$-7$_{a-o}$-$T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\ A_{ds}T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}\ T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-7a	PO	50
699813	GalNAc$_3$-7$_{a-o}$-$T_{ks}T_{ds}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\ A_{ds}T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}\ T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-7a	PO	50
699815	GalNAc$_3$-7$_{a-o}$-$T_{es}T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}\ A_{ds}T_{ds}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}\ T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{ks}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	50

Cấu trúc của GalNAc$_3$-3$_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 39, và cấu trúc của GalNAc$_3$-7a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 48. Các chỉ số dưới: "e" biểu thị nucleosit cải biến 2'-MOE; "d" biểu thị β-D-2'-đeoxyribonucleosit; "k" biểu thị 6'-(*S*)-CH$_3$ nucleosit hai vòng (cEt); "s" biểu thị liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit (PS); "o" biểu thị các liên kết phosphođieste giữa nucleosit (PO). Trị số trên "m" biểu thị các 5-metylxytosin.

Điều trị bệnh

Chuột nhắt C57BL/6 sáu đến tám tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor,

ME) được tiêm dưới da một lần với liều lượng được thể hiện dưới đây với oligonucleotit liệt kê trong Bảng 87 hoặc bằng nước muối. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng. Lượng ARN thông tin của SRB-1 ở gan được đo bằng cách sử dụng PCR thời gian thực. Lượng ARN thông tin của SRB-1 được chuẩn tắc hóa với các lượng ARN thông tin của xyclophilin theo các cách thức chuẩn. Các kết quả được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng ARN thông tin của SRB-1 cho mỗi nhóm điều trị so với nhóm nước muối đối chứng. Như được minh họa trong Bảng 88, việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của SRB-1 theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng, và các oligonucleotit gapmer chứa thể tiếp hợp GalNAc và có các cánh hoặc là cEt đầy đủ hoặc đường cải biến hỗn hợp có hiệu lực lớn hơn đáng kể so với oligonucleotit gốc không có thể tiếp hợp và chứa các cánh được cải biến cEt đầy đủ.

Thể trọng, traxaminaza ở gan, tổng bilirubin, và BUN cũng được đo, và các giá trị trung bình cho mỗi nhóm điều trị được thể hiện trong Bảng 88. Thể trọng được thể hiện bằng phần trăm trung bình thể trọng so với cơ sở thể trọng (% BL) đo được ngay trước khi dùng liều lượng oligonucleotit.

Bảng 88

Lượng ARN thông tin, ALT, AST, BUN, và tổng bilirubin của SRB-1 và thể trọng

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Lượng ARN thông tin của SRB-1 (% PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bil	BUN	Thể trọng (% BL)
PBS	n/a	100	31	84	0,15	28	102
449093	1	111	18	48	0,17	31	104
	3	94	20	43	0,15	26	103
	10	36	19	50	0,12	29	104
699806	0,1	114	23	58	0,13	26	107
	0,3	59	21	45	0,12	27	108
	1	25	30	61	0,12	30	104
699807	0,1	121	19	41	0,14	25	100
	0,3	73	23	56	0,13	26	105

	1	24	22	69	0,14	25	102
699809	0,1	125	23	57	0,14	26	104
	0,3	70	20	49	0,10	25	105
	1	33	34	62	0,17	25	107
699811	0,1	123	48	77	0,14	24	106
	0,3	94	20	45	0,13	25	101
	1	66	57	104	0,14	24	107
699813	0,1	95	20	58	0,13	28	104
	0,3	98	22	61	0,17	28	105
	1	49	19	47	0,11	27	106
699815	0,1	93	30	79	0,17	25	105
	0,3	64	30	61	0,12	26	105
	1	24	18	41	0,14	25	106

Ví dụ 94: Sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích SRB-1 chứa 2'-đường các cải biến và thể tiếp hợp 5'-GalNAc$_3$

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 89 được thử trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng đối với việc ức chế đối nghĩa của SRB-1 ở chuột nhắt.

Bảng 89

Các ASO cải biến hướng đích SRB-1

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm GalNAc$_3$	CM	SEQ ID No.
353382	$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	n/a	n/a	28
700989	$G_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{ms}C_{ms}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}U_{ms}C_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{m}$	n/a	n/a	51
666904	GalNAc$_3$-$\mathbf{3_{a-o}}$,$G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{e}$	GalNAc$_3$-3a	PO	28
700991	GalNAc$_3$-7_{a-o},$G_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{ms}C_{ms}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}U_{ms}C_{ms}C_{ms}U_{ms}U_{m}$	GalNAc$_3$-7a	PO	51

Ký hiệu "m" biểu thị 2'-O-metyl nucleosit được cải biến. Xem Ví dụ 74 với chú thích toàn bộ bảng. Cấu trúc của GalNAc$_3$-3$_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 39, và cấu trúc của GalNAc$_3$-7a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 48.

Điều trị bệnh

Nghiên cứu được hoàn thành bằng cách sử dụng cách được bộc lộ trong Ví dụ 93. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 90 dưới đây và cho thấy rằng cả cải biến 2'-MOE và 2'-OMe chứa thể tiếp hợp GalNAc có hiệu lực lớn hơn đáng kể so với các oligonucleotit gốc tương ứng không có thể tiếp hợp. Kết quả của các phép đo thể trọng, traxaminaza ở gan, tổng bilirubin, và BUN chỉ ra rằng tất cả các hợp chất chống chịu tốt.

Bảng 90

ARN thông tin của SRB-1

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ARN thông tin của SRB-1 (% PBS)
PBS	n/a	100
353382	5	116
	15	58
	45	27
700989	5	120
	15	92
	45	46
666904	1	98
	3	45
	10	17
700991	1	118
	3	63
	10	14

Ví dụ 95: Sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích SRB-1 chứa các nucleosit hai vòng và thể tiếp hợp 5'-$GalNAc_3$

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 91 được thử nghiệm trong nghiên cứu sự phụ thuộc vào liều lượng đối với việc ức chế đối nghĩa của SRB-1 ở chuột nhắt.

Bảng 91

Các ASO cải biến hướng đích SRB-1

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm $GalNAc_3$	CM	SEQ ID No
440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	n/a	22
666905	$GalNAc_3$-$\mathbf{3_{a-o}}$,$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_3$-3_a	PO	22
699782	$GalNAc_3$-7_{a-o},$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	$GalNAc_3$-7_a	PO	22
699783	$GalNAc_3$-$\mathbf{3_{a-o}}$,$T_{ls}{}^{m}C_{ls}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ls}{}^{m}C_{l}$	$GalNAc_3$-3_a	PO	22
653621	$T_{ls}{}^{m}C_{ls}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ls}{}^{m}C_{lo}\mathbf{A_{do}}$'-$GalNAc_3$-$\mathbf{1_a}$	$GalNAc_3$-$\mathbf{1}_a$	A_d	23
439879	$T_{gs}{}^{m}C_{gs}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{d}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{gs}{}^{m}C_{g}$	n/a	n/a	22
699789	$GalNAc_3$-$\mathbf{3_{a-o}}$,$T_{gs}{}^{m}C_{gs}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{d}\ G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{gs}{}^{m}C_{g}$	$GalNAc_3$-3_a	PO	22

Ký hiệu "g" biểu thị flo-HNA nucleosit, ký hiệu "l" biểu thị nucleosit đã khóa chứa cầu 2'-O-CH_2-4'. Xem ví dụ 74 bảng chú thích cho các chữ viết tắt khác. Cấu trúc của $GalNAc_3$-$\mathbf{1}_a$ được thể hiện trên đây trong Ví dụ 9, cấu trúc của $GalNAc_3$-3_a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 39, và cấu trúc của $GalNAc_3$-7a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 48.

Điều trị bệnh

Nghiên cứu được hoàn thành bằng cách sử dụng cách được bộc lộ trong Ví dụ 93. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 92 dưới đây và cho thấy rằng các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc và nucleosit hai vòng các cải biến khác nhau hiệu nghiệm hơn đáng kể so với gốc oligonucleotit không có thể tiếp hợp và chứa biến thể nucleosit hai vòng. Hơn thế nữa, oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc và flo-HNA các cải biến hiệu nghiệm hơn đáng kể so với oligonucleotit gốc không có thể tiếp hợp và chứa biến thể flo-HNA. Kết quả của các phép đo thể trọng, traxaminaza ở gan, tổng bilirubin, và BUN chỉ ra rằng tất cả các hợp chất chống chịu tốt.

Bảng 92

Lượng ARN thông tin, ALT, AST, BUN, và tổng bilirubin của SRB-1 và thể trọng

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	ARN thông tin của SRB-1 (% PBS)
PBS	n/a	100
440762	1	104
	3	65

	10	35
666905	0,1	105
	0,3	56
	1	18
699782	0,1	93
	0,3	63
	1	15
699783	0,1	105
	0,3	53
	1	12
653621	0,1	109
	0,3	82
	1	27
439879	1	96
	3	77
	10	37
699789	0,1	82
	0,3	69
	1	26

Ví dụ 96: Liên kết protein trong huyết tương của các oligonucleotit đối nghĩa chứa nhóm tiếp hợp GalNAc3

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 57 hướng đích ApoC-III và các oligonucleotit trong Bảng 93 hướng đích Apo(a) được thử trong thử nghiệm siêu lọc để đánh giá mức gắn kết protein huyết tương .

Bảng 93

Các oligonucleotit cải biến hướng đích Apo(a)

ISIS số	Trình tựs (5' đến 3')	Cụm $GalNAc_3$	CM	SEQ ID No
494372	$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}$ $T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	53
693401	$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}$	n/a	n/a	53

	$T_{es}{}^{m}C_{e}$			
681251	GalNAc$_3$-7$_a$-o,$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7$_a$	PO	53
681257	GalNAc$_3$-7$_a$-o,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7$_a$	PO	53

Xem ví dụ 74 với bảng chú thích. Cấu trúc của GalNAc$_3$-7a được thể hiện trên đây trong Ví dụ 48.

Các cụm siêu lọc Ultrafree-MC (30,000nMWL, màng xenluloza tái sinh liên kết thấp, Millipore, Bedford, MA) được đưa vào điều kiện ban đâu 300µl Tween 80 0,5% và được ly tâm ở 2000g trong thời gian 10 phút, sau đó bằng 300µl dung dịch chứa 300µg/mL đối chứng oligonucleotit trong H_2O và được ly tâm ở 2000g trong 16 phút. Để đánh giá liên kết không đặc hiệu với các bộ lọc này cho mỗi thử nghiệm oligonucleotit từ các bảng 57 và 93 được dùng trong các thử nghiệm, 300µL dung dịch chứa 250ng/mL oligonucleotit trong H_2O ở độ pH = 7,4 được đặt trong các bộ lọc điều hòa trước và được ly tâm ở 2000g trong 16 phút. Các mẫu chưa lọc và đã lọc được phân tích bằng thử nghiệm ELISA để xác định nồng độ oligonucleotit. Ba bản sao được dùng để thu được nồng độ trung bình cho mỗi mẫu. Nồng độ trung bình của mẫu đã lọc so với mẫu chưa lọc được dùng để xác định phần trăm của oligonucleotit mà thu hồi thông qua bộ lọc này với sự không có mặt của huyết tương (% thu hồi).

Toàn bộ các mẫu huyết tương đông lạnh được gom trong K3-EDTA từ mẫu thông thường, người tình nguyện dùng thuốc miễn phí, các con khỉ Cynomolgus, và chuột nhắt CD-1, đều được mua từ Bioreclamation LLC (Westbury, NY). Thử nghiệm các oligonucleotit được bổ sung vào 1,2mL các phần phân ước của huyết tương ở hai nồng độ (5µg/mL và 150µg/mL). Phần phân ước (300µl) của mỗi mẫu huyết tương được chọn được đặt trong cụm lọc điều hòa trước và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 30 phút, tiếp theo là ly tâm ở 2000g trong 16 phút. Các phân ước của các mẫu huyết tương đã được lọc và mẫu huyết tương được chọn chưa lọc bằng ELISA để xác định nồng độ oligonucleotit trong mỗi mẫu. Ba bản sao cho mỗi nồng độ được dùng để xác định tỷ lệ phần trăm trung bình của oligonucleotit liên kết và không liên kết trong mỗi mẫu. Nồng độ trung bình của mẫu đã lọc so với nồng độ của mẫu chưa lọc được dùng để xác định phần trăm của oligonucleotit trong huyết tương mà không liên kết với huyết tương các protein (% không

liên kết). Các giá trị oligonucleotit không liên kết cuối cùng được hiệu chỉnh cho liên kết không đặc hiệu bằng cách chia % không liên kết cho % thu hồi cho mỗi oligonucleotit. % giá trị oligonucleotit liên kết được xác định bằng cách trừ % giá trị không liên kết cuối cùng cho 100. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 94 đối với hai nồng độ của oligonucleotit được thử (5 và 150µg/ml) trong mỗi loại huyết tương. Các kết quả cho thấy rằng thể tiếp hợp GalNAc các nhóm không có tác động đáng kể đến liên kết protein trong huyết tương. Hơn thế nữa, các với liên kết giữa nucleosit của PS đầy đủ và trộn các liên kết PO/PS cả các protein trong huyết tương, và với liên kết PS đầy đủ liên kết với các protein trong huyết tương với khoảng hơi lớn hơn so với oligonucleotit với các liên kết PO/PS hỗn hợp.

Bảng 94

Phần trăm của oligonucleotit cải biến liên kết với huyết tương các protein

ISIS số	Huyết tương người		Huyết tương khỉ		Huyết tương chuột	
	5 µg/ml	150µg/ml	5 µg/ml	150µg/ml	5 µg/ml	150µg/ml
304801	99,2	98,0	99,8	99,5	98,1	97,2
663083	97,8	90,9	99,3	99,3	96,5	93,0
674450	96,2	97,0	98,6	94,4	94,6	89,3
494372	94,1	89,3	98,9	97,5	97,2	93,6
693401	93,6	89,9	96,7	92,0	94,6	90,2
681251	95,4	93,9	99,1	98,2	97,8	96,1
681257	93,4	90,5	97,6	93,7	95,6	92,7

Ví dụ 97: Các oligonucleotit cải biến hướng đích TTR chứa nhóm tiếp hợp GalNAc3

Các oligonucleotit thể hiện trong Bảng 95 chứa thể tiếp hợp GalNAc được thiết kế để hướng đích TTR.

Bảng 95

Các oligonucleotit cải biến hướng đích TTR

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm $GalNAc_3$	CM	SEQ ID No
666941	$GalNAc_3$-$\mathbf{3_{a-o}}$'$\mathbf{A_{do}}$ $T_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_3$-3	A_d	45

666942	$T_{es}{}^{m}C_{eo}$ T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} $T_{eo}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_3$-**3$_a$**	GalNAc$_3$-**1**	A_d	42
682876	GalNAc$_3$-**3$_{a\text{-}o'}$**$T_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_e$	GalNAc$_3$-3	PO	41
682877	GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o'}$$T_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_e$	GalNAc$_3$-7	PO	41
682878	GalNAc$_3$-10$_{a\text{-}o'}$$T_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_e$	GalNAc$_3$-10	PO	41
682879	GalNAc$_3$-13$_{a\text{-}o'}$$T_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_e$	GalNAc$_3$-13	PO	41
682880	GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o'}$**A$_{do}$** $T_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_e$	GalNAc$_3$-7	A_d	45
682881	GalNAc$_3$-10$_{a\text{-}o'}$**A$_{do}$** $T_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_e$	GalNAc$_3$-10	A_d	45
682882	GalNAc$_3$-13$_{a\text{-}o'}$**A$_{do}$** $T_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_e$	GalNAc$_3$-13	A_d	45
684056	$T_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{es} G_{es} G_{ds} T_{ds} T_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{eo}\mathbf{A_{do'}}$-GalNAc$_3$-**19$_a$**	GalNAc$_3$-**19**	A_d	42

Chú thích trong Bảng 95 có thể được thấy trong Ví dụ 74. Cấu trúc của GalNAc$_3$-**1** được thể hiện trong Ví dụ 9. Cấu trúc của GalNAc$_3$-3$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 39. Cấu trúc của GalNAc$_3$-7$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 48. Cấu trúc của GalNAc$_3$-10$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 46. Cấu trúc của GalNAc$_3$-13$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 62. Cấu trúc của GalNAc$_3$-**19**$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 70.

Ví dụ 98: Đánh giá về các tác dụng kháng viêm của các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc trong thử nghiệm hPMBC

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 96 và thử về các tác dụng kháng viêm trong thử nghiệm hPMBC như được bộc lộ trong các ví dụ 23 và 24. (Xem các bảng 17, 70, 82, và 95 về phần mô tả của các oligonucleotit.) ISIS 353512 là bộ đáp ứng cao được dùng làm đối chứng tích cực, và các oligonucleotit khác được bộc lộ trong các bảng 70, 82, và 95. Các kết quả thể hiện trong Bảng 96 thu được bằng cách sử dụng máu từ một người

cho. Các kết quả cho thấy rằng các oligonucleotit chứa các liên kết giữa nucleosit PO/PS hỗn hợp tạo ra phản ứng kháng viêm thấp hơn đáng kể so với cùng các oligonucleotit có liên kết PS đầy đủ. Hơn thế nữa, nhóm tiếp hợp GalNAc không tác dụng đáng kể trong thử nghiệm này.

Bảng 96

ISIS số	E_{max}/EC_{50}	Cụm $GalNAc_3$	Các liên kết	CM
353512	3630	n/a	PS	n/a
420915	802	n/a	PS	n/a
682881	1311	$GalNAc_3$-10	PS	A_d
682888	0,26	$GalNAc_3$-10	PO/PS	A_d
684057	1,03	$GalNAc_3$-19	PO/PS	A_d

Ví dụ 99: Ái lực liên kết của các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc đối với thụ thể asialoglycoprotein

Ái lực liên kết của các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 97 (xem Bảng 63 về phần mô tả của các oligonucleotit) đối với thụ thể asialoglycoprotein được thử trong thử nghiệm liên kết thụ thể cạnh tranh. Phối tử cạnh tranh, α1-axit glycoprotein (AGP), ủ trong 50mM dung dịch natri đệm axetat (độ pH =5) với 1U neuraminidaza-agaroza trong thời gian 16 giờ ở nhiệt độ 37°C, và mức khử sialyl hóa > 90% được xác nhận bằng thử nghiệm axit sialic hoặc sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC). Iot monoclorua được sử dụng để iot hóa AGP theo quy trình bằng Atsma *et al.* (*xem* J Lipid Res. 1991 Jan; 32(1):173-81). Trong phương pháp này, α1-axit glycoprotein đã khử sialyl hóa (de-AGP) được bổ sung vào 10mM iot clorua, $Na^{125}I$, và 1M glyxin trong 0,25M NaOH. Sau khi ủ trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, de-AGP đánh dấu bằng ^{125}I được tách ra khỏi ^{125}I tự do bằng cách cô hỗn hợp này hai lần sử dụng cột quay 3 KDMWCO. protein được thử về hiệu quả gắn nhãn và độ tinh khiết trên hệ thống sắc ký lỏng cao áp có lắp cột Agilent SEC-3 (7,8x300mm) và bộ đếm ß-RAM. Các thử nghiệm cạnh tranh sử dụng ^{125}I -labeled de-AGP và cụm GalNAc khác nhau chứa các ASO được thực hiện như sau. tế bào HepG2 của người (10^6 tế bào/ml) được cho vào đĩa trên các đĩa loại 6 lỗ trong 2mL môi trường tăng trưởng thích hợp. Môi trường MEM có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (FBS), 2mM L-Glutamin và 10mM HEPES được sử dụng. Các tế bào được ủ 16-

20 giờ @ 37°C với lần lượt 5% và 10% CO_2. Các tế bào được rửa trong môi trường không có FBS trước khi thử nghiệm. Các tế bào được ủ trong thời gian 30 phút @ 37°C với 1mL hỗn hợp cạnh tranh chứa môi trường tăng trưởng thích hợp với 2% FBS, 10 đến 8M de-AGP đã dược đánh dấu bằng ^{125}I và cụm GalNAc chứa các ASO ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 1^{1} đến 10^{-5}M. Liên kết không đặc hiệu được xác định với sự có mặt của 10 đến 2M đường GalNAc. Các tế bào được rửa hai lần trong môi trường không có FBS để loại bỏ de-AGP đã được đánh dấu bằng ^{125}I không liên kết và ASO của GalNAc cạnh tranh. Các tế bào được phân giải bằng cách sử dụng dung dịch đệm RLT của Qiagen chứa 1% ß-mercaptoetanol. Các dịch phân giải được chuyển sang ống nghiệm đáy tròn sau 10 phút chu trình đóng băng/tan băng và được thử nghiệm trên bộ đếm γ. Liên kết không đặc hiệu được trừ trước khi phân chia các số đếm protein ^{125}I bằng trị số của số đếm nồng độ GalNAc-ASO nhỏ nhất. Các đường cong về mức độ ức chế được ăn khớp theo sự cân bằng liên kết cạnh tranh một phía bằng cách sử dụng thuật toán hồi quy không tuyến tính để tính ái lực liên kết (K_D's).

Các kết quả trong Bảng 97 thu được từ các thử nghiệm được thực hiện trong năm ngày khác nhau. Các kết quả của các oligonucleotit được đánh dấu bằng chỉ số trên "a" là giá trị trung bình của các thử nghiệm được thực hiện trong hai ngày khác nhau. Các kết quả cho thấy rằng các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp GalNAc ở đầu tận cùng 5' liên kết với thụ thể asialoglycoprotein trên tế bào HepG2 của người có ái lực cao hơn từ 1,5 đến 16 lần so với các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp GalNAc ở đầu tận cùng 3'.

Bảng 97
Các kết quả của asialoglycoprote trong thử nghiệm liên kết thụ thể

ISIS số	Thể tiếp hợp GalNAc	Thể tiếp hợp GalNAc được gắn vào đầu oligonucleotit	K_D (nM)
661161[a]	$GalNAc_3$-3	5'	3,7
666881[a]	$GalNAc_3$-10	5'	7,6
666981	$GalNAc_3$-7	5'	6,0
670061	$GalNAc_3$-13	5'	7,4
655861[a]	$GalNAc_3$-**1**	3'	11,6
677841[a]	$GalNAc_3$-**19**	3'	60,8

Ví dụ 100: Sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp GalNAc hướng đích Apo(a) *in vivo*

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 98a dưới đây được thử trong nghiên cứu một liều về khoảng thời gian hoạt động ở chuột nhắt.

Bảng 98a
Các ASO cải biến hướng đích APO(a)

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm $GalNAc_3$	CM	SEQ ID No.
681251	$GalNAc_{3}\text{-}7_{a\text{-}o}$,$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_{3}$-7a	PO	53
681257	$GalNAc_{3}\text{-}7_{a\text{-}o}$,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	$GalNAc_{3}$-7a	PO	53

Cấu trúc của $GalNAc_{3}\text{-}7_{a}$ được thể hiện trong Ví dụ 48.

Điều trị bệnh

Mỗi con chuột cái chuyển gen có Apo(a) của người được tiêm dưới da một lần mỗi tuần, tổng cộng 6 liều, bằng oligonucleotit và liều lượng liệt kê trong Bảng 98b hoặc bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 3 động vật. Máu được rút ra ngày trước khi dùng liều để xác định cơ sở lượng protein của Apo(a) trong huyết tương và ở 72 giờ, 1 tuần, và 2 tuần sau khi dùng liều lượng thứ nhất. Việc rút máu bổ sung được thực hiện ở tuần 3, tuần 4, tuần,5 và tuần 6 sau khi dùng liều lượng thứ nhất. Lượng protein của Apo(a) trong huyết tương được đo bằng cách sử dụng ELISA. Các kết quả trong Bảng 98b được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng protein của Apo(a) trong huyết tương cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa với lượng cơ sở (% BL), Các kết quả cho thấy rằng các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp GalNAc thể hiện sự giảm hiệu lực về mức độ biểu hiện của Apo(a). Tác dụng hiệu nghiệm này được quan sát thấy đối với oligonucleotit mà chứa liên kết giữa nucleosit của PS đầy đủ và oligonucleotit mà chứa liên kết PO và PS hỗn hợp.

Bảng 98b
Lượng protein Apo(a) trong huyết tương

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Apo(a) tại thời điểm 72 giờ (% BL)	Apo(a) tại thời điểm 1 tuần (% BL)	Apo(a) tại thời điểm 3 tuần (% BL)
PBS	n/a	116	104	107
681251	0,3	97	108	93
	1,0	85	77	57
	3,0	54	49	11
	10,0	23	15	4
681257	0,3	114	138	104
	1,0	91	98	54
	3,0	69	40	6
	10,0	30	21	4

Ví dụ 101: Sự ức chế đối nghĩa bằng các oligonucleotit chứa cụm GalNAc được liên kết qua gốc ổn định

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 99 được thử về việc ức chế sự biểu hiện APOC-III ở chuột *in vivo*. Mỗi con chuột nhắt C57BL/6 được tiêm dưới da một lần bằng oligonucleotit liệt kê trong Bảng 99 hoặc bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 động vật. Mỗi con chuột được điều trị bằng ISIS 440670 tiếp nhận liều lượng 2, 6, 20, hoặc 60mg/kg. Mỗi con chuột được điều trị bằng ISIS 680772 hoặc 696847 tiếp nhận 0,6, 2, 6, hoặc 20mg/kg. Nhóm tiếp hợp GalNAc chứa ISIS 696847 được liên kết qua gốc ổn định, liên kết phosphorothioat thay cho liên kết chứa phosphođieste có thể chia tách dễ dàng. Động vật bị giết 72 giờ sau khi liều. các lượng ARN thông tin của ApoC-III ở gan được đo bằng cách sử dụng PCR thời gian thực. Các lượng ARN thông tin của ApoC-III được chuẩn tắc hóa với các lượng ARN thông tin của xyclophilin theo các cách thức chuẩn. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 99 là phần trăm trung bình của các lượng ARN thông tin của ApoC-III cho mỗi nhóm điều trị so với nhóm nước muối đối chứng. Các kết quả cho thấy rằng các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp GalNAc hiệu nghiệm hơn đáng kể so với oligonucleotit không có nhóm tiếp hợp. Hơn thế nữa, oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp GalNAc được liên kết với oligonucleotit qua gốc phân cắt được (ISIS 680772)

cũng hiệu nghiệm hơn so với oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp GalNAc được liên kết với oligonucleotit qua gốc ổn định (ISIS 696847).

Bảng 99

Các oligonucleotit cải biến ở chuột có ApoC-III hướng đích

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	CM	Liều lượng (mg/kg)	ARN thông tin của APOC-III (% PBS)	SEQ ID No.
440670	$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	n/a	2	92	47
			6	86	
			20	59	
			60	37	
680772	$GalNAc_{3}\text{-}7_{a\text{-}o}$,$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $T_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	PO	0,6	79	47
			2	58	
			6	31	
			20	13	
696847	$GalNAc_{3}\text{-}7_{a\text{-}s}$,$^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}A_{e}$	n/a (PS)	0,6	83	47
			2	73	
			6	40	
			20	28	

Cấu trúc của $GalNAc_{3}\text{-}7_{a}$ được thể hiện trong Ví dụ 48.

Ví dụ 102: Sự phân bố ở gan của các oligonucleotit đối nghĩa chứa thể tiếp hợp GalNAc

Sự phân bố ở gan của ISIS 353382 (xem Bảng 23) mà không chứa thể tiếp hợp GalNAc và ISIS 655861 (xem Bảng 23) mà chứa thể tiếp hợp GalNAc được đánh giá. Các con chuột đực Balb/c được tiêm dưới da một lần bằng ISIS 353382 hoặc 655861 với liều lượng được liệt kê trong Bảng 100. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 3 con chuột trừ nhóm 18mg/kg với ISIS 655861, mà bao gồm 2 con chuột. Chuột bị giết 48 giờ sau khi dùng liều để xác định sự phân bố ở gan của các oligonucleotit. Để đo số lượng của oligonucleotit của các phân tử đối nghĩa trên tế bào, nhãn Ruteni (II) tris-bipyriđin (MSD TAG, Meso Scale Discovery) được tiếp hợp với oligonucleotit dò được dùng để phát hiện

các oligonucleotit đối nghĩa. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 100 là nồng độ trung bình của oligonucleotit cho mỗi nhóm điều trị bằng đơn vị hàng triệu của các phân tử oligonucleotit trên tế bào. Các kết quả cho thấy rằng với liều lượng tương đương, oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc có nồng độ trong toàn bộ gan và trong các tế bào gan cao hơn so với oligonucleotit mà không chứa thể tiếp hợp GalNAc. Hơn thế nữa, oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAc có nồng độ các tế bào gan không gồm nhu mô thấp hơn so với oligonucleotit mà không chứa thể tiếp hợp GalNAc. Và trong khi nồng độ của ISIS 655861 trong các tế bào gan và các tế bào gan không gồm nhu mô là giống như trên tế bào, gan chiếm khoảng 80% tế bào gan theo thể thích. Do đó, đại đa số oligonucleotit ISIS 655861 mà có mặt ở gan được tìm thấy ở các tế bào gan, trong khi đại đa số oligonucleotit ISIS 353382 có mặt ở gan được tìm thấy ở các tế bào gan không gồm nhu mô.

Bảng 100

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Nồng độ trong toàn bộ gan (phân tử*10^6 trên tế bào)	Nồng độ trong tế bào gan (phân tử*10^6 trên tế bào)	Nồng độ tế bào gan không gồm nhu mô (phân tử*10^6 trên tế bào)
353382	3	9,7	1,2	37,2
	10	17,3	4,5	34,0
	20	23,6	6,6	65,6
	30	29,1	11,7	80,0
	60	73,4	14,8	98,0
	90	89,6	18,5	119,9
655861	0,5	2,6	2,9	3,2
	1	6,2	7,0	8,8
	3	19,1	25,1	28,5
	6	44,1	48,7	55,0
	18	76,6	82,3	77,1

Ví dụ 103: Khoảng thời gian hoạt động *in vivo* của các oligonucleotit hướng đích APOC-III chứa thể tiếp hợp GalNAc3

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 101 dưới đây được thử trong nghiên cứu một liều về khoảng thời gian hoạt động ở chuột nhắt.

Bảng 101

Các ASO được cải biến hướng đích APOC-III

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm $GalNAc_3$	CM	SEQ ID No.
304801	$A_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{e}$	n/a	n/a	20
663084	$GalNAc_3$-**3$_{a}$-$_{o}$'A_{do}**$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{e}$	$GalNAc_3$-3a	A_d	36
679241	$A_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{eo}$**$A_{do}$'**-$GalNAc_3$-**19$_{a}$**	$GalNAc_3$-19a	A_d	21

Cấu trúc của $GalNAc_3$-3_a được thể hiện trong Ví dụ 39, và $GalNAc_3$-**19**$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 70.

Điều trị bệnh

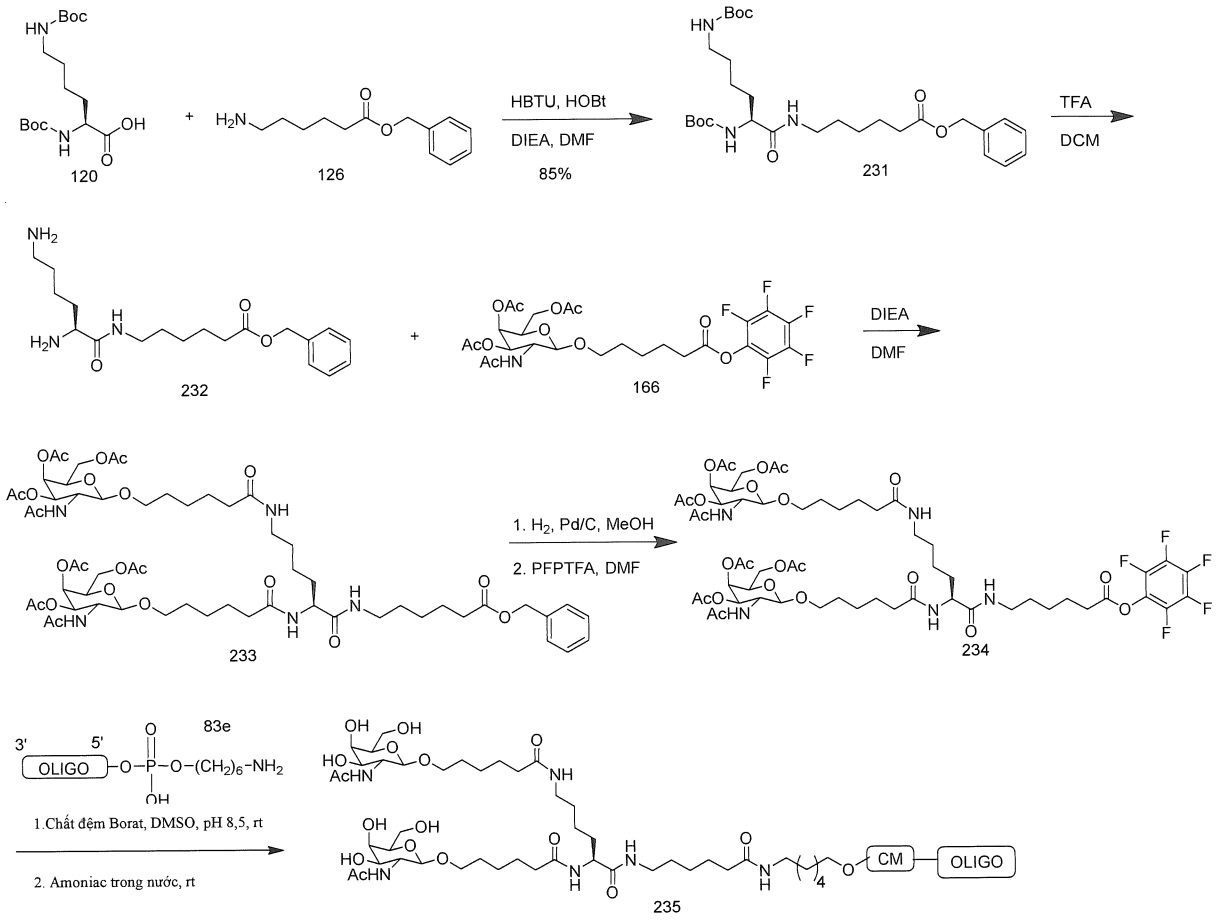
Mỗi con chuột cái chuyển gen có APOC-III của người được tiêm dưới da một lần bằng oligonucleotit liệt kê trong Bảng 101 hoặc bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 3 con chuột. Máu được rút ra trước khi dùng liều để xác định cơ sở và ở 3, 7, 14, 21, 28, 35, và 42 ngày sau khi dùng liều. Triglyxerit trong huyết tương và lượng protein của APOC-III được đo như được mô tả trong Ví dụ 20. Các kết quả trong Bảng 102 được đưa ra là phần trăm trung bình của triglyxerit trong huyết tương và các lượng APOC-III cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa với lượng cơ sở. So sánh các kết quả trong Bảng 58 của Ví dụ 79 với các kết quả trong Bảng 102 dưới đây cho thấy rằng các oligonucleotit chứa hỗn hợp gồm phosphođieste và liên kết phosphorothioat giữa nucleosit thể hiện khoảng thời gian hoạt động tăng hơn so với đương lượng các oligonucleotit chỉ chứa liên kết phosphorothioat giữa các nucleosit.

Bảng 102

Lượng triglyxerit trong huyết tương và protein của APOC-III ở chuột nhắt chuyển gen

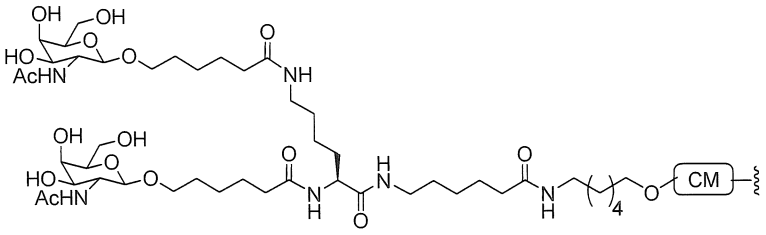
ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Mốc thời gian (ngày sau khi dùng liều)	Triglyxerit (% cơ sở)	Lượng protein APOC-III (% cơ sở)	Cụm $GalNAc_3$	CM
PBS	n/a	3	96	101	n/a	n/a
		7	88	98		
		14	91	103		
		21	69	92		
		28	83	81		
		35	65	86		
		42	72	88		
304801	30	3	42	46	n/a	n/a
		7	42	51		
		14	59	69		
		21	67	81		
		28	79	76		
		35	72	95		
		42	82	92		
663084	10	3	35	28	$GalNAc_3$-3a	A_d
		7	23	24		
		14	23	26		
		21	23	29		
		28	30	22		
		35	32	36		
		42	37	47		
679241	10	3	38	30	$GalNAc_3$-19a	A_d
		7	31	28		
		14	30	22		
		21	36	34		
		28	48	34		
		35	50	45		
		42	72	64		

Ví dụ 104: Tổng hợp các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp 5'-GalNAC$_2$

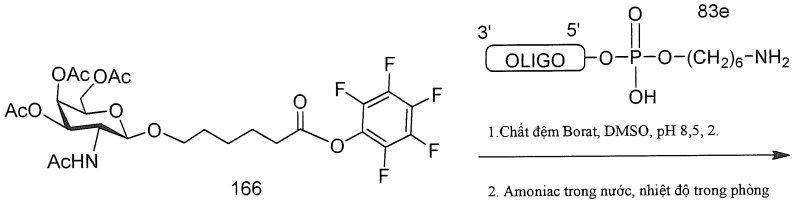


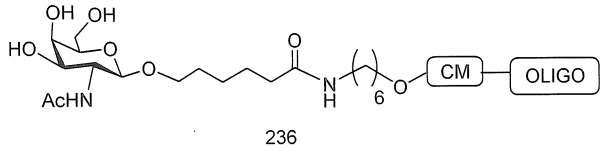
Hợp chất có công thức 120 có bán trên thị trường, và quy trình tổng hợp của hợp chất có công thức 126 được bộc lộ trong Ví dụ 49. Hợp chất có công thức 120 (1g, 2,89mmol), HBTU (0,39g, 2,89mmol), và HOBt (1,64g, 4,33mmol) được hòa tan trong DMF (10mL. và *N*,*N*-điisopropyletylamin (1,75mL, 10,1mmol) được bổ sung vào. Sau khoảng 5 phút, aminohexanoic benzyl este của axit (1,36g, 3,46mmol) được bổ sung vào phản ứng. Sau 3 giờ, hỗn hợp phản ứng này được rót vào 100mL 1M NaHSO4 và chiết bằng 2 x 50mL etyl axetat. Lớp hữu cơ được kết hợp và rửa bằng 3 x 40mL dung dịch $NaHCO_3$ bão hòa và 2 x nước muối, làm khô bằng Na_2SO_4, lọc và cô. Sản phẩm được tinh chế bằng cột sắc ký trên silicagel (DCM:EA:Hex, 1:1:1) để tạo ra hợp chất có công thức 231. LCMS và NMR là phù hợp với cấu trúc. Các hợp chất có công thức 231 (1,34g,

2,438mmol) được hòa tan trong điclometan (10mL) và axit trifluoraxetic (10mL) được bổ sung vào. Sau khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ, hỗn hợp phản ứng này được cô trong điều kiện áp suất giảm và làm bay hơi đồng thời với toluen (3 x 10mL). Cặn được làm khô trong điều kiện áp suất giảm để tạo ra hợp chất có công thức 232 là muối trifuloraxetat. Quy trình tổng hợp của hợp chất có công thức 166 được bộc lộ trong Ví dụ 54. Hợp chất có công thức 166 (3,39g, 5,40 mmol) được hòa tan trong DMF (3mL). Dung dịch chứa hợp chất có công thức 232 (1,3g, 2,25mmol) được hòa tan trong DMF (3mL) và *N*,*N*-điisopropyletylamin (1,55mL) được bổ sung vào. Hỗn hợp phản ứng này được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút, sau đó được rót vào nước (80mL) và lớp nước được chiết with EtOAc (2x100mL). Lớp hữu cơ được tách và rửa bằng dung dịch nước $NaHCO_3$ bão hòa (3 x 80mL), 1 M $NaHSO_4$ (3 x 80mL) và nước muối (2 x 80mL), sau đó được làm khô (Na_2SO_4), lọc, và cô. Cặn được tinh chế bằng cột sắc ký trên silicagel để tạo ra hợp chất có công thức 233. LCMS và NMR là phù hợp với cấu trúc. Hợp chất có công thức 233 (0,59g, 0,48mmol) được hòa tan trong metanol (2,2mL) và etyl axetat (2,2mL). Palađi trên cacbon (10% khối lượng Pd/C, ướt, 0,07g) được bổ sung vào, và hỗn hợp phản ứng này được khuấy trong khí quyển hyđro trong thời gian 3 giờ. Hỗn hợp phản ứng này được lọc qua đệm xelit và cô để tạo ra axit carboxylic. axit carboxylic (1,32g, 1,15mmol, chùm axit tự do) được hòa tan trong DMF (3,2mL). *N*,*N*-điisopropylehtylamin (0,3ml, 1,73mmol) và PFPTFA (0,30mL, 1,73mmol) được bổ sung vào dung dịch này. Sau 30 phút khuấy ở nhiệt độ trong phòng hỗn hợp phản ứng được rót vào nước (40mL) và chiết bằng EtOAc (2 x 50mL). Sự gia công tiêu chuẩn được hoàn thành như trên để tạo ra hợp chất có công thức 234. LCMS và NMR là phù hợp với cấu trúc. Oligonucleotit 235 được điều chế bằng cách áp dụng quy trình chung được bộc lộ trong Ví dụ 46. Phần cụm $GalNAC_2$ ($GalNAC_2$-24_a) của nhóm tiếp hợp $GalNAC_2$-24 có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ có mặt ở oligonucleotit để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Cấu trúc của $GalNAC_2$-24 ($GalNAC_2$-24_a-CM) được thể hiện dưới đây:



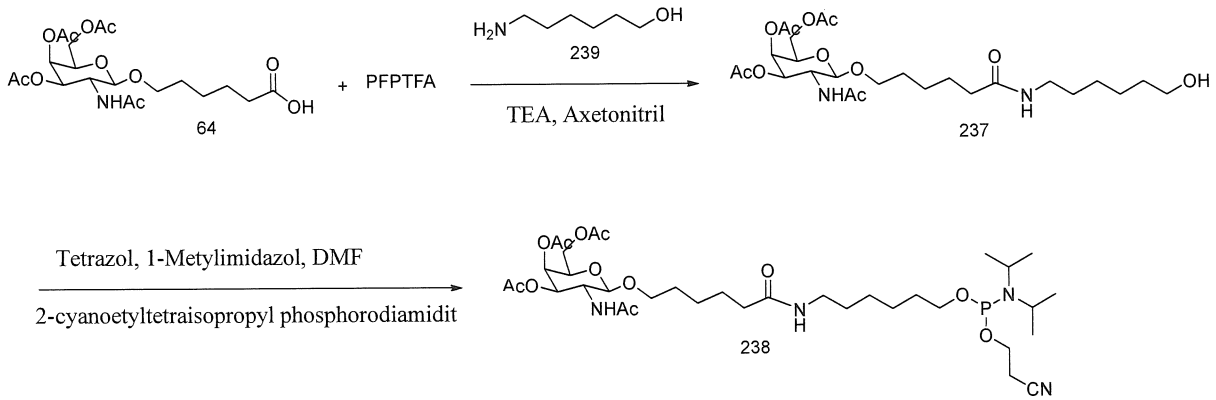
Ví dụ 105: Tổng hợp các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAC$_1$-25

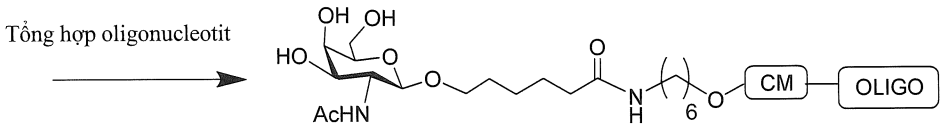




Quy trình tổng hợp của hợp chất có công thức 166 được bộc lộ trong Ví dụ 54. Oligonucleotit 236 được điều chế bằng cách áp dụng quy trình chung được bộc lộ trong Ví dụ 46.

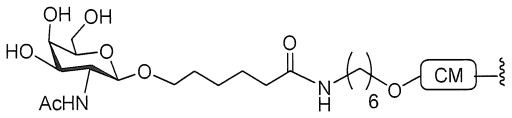
Theo cách khác, oligonucleotit 236 được tổng hợp bằng cách sử dụng sơ đồ được thể hiện dưới đây, và hợp chất có công thức 238 được dùng để tạo ra oligonucleotit 236 bằng cách áp dụng các quy trình được bộc lộ trong Ví dụ 10.





236

Phần cụm GalNAc$_1$ (GalNAC$_1$-25$_a$) của nhóm tiếp hợp GalNAC$_1$-25 có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ có mặt ở oligonucleotit để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Cấu trúc của GalNAC$_1$-25 (GalNAC$_1$-25$_a$-CM) được thể hiện dưới đây:



Ví dụ 106: Sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit hướng đích SRB-1 chứa thể tiếp hợp 5'-GalNAC$_2$ hoặc 5'-GalNAc$_3$

Các oligonucleotit được liệt kê trong các bảng 103 và 104 được thử trong các nghiên cứu phụ thuộc vào liều lượng đối với việc ức chế đối nghĩa của SRB-1 ở chuột nhắt.

Điều trị bệnh

Chuột đực C57BL/6 sáu tuần tuổi (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) được tiêm dưới da một lần với 2, 7, hoặc 20mg/kg ISIS số 440762; hoặc với 0,2, 0,6, 2, 6, hoặc 20mg/kg ISIS số 686221, 686222, hoặc 708561; hoặc bằng nước muối. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 con. Chuột nhắt bị giết 72 giờ sau khi dùng liều cuối cùng. Lượng ARN thông tin của SRB-1 ở gan được đo bằng cách sử dụng PCR thời gian thực. Lượng ARN thông tin của SRB-1 được chuẩn tắc hóa với các lượng ARN thông tin của xyclophilin theo các cách thức chuẩn. các oligonucleotit đối nghĩa làm giảm lượng ARN thông tin của SRB-1 theo kiểu phụ thuộc vào liều lượng, và, các kết quả ED$_{50}$ được thể hiện trong các bảng 103 và 104. Mặc dù các nghiên cứu trước đây cho thấy rằng các oligonucleotit đã tiếp hợp GalNAc hóa trị ba có hiệu lực lớn hơn đáng kể so với các oligonucleotit đã tiếp hợp GalNAc hóa trị hai, mà về phần mình có hiệu lực lớn hơn đáng kể so với các oligonucleotit đã tiếp hợp GalNAc hóa trị một (xem, ví dụ: Khorev *et al.*, *Bioorg. & Med. Chem.*, Vol. 16, 5216-5231 (2008)), việc điều trị bệnh bằng các oligonucleotit đối nghĩa

chứa các cụm GalNAc hóa trị một, hóa trị hai, và hóa trị ba làm giảm lượng ARN thông tin của SRB-1 với hiệu lực tương tự như được thể hiện trong các bảng 103 và 104.

Bảng 103

Các oligonucleotit cải biến hướng đích SRB-1

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm GalNAc	ED_{50} (mg/kg)	SEQ ID No
440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	4,7	22
686221	**GalNAC$_2$-24$_a$-$_o$'A$_{do}$**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	GalNAC$_2$-24$_a$	0,39	26
686222	GalNAc$_3$-13$_{a-o}$'**A$_{do}$**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	GalNAc$_3$-13$_a$	0,41	26

Xem Ví dụ 93 đối với bảng chú thích. Cấu trúc của GalNAc$_3$-13a được thể hiện trong Ví dụ 62, và cấu trúc của GalNAC$_2$-24a được thể hiện trong Ví dụ 104.

Bảng 104

Các oligonucleotit cải biến hướng đích SRB-1

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm GalNAc	ED_{50} (mg/kg)	SEQ ID No
440762	$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	n/a	5	22
708561	**GalNAC$_1$-25$_{a-o}$'**$T_{ks}{}^{m}C_{ks}A_{ds}G_{ds}T_{ds}{}^{m}C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{ks}{}^{m}C_{k}$	GalNAC$_1$-25$_a$	0,4	22

Xem Ví dụ 93 đối với bảng chú thích. Cấu trúc của GalNAC$_1$-25a được thể hiện trong Ví dụ 105.

Nồng độ của các oligonucleotit trong các bảng 103 và 104 ở gan cũng được đánh giá, bằng cách áp dụng các quy trình được bộc lộ trong Ví dụ 75. Các kết quả được thể hiện trong các bảng 104a và 104b dưới đây là tổng lượng mô của oligonucleotit đối nghĩa trung bình cho mỗi nhóm thử nghiệm, như đo được nhờ UV bằng đơn vị µg của oligonucleotit trên gam của mô của gan. Các kết quả cho thấy rằng các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp GalNAc tích tụ ở gan với lượng cao hơn đáng kể so với cùng liều lượng của oligonucleotit không có nhóm tiếp hợp GalNAc. Hơn thế nữa, các

oligonucleotit đối nghĩa chứa một, hai, hoặc ba phối tử GalNAc trong tất cả các nhóm tiếp hợp tương ứng của chúng tích tụ ở gan ở mức độ tương tự. Kết quả này là đáng ngạc nhiên theo Khorev *et al.*, tài liệu tham khảo nêu trên và phù hợp với dữ liệu hoạt tính được thể hiện trong các bảng 103 và 104 trên đây.

Bảng 104a

Nồng độ của các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp $GalNAC_2$ hoặc GalNAc3 ở gan

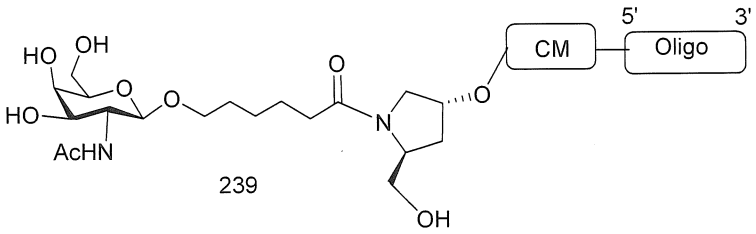
ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	[Oligonucleotit đối nghĩa] (µg/g)	Cụm GalNAc	CM
440762	2	2,1	n/a	n/a
	7	13,1		
	20	31,1		
686221	0,2	0,9	$GalNAC_2$-24_a	A_d
	0,6	2,7		
	2	12,0		
	6	26,5		
686222	0,2	0,5	$GalNAc_3$-13_a	A_d
	0,6	1,6		
	2	11,6		
	6	19,8		

Bảng 104b

Nồng độ của các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp $GalNAc_1$ ở gan

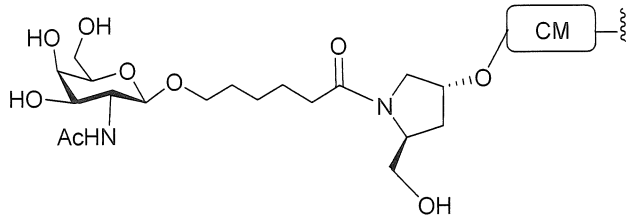
ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	[Oligonucleotit đối nghĩa] (µg/g)	cụm GalNAc	CM
440762	2	2,3	n/a	n/a
	7	8,9		
	20	23,7		
708561	0,2	0,4	$GalNAC_1$-25_a	PO
	0,6	1,1		
	2	5,9		
	6	23,7		
	20	53,9		

Ví dụ 107: Tổng hợp các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAC$_1$-26 hoặc GalNAC$_1$-27

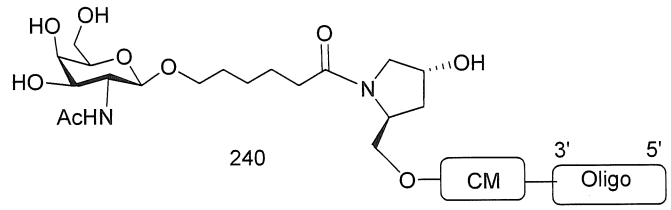


239

Oligonucleotit 239 được tổng hợp qua việc ngẫu hợp hợp chất có công thức 47 (xem ví dụ 15) thành axit 64 (xem chẳng hạn 32) bằng cách sử dụng HBTU và DIEA trong DMF. Amit thu được chứa hợp chất được phosphit hóa, sau đó được bổ sung vào đầu tận cùng 5' của oligonucleotit bằng cách áp dụng các quy trình được bộc lộ trong Ví dụ 10. Phần cụm GalNAc$_1$ (GalNAC$_1$-26$_a$) của nhóm tiếp hợp GalNAC$_1$-26 có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ có mặt ở oligonucleotit để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Cấu trúc của GalNAC$_1$-26 (GalNAC$_1$-26$_a$-CM) được thể hiện dưới đây:

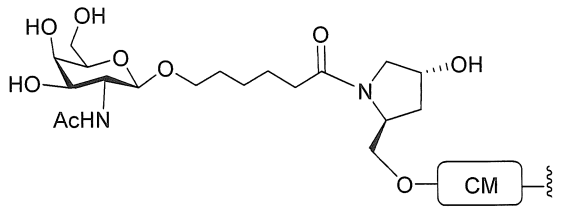


Để bổ sung nhóm tiếp hợp GalNAc$_1$ vào đầu tận cùng 3' của oligonucleotit, amit được tạo ra từ phản ứng của các hợp chất có công thức 47 và 64 được bổ sung vào nền rắn bằng cách áp dụng các quy trình được bộc lộ trong Ví dụ 7. Sau đó sự tổng hợp oligonucleotit được hoàn thành bằng cách áp dụng các quy trình được bộc lộ trong Ví dụ 9 để tạo ra oligonucleotit 240.



240

Phần cụm GalNAc$_1$ (GalNAC$_1$-27$_a$) của nhóm tiếp hợp GalNAC$_1$-27 có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ có mặt ở oligonucleotit để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Cấu trúc của GalNAC$_1$-27 (GalNAC$_1$-27$_a$-CM) được thể hiện dưới đây:



Ví dụ 108: Sự ức chế đối nghĩa *in vivo* bằng các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp GalNAc hướng đích Apo(a) *in vivo*

Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 105 dưới đây được thử trong nghiên cứu một liều ở chuột nhắt.

Bảng 105

Các ASO đã được cải biến hướng đích APO(a)

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm GalNAc$_3$	CM	SEQ ID No.
494372	$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}$ $T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	n/a	n/a	53
681251	GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$,$T_{es}G_{es}{}^{m}C_{es}T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{es}G_{es}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	53
681255	GalNAc$_3$-**3**$_{a\text{-}o}$,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-3a	PO	53
681256	GalNAc$_3$-10$_{a\text{-}o}$,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-10a	PO	53
681257	GalNAc$_3$-7$_{a\text{-}o}$,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-7a	PO	53
681258	GalNAc$_3$-13$_{a\text{-}o}$,$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}T_{es}T_{es}{}^{m}C_{e}$	GalNAc$_3$-13a	PO	53
681260	$T_{es}G_{eo}{}^{m}C_{eo}T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{ds}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}T_{ds}T_{eo}G_{eo}$ $T_{es}T_{es}{}^{m}C_{eo}\mathbf{A}_{\mathbf{do}}$'-GalNAc$_3$-**19**	GalNAc$_3$-19a	A$_d$	52

Cấu trúc của GalNAc$_3$-7$_a$ được thể hiện trong Ví dụ 48.

Điều trị bệnh

Mỗi con chuột đực chuyển gen có Apo(a) của người được tiêm dưới da một lần

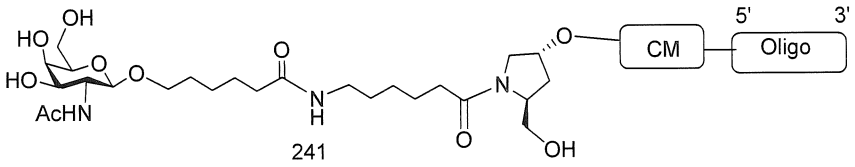
bằng oligonucleotit và liều lượng liệt kê trong Bảng 106 hoặc bằng PBS. Mỗi nhóm điều trị bao gồm 4 con. Máu được rút ra ngày trước khi dùng liều để xác định cơ sở lượng protein của Apo(a) trong huyết tương và ở 1 tuần sau liều lượng thứ nhất. Việc rút máu bổ sung sẽ thực hiện hằng tuần trong khoảng 8 tuần. Lượng protein của Apo(a) trong huyết tương được đo bằng cách sử dụng ELISA. Các kết quả trong Bảng 106 được đưa ra là phần trăm trung bình của lượng protein của Apo(a) trong huyết tương cho mỗi nhóm thử nghiệm, chuẩn tắc hóa với lượng cơ sở (% BL), Các kết quả cho thấy rằng các oligonucleotit đối nghĩa bị giảm sự biểu hiện protein của Apo(a). Hơn thế nữa, các oligonucleotit chứa nhóm tiếp hợp GalNAc thể hiện hiệu lực giảm về sự biểu hiện của Apo(a) hơn so với oligonucleotit mà không chúa nhóm tiếp hợp.

Bảng 106

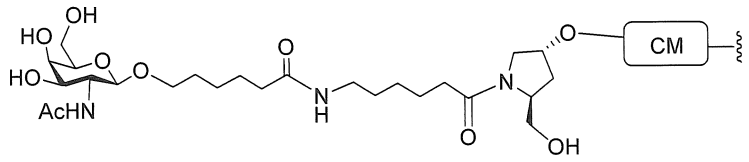
Lượng protein của Apo(a) trong huyết tương

ISIS số	Liều lượng (mg/kg)	Apo(a) ở 1 tuần (% BL)
PBS	n/a	143
494372	50	58
681251	10	15
681255	10	14
681256	10	17
681257	10	24
681258	10	22
681260	10	26

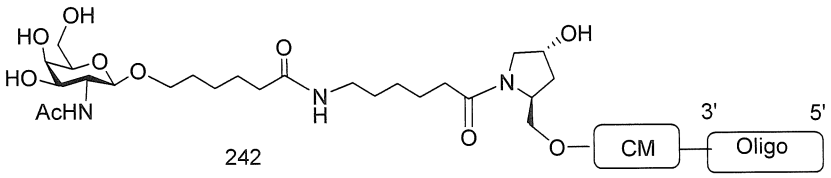
Ví dụ 109: Tổng hợp các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp $GalNAC_1$-28 hoặc $GalNAC_1$-29



Oligonucleotit 241 được tổng hợp bằng cách áp dụng các quy trình tương tự với quy trình đã được bộc lộ trong Ví dụ 71 để tạo ra phosphoramiđit chất trung gian, tiếp theo các quy trình được bộc lộ trong Ví dụ 10 để tổng hợp oligonucleotit. Phần cụm GalNAc$_1$ (GalNAC$_1$-28$_a$) của nhóm tiếp hợp GalNAC$_1$-28 có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ có mặt ở oligonucleotit để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Cấu trúc của GalNAC$_1$-28 (GalNAC$_1$-28$_a$-CM) được thể hiện dưới đây:

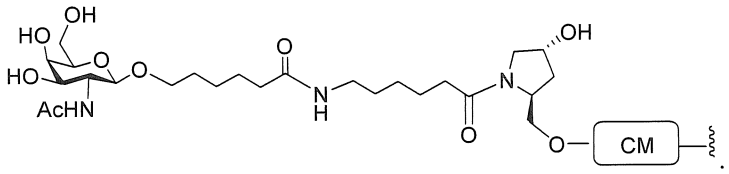


Để bổ sung nhóm tiếp hợp GalNAc$_1$ vào đầu tận cùng 3' của oligonucleotit, các quy trình tương tự với quy trình đã được bộc lộ trong Ví dụ 71 được dùng để tạo ra chất trung gian hyđroxyl, mà sau đó được bổ sung vào nền rắn bằng cách áp dụng các quy trình được bộc lộ trong Ví dụ 7. Sau đó, sự tổng hợp oligonucleotit được hoàn thành bằng cách áp dụng các quy trình được bộc lộ trong Ví dụ 9 để tạo ra oligonucleotit 242.

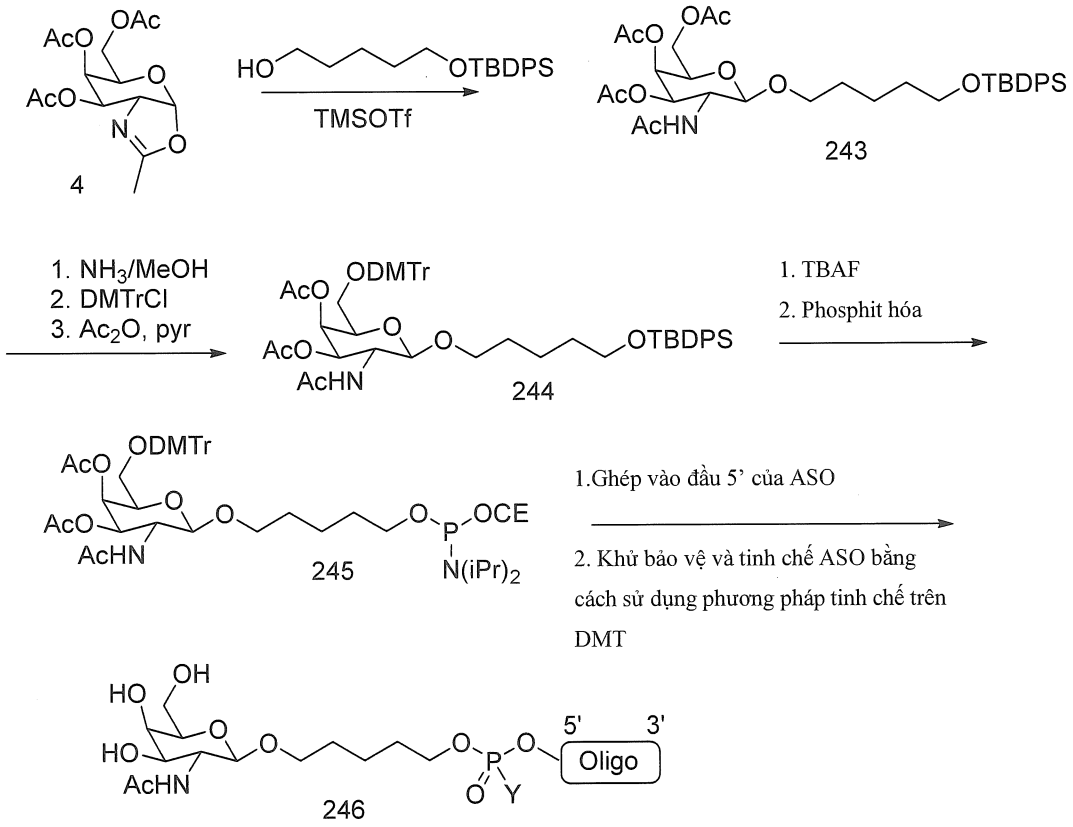


242

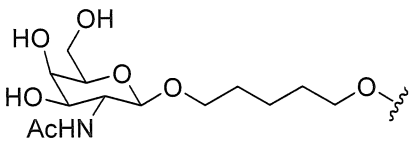
Phần cụm GalNAc$_1$ (GalNAC$_1$-29$_a$) của nhóm tiếp hợp GalNAC$_1$-29 có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ có mặt ở oligonucleotit để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Cấu trúc của GalNAC$_1$-29 (GalNAC$_1$-29$_a$-CM) được thể hiện dưới đây:



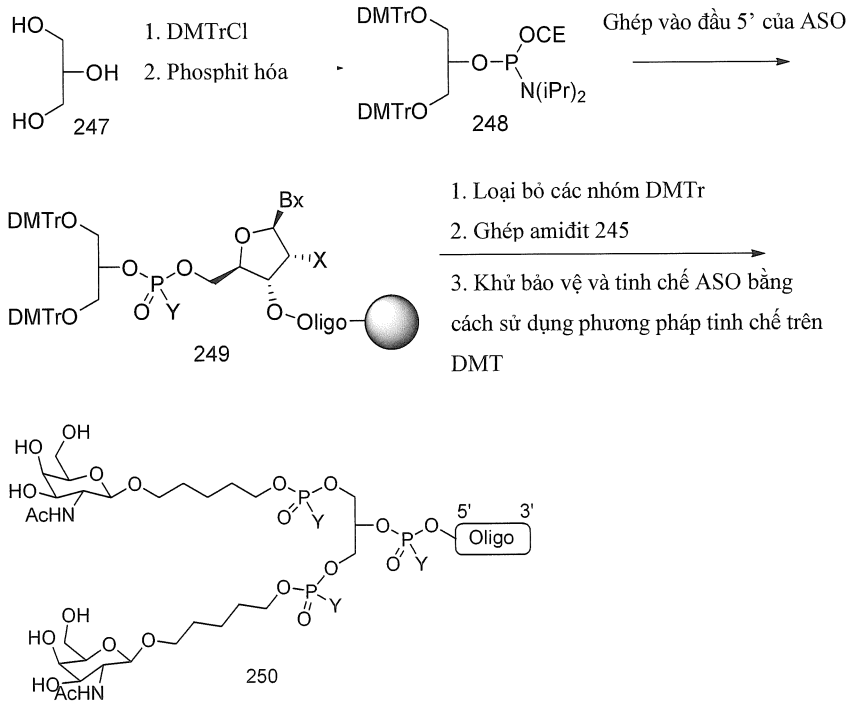
Ví dụ 110: Tổng hợp các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAC$_1$-30



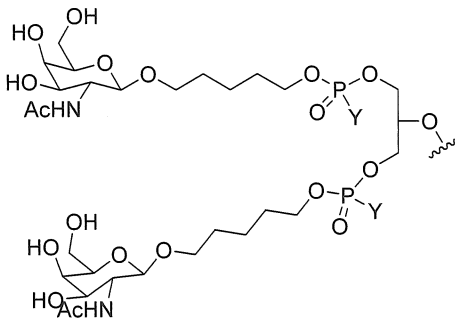
Oligonucleotit 246 chứa nhóm tiếp hợp GalNAC$_1$-30, trong đó Y được chọn từ O, S, được thế hoặc không được thế C_1-C_{10} alkyl, amino, thế amino, aziđo, alkenyl hoặc alkynyl, tổng hợp như được thể hiện trên đây. Phần cụm GalNAc$_1$ (GalNAC$_1$-30$_a$) của nhóm tiếp hợp GalNAC$_1$-30 có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, Y là phần của gốc phân cắt được. Theo các phương án nhất định, Y là phần của gốc ổn định, và gốc phân cắt được có mặt ở oligonucleotit. Cấu trúc của GalNAC$_1$-30$_a$ được thể hiện dưới đây:



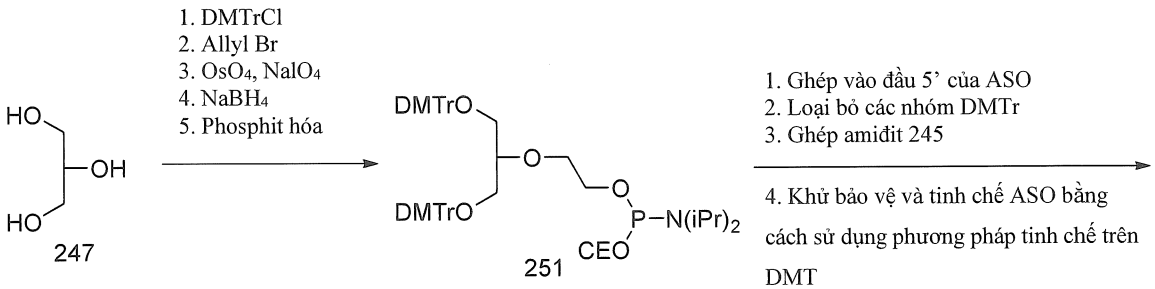
Ví dụ 111: Tổng hợp các oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAC$_2$-31 hoặc GalNAC$_2$-32

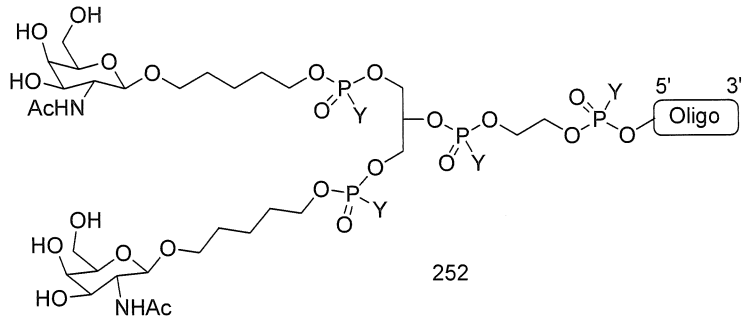


Oligonucleotit 250 chứa nhóm tiếp hợp GalNAC$_2$-31, trong đó Y được chọn từ O, S, được thế hoặc không được thế C_1-C_{10} alkyl, amino, thế amino, aziđo, alkenyl hoặc alkynyl, tổng hợp như được thể hiện trên đây. Phần cụm GalNAC$_2$ (GalNAC$_2$-31$_a$) của nhóm tiếp hợp GalNAC$_2$-31 có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, chứa Y nhóm cạnh trực tiếp đầu tận cùng 5' của oligonucleotit là một phần của gốc phân cắt được. Theo các phương án nhất định, Y- chứa nhóm cạnh trực tiếp đầu tận cùng 5' của oligonucleotit là một phần của gốc ổn định, và gốc phân cắt được có mặt ở oligonucleotit. Cấu trúc của GalNAC$_2$-31$_a$ được thể hiện dưới đây:

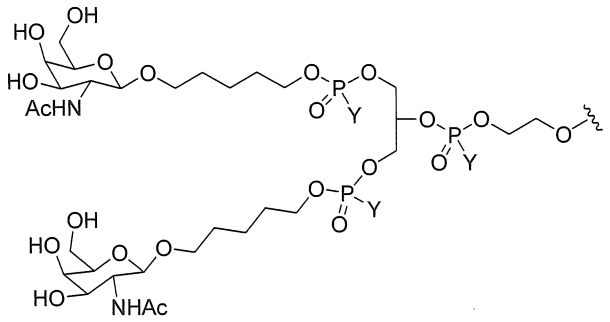


Tổng hợp oligonucleotit chứa thể tiếp hợp GalNAC$_2$-32 được thể hiện dưới đây.





Oligonucleotit 252 chứa nhóm tiếp hợp GalNAC$_2$-32, trong đó Y được chọn từ O, S, được thế hoặc không được thế C_1-C_{10} alkyl, amino, thế amino, aziđo, alkenyl hoặc alkynyl, tổng hợp như được thể hiện trên đây. Phần cụm GalNAC$_2$ (GalNAC$_2$-32$_a$) của nhóm tiếp hợp GalNAC$_2$-32 có thể được kết hợp với một gốc phân cắt được bất kỳ để tạo ra nhiều loại nhóm tiếp hợp. Theo các phương án nhất định, nhóm chứa Y cạnh trực tiếp đầu tận cùng 5' của oligonucleotit là một phần của gốc phân cắt được. Theo các phương án nhất định, Y- chứa nhóm cạnh trực tiếp đầu tận cùng 5' của oligonucleotit là một phần của gốc ổn định, và gốc phân cắt được có mặt ở oligonucleotit. Cấu trúc của GalNAC$_2$-32$_a$ được thể hiện dưới đây:



Ví dụ 112: Các oligonucleotit cải biến chứa thể tiếp hợp $GalNAc_1$

Các oligonucleotit trong Bảng 107 Hướng đích SRB-1 được tổng hợp với nhóm tiếp hợp $GalNAc_1$ để thử nghiệm thêm về hiệu lực của các oligonucleotit chứa các nhóm tiếp hợp mà chứa một phối tử GalNAc.

Bảng 107

ISIS số	Trình tự (5' đến 3')	Cụm GalNAc	CM	SEQ ID NO.
711461	**$GalNAC_1$-25_{a-o},A_{do}** $G_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAC_1$-25_a	A_d	30
711462	**$GalNAC_1$-25_{a-o},**$G_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAC_1$-25_a	PO	28
711463	**$GalNAC_1$-25_{a-o},**$G_{es}{}^{m}C_{eo}$ T_{eo} $T_{eo}{}^{m}C_{eo}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAC_1$-25_a	PO	28
711465	**$GalNAC_1$-26_{a-o},A_{do}** $G_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAC_1$-26_a	A_d	30
711466	**$GalNAC_1$-26_{a-o},**$G_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_e	$GalNAC_1$-26_a	PO	28

711467	**GalNAC$_1$-26$_{a\text{-}o}$**'$G_{es}{}^{m}C_{eo}$ T_{eo} $T_{eo}{}^{m}C_{eo}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_e	GalNAC$_1$-26$_a$	PO	28
711468	**GalNAC$_1$-28$_{a\text{-}o}$'A$_{do}$** $G_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_e	GalNAC$_1$-28$_a$	A$_d$	30
711469	**GalNAC$_1$-28$_{a\text{-}o}$**'$G_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_e	GalNAC$_1$-28$_a$	PO	28
711470	**GalNAC$_1$-28$_{a\text{-}o}$**'$G_{es}{}^{m}C_{eo}$ T_{eo} $T_{eo}{}^{m}C_{eo}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_e	GalNAC$_1$-28$_a$	PO	28
713844	$G_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{eo}'-**GalNAC$_1$-27$_a$**	GalNAC$_1$-27$_a$	PO	28
713845	$G_{es}{}^{m}C_{eo}$ T_{eo} $T_{eo}{}^{m}C_{eo}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{eo}'-**GalNAC$_1$-27$_a$**	GalNAC$_1$-27$_a$	PO	28
713846	$G_{es}{}^{m}C_{eo}$ T_{eo} $T_{eo}{}^{m}C_{eo}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{eo} **A$_{do}$'-GalNAC$_1$-27$_a$**	GalNAC$_1$-27$_a$	A$_d$	29
713847	$G_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{eo}'-**GalNAC$_1$-29$_a$**	GalNAC$_1$-29$_a$	PO	28
713848	$G_{es}{}^{m}C_{eo}$ T_{eo} $T_{eo}{}^{m}C_{eo}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{eo}'-**GalNAC$_1$-29$_a$**	GalNAC$_1$-29$_a$	PO	28
713849	$G_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} $T_{es}{}^{m}C_{es}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{es}{}^{m}C_{es}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{eo}**A$_{do}$'-GalNAC$_1$-29$_a$**	GalNAC$_1$-29$_a$	A$_d$	29
713850	$G_{es}{}^{m}C_{eo}$ T_{eo} $T_{eo}{}^{m}C_{eo}$ A_{ds} G_{ds} $T_{ds}{}^{m}C_{ds}$ A_{ds} T_{ds} G_{ds} $A_{ds}{}^{m}C_{ds}$ T_{ds} $T_{eo}{}^{m}C_{eo}{}^{m}C_{es}$ T_{es} T_{eo}**A$_{do}$'-GalNAC$_1$-29$_a$**	GalNAC$_1$-29$_a$	A$_d$	29

Ví dụ 113: Các oligonucleotit cải biến chứa nhóm tiếp hợp GalNAc hướng đích virut Hepatits B (HBV)

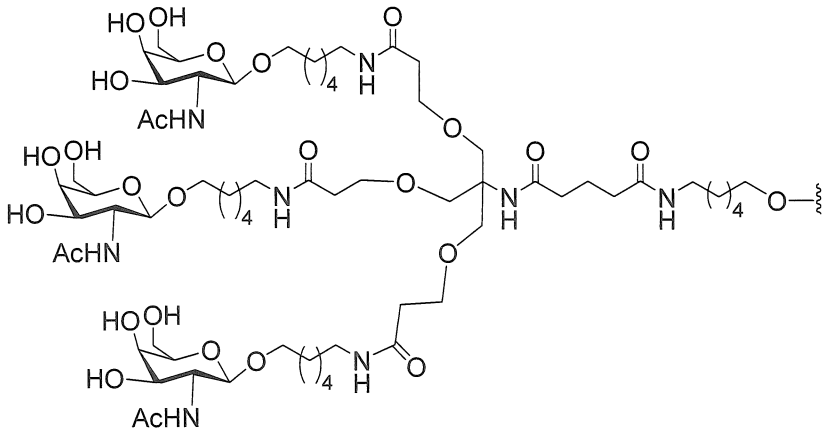
Các oligonucleotit liệt kê trong Bảng 108 dưới đây được thiết kế để hướng đích HBV. Theo các phương án nhất định, gốc phân cắt được là liên kết phosphođieste.

Bảng 108

Trình tự (5' đến 3')	SEQ ID No.
$GalNAc_3$-**3**-$G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}A_{es}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{es}G_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$	3
$GalNAc_3$-**3**-$G_{es}{}^{m}C_{eo}A_{eo}G_{eo}A_{eo}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{eo}G_{eo}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$	3
$GalNAc_3$-7-$G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}A_{es}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{es}G_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$	3
$GalNAc_3$-7-$G_{es}{}^{m}C_{eo}A_{eo}G_{eo}A_{eo}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{eo}G_{eo}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$	3
$GalNAc_3$-10-$G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}A_{es}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{es}G_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$	3
$GalNAc_3$-10-$G_{es}{}^{m}C_{eo}A_{eo}G_{eo}A_{eo}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{eo}G_{eo}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$	3
$GalNAc_3$-13-$G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}A_{es}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{es}G_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$	3
$GalNAc_3$-13-$G_{es}{}^{m}C_{eo}A_{eo}G_{eo}A_{eo}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{eo}G_{eo}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$	3
$G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}A_{es}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{es}G_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$-$GalNAc_3$-**19**	3
$G_{es}{}^{m}C_{eo}A_{eo}G_{eo}A_{eo}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{eo}G_{eo}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$-$GalNAc_3$-**19**	3
$GalNAc_3$-**24**-$G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}A_{es}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{es}G_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$	3
$GalNAc_3$-**24**-$G_{es}{}^{m}C_{eo}A_{eo}G_{eo}A_{eo}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{eo}G_{eo}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$	3
$GalNAc_3$-**25**-$G_{es}{}^{m}C_{es}A_{es}G_{es}A_{es}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{es}G_{es}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$	3
$GalNAc_3$-**25**-$G_{es}{}^{m}C_{eo}A_{eo}G_{eo}A_{eo}G_{ds}G_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}G_{ds}{}^{m}C_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{eo}G_{eo}T_{es}G_{es}{}^{m}C_{e}$	3

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất chứa oligonucleotit cải biến và nhóm tiếp hợp, trong đó oligonucleotit cải biến bao gồm 12 đến 30 nucleosit liên kết và có trình tự nucleobazơ chứa một phần gồm ít nhất 8 nucleobazơ liền kề bổ trợ cho phần chiều dài tương đương của SEQ ID NO: 2, trong đó trình tự nucleobazơ của oligonucleotit cải biến ít nhất 80% bổ trợ cho SEQ ID NO: 2; và trong đó nhóm tiếp hợp bao gồm:



2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó ít nhất một nucleosit của oligonucleotit cải biến chứa đường cải biến.

3. Hợp chất theo điểm 2, trong đó đường cải biến là đường hai vòng.

4. Hợp chất theo điểm 2 hoặc 3, trong đó đường cải biến bao gồm 2'-O-metoxyetyl, etyl bị khóa, 3'-flo-HNA hoặc cầu nối 4'- $(CH_2)_n$-O-2', trong đó n bằng 1 hoặc 2.

5. Hợp chất theo điểm 2, trong đó đường cải biến là 2'-O-metoxyetyl.

6. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-5, trong đó ít nhất một nucleobazơ của oligonucleotit cải biến là nucleobazơ cải biến.

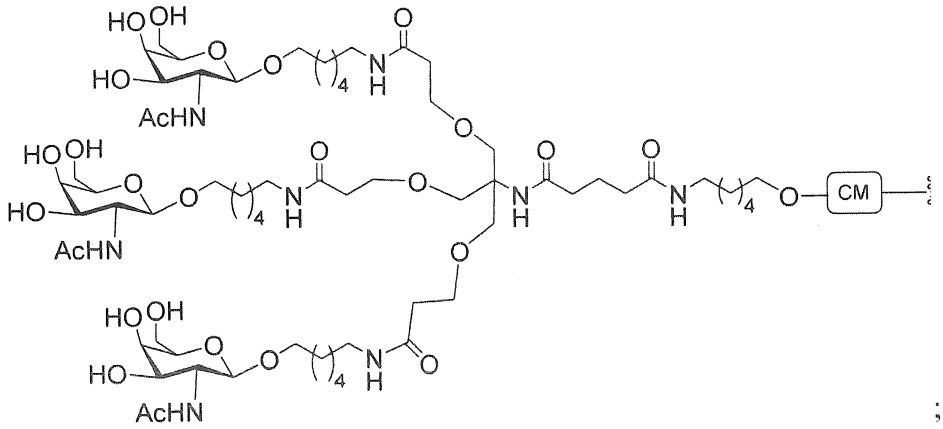
7. Hợp chất theo điểm 6, trong đó nucleobazơ cải biến là 5-metylxytosin.

8. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-7, trong đó nhóm tiếp hợp được liên kết với oligonucleotit cải biến ở đầu 5' của oligonucleotit cải biến.

9. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-7, trong đó nhóm tiếp hợp được liên kết với oligonucleotit cải biến ở đầu 3' của oligonucleotit cải biến.

10. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-9, trong đó nhóm tiếp hợp bao gồm:

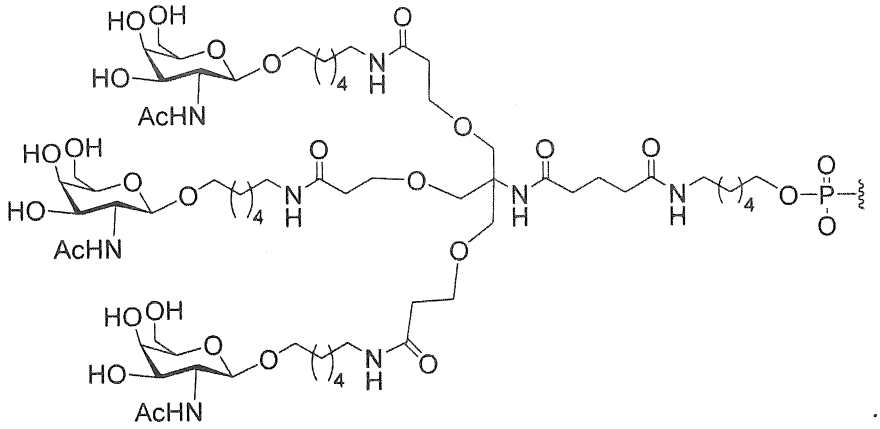
(a)



;

trong đó gốc phân cắt được (CM) là liên kết hoặc nhóm mà có khả năng được tách trong các điều kiện sinh lý; và/hoặc

(b)



.

11. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-10, trong đó mỗi liên kết giữa nucleosit của oligonucleotit cải biến được chọn từ liên kết phosphodieste giữa nucleosit và liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

12. Hợp chất theo điểm 11, trong đó oligonucleotit cải biến chứa ít nhất 2 liên kết phosphodieste giữa nucleosit, tùy ý trong đó oligonucleotit cải biến chứa ít nhất 5 liên kết phosphodieste giữa nucleosit.

13. Hợp chất theo điểm 11 hoặc 12, trong đó oligonucleotit cải biến chứa ít nhất hai liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

14. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 11-13, trong đó oligonucleotit cải biến chứa ít hơn 14 liên kết phosphorothioat, tùy ý trong đó oligonucleotit cải biến chứa ít hơn 13 liên kết phosphorothioat.

15. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-14, trong đó oligonucleotit cải biến là sợi đơn.

16. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-14, trong đó oligonucleotit cải biến là sợi kép.

17. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-16, trong đó oligonucleotit cải biến có:
đoạn hở bao gồm các deoxynucleosit liên kết;
đoạn cánh 5' bao gồm các nucleosit liên kết;
đoạn cánh 3' bao gồm các nucleosit liên kết;
trong đó đoạn hở nằm giữa đoạn cánh 5' và đoạn cánh 3' và trong đó mỗi nucleosit của mỗi đoạn cánh chứa đường cải biến.

18. Hợp chất theo điểm 17, trong đó mỗi liên kết giữa nucleosit trong đoạn hở của oligonucleotit cải biến là liên kết phosphorothioat.

19. Hợp chất theo điểm 18, trong đó oligonucleotit cải biến còn bao gồm ít nhất một liên kết phosphorothioat giữa nucleosit trong mỗi đoạn cánh.

20. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-19, trong đó trình tự nucleobazơ của oligonucleotit cải biến ít nhất 90% bổ trợ cho SEQ ID NO: 2.

21. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-19, trong đó trình tự nucleobazơ của oligonucleotit cải biến ít nhất 95% bổ trợ cho SEQ ID NO: 2.

22. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-19, trong đó trình tự nucleobazơ của oligonucleotit cải biến 100% bổ trợ cho SEQ ID NO: 2.

23. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-22, trong đó oligonucleotit cải biến chứa trình tự nucleobazơ của bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 12-19.

24. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-22, trong đó oligonucleotit cải biến bao gồm nucleosit liên kết bao gồm trình tự nucleobazơ của bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 12-19.

25. Hợp chất theo điểm 1, trong đó oligonucleotit cải biến bao gồm 20 nucleosit liên kết có trình tự nucleobazơ bao gồm SEQ ID NO: 12, và trong đó oligonucleotit cải biến có:

đoạn hở bao gồm mười deoxynucleosit liên kết;

đoạn cánh 5' bao gồm năm nucleosit liên kết;

đoạn cánh 3' bao gồm năm nucleosit liên kết;

trong đó đoạn hở nằm giữa đoạn cánh 5' và đoạn cánh 3', trong đó mỗi nucleosit của mỗi đoạn cánh bao gồm đường 2'-O-metoxyetyl, và trong đó mỗi gốc xytosin là 5-metylxytosin.

26. Hợp chất theo điểm 1, trong đó oligonucleotit cải biến bao gồm 20 nucleosit liên kết có trình tự nucleobazơ bao gồm bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 13-19, và trong đó oligonucleotit cải biến có:

đoạn hở bao gồm mười deoxynucleosit liên kết;

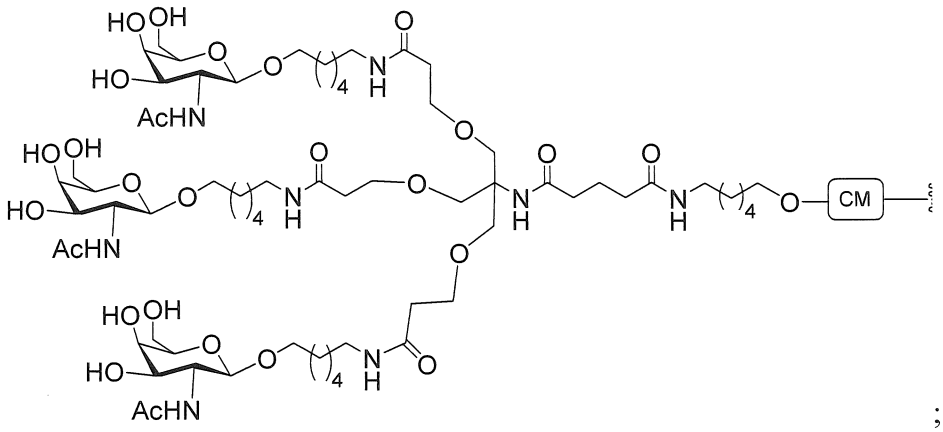
đoạn cánh 5' bao gồm năm nucleosit liên kết;

đoạn cánh 3' bao gồm năm nucleosit liên kết;

trong đó đoạn hở nằm giữa đoạn cánh 5' và đoạn cánh 3', trong đó mỗi nucleosit của mỗi đoạn cánh chứa đường 2'-O-metoxyetyl, và trong đó mỗi gốc xytosin là 5-metylxytosin.

27. Hợp chất theo điểm 25 hoặc 26, trong đó nhóm tiếp hợp bao gồm:

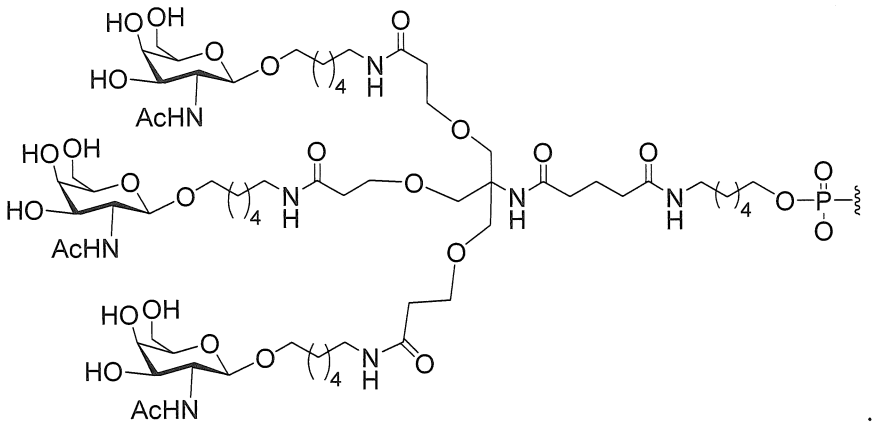
(a)



;

trong đó gốc phân cắt được (CM) là liên kết hoặc nhóm mà có khả năng được tách trong các điều kiện sinh lý; và/hoặc

(b)



28. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 25-27, trong đó mỗi liên kết giữa nucleosit của oligonucleotit cải biến được chọn từ liên kết phosphodieste giữa nucleosit và liên kết phosphorothioat giữa nucleosit.

29. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 25-28, trong đó oligonucleotit cải biến bao gồm ít nhất 2 liên kết phosphodieste giữa nucleosit.

30. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 25-29, trong đó oligonucleotit cải biến chứa ít hơn 14 liên kết phosphorothioat, tùy ý trong đó oligonucleotit cải biến chứa ít hơn 13 liên kết phosphorothioat.

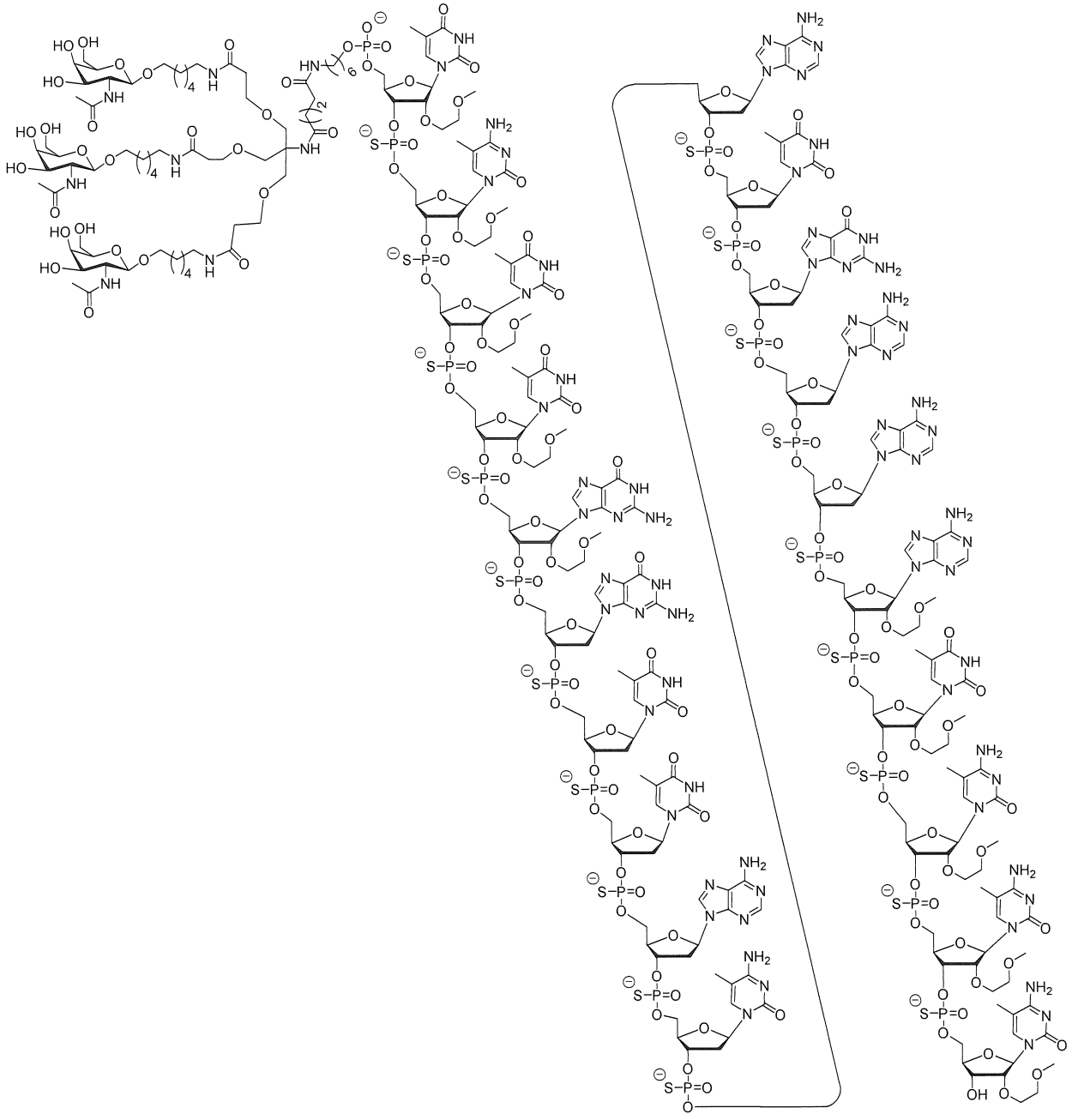
31. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 25-30, trong đó mỗi liên kết giữa nucleosit trong đoạn hở của oligonucleotit cải biến là liên kết phosphorothioat.

32. Hợp chất theo điểm 31, trong đó oligonucleotit cải biến còn bao gồm ít nhất một liên kết phosphorothioat giữa nucleosit trong mỗi đoạn cánh.

33. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 25-27, trong đó mỗi liên kết giữa nucleosit của oligonucleotit cải biến là liên kết phosphorothioat.

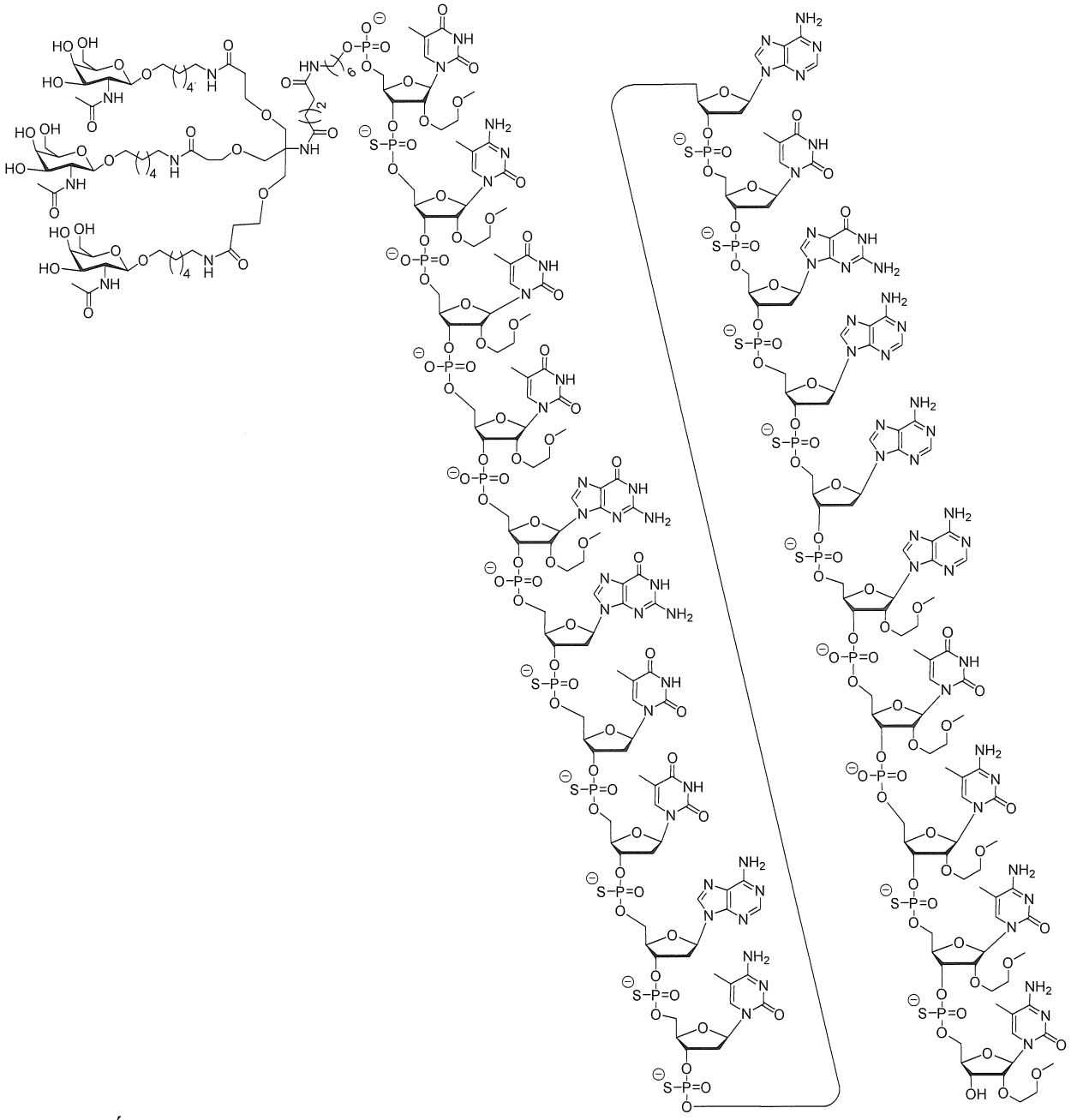
34. Hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 25-33, trong đó oligonucleotit cải biến là sợi đơn.

35. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức:



, hoặc muối dược dụng của nó.

36. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có công thức:



, hoặc muối dược dụng của nó.

37. Chế phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-36 và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.

<120> HỢP CHẤT CHỨA OLIGONUCLEOTIT CẢI BIẾN VÀ NHÓM TIẾP HỢP VÀ CHẾ PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

<130> BIOL0248WO

<150> 61/818,442
<151> 2013-05-01

<150> 61/823,826
<151> 2013-05-15

<150> 61/843,887
<151> 2013-07-08

<150> 61/871,673
<151> 2013-08-29

<150> 61/880,790
<151> 2013-09-20

<150> 61/976,991
<151> 2014-04-08

<150> 61/986,867
<151> 2014-04-30

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 3182
<212> ADN
<213> Virut gây bệnh viêm gan B

<400> 1
aattccacaa cctttcacca aactctgcaa gatcccagag tgagaggcct gtatttccct 60

gctggtggct ccagttcagg agcagtaaac cctgttccga ctactgcctc tcccttatcg 120

tcaatcttct cgaggattgg ggaccctgcg ctgaacatgg agaacatcac atcaggattc 180

ctaggacccc ttctcgtgtt acaggcgggg tttttcttgt tgacaagaat cctcacaata 240

ccgcagagtc tagactcgtg gtggacttct ctcaattttc tagggggaac taccgtgtgt 300

cttggccaaa attcgcagtc cccaacctcc aatcactcac caacctcctg tcctccaact 360

tgtcctggtt atcgctggat gtgtctgcgg cgttttatca tcttcctctt catcctgctg 420

ctatgcctca tcttcttgtt ggttcttctg gactatcaag gtatgttgcc cgtttgtcct 480

ctaattccag gatcctcaac caccagcacg ggaccatgcc gaacctgcat gactactgct 540

caaggaacct ctatgtatcc ctcctgttgc tgtaccaaac cttcggacgg aaattgcacc 600

tgtattccca tcccatcatc ctgggctttc ggaaaattcc tatgggagtg ggcctcagcc 660

cgtttctcct ggctcagttt actagtgcca tttgttcagt ggttcgtagg gctttccccc 720

actgtttggc tttcagttat atggatgatg tggtattggg ggccaagtct gtacagcatc 780

ttgagtccct ttttaccgct gttaccaatt ttcttttgtc tttgggtata catttaaacc 840

ctaacaaaac aaagagatgg ggttactctc tgaattttat gggttatgtc attggaagtt 900

atgggtcctt gccacaagaa cacatcatac aaaaaatcaa agaatgtttt agaaaacttc 960

ctattaacag gcctattgat tggaaagtat gtcaacgaat tgtgggtctt ttgggttttg 1020

ctgccccatt tacacaatgt ggttatcctg cgttaatgcc cttgtatgca tgtattcaat 1080

ctaagcaggc tttcactttc tcgccaactt acaaggcctt tctgtgtaaa caatacctga 1140

acctttaccc cgttgcccgg caacggccag gtctgtgcca agtgtttgct gacgcaaccc 1200

ccactggctg gggcttggtc atgggccatc agcgcgtgcg tggaaccttt tcggctcctc 1260

tgccgatcca tactgcggaa ctcctagccg cttgttttgc tcgcagcagg tctggagcaa 1320

acattatcgg gactgataac tctgttgtcc tctcccgcaa atatacatcg tatccatggc 1380

tgctaggctg tgctgccaac tggatcctgc gcgggacgtc ctttgtttac gtcccgtcgg 1440

cgctgaatcc tgcggacgac ccttctcggg gtcgcttggg actctctcgt ccccttctcc 1500

gtctgccgtt ccgaccgacc acggggcgca cctctcttta cgcggactcc ccgtctgtgc 1560

cttctcatct gccggaccgt gtgcacttcg cttcacctct gcacgtcgca tggagaccac 1620

cgtgaacgcc caccgaatgt tgcccaaggt cttacataag aggactcttg gactctctgc 1680

aatgtcaacg accgaccttg aggcatactt caaagactgt ttgtttaaag actgggagga 1740

gttgggggag gagattagat taaaggtctt tgtactagga ggctgtaggc ataaattggt 1800

ctgcgcacca gcaccatgca acttttttcac ctctgcctaa tcatctcttg ttcatgtcct 1860

actgttcaag cctccaagct gtgccttggg tggctttggg gcatggacat cgacccttat 1920

aaagaatttg gagctactgt ggagttactc tcgtttttgc cttctgactt ctttccttca 1980

gtacgagatc ttctagatac cgcctcagct ctgtatcggg aagccttaga gtctcctgag 2040

cattgttcac ctcaccatac tgcactcagg caagcaattc tttgctgggg ggaactaatg 2100

actctagcta cctgggtggg tgttaatttg gaagatccag catctagaga cctagtagtc 2160

agttatgtca acactaatat gggcctaaag ttcaggcaac tcttgtggtt tcacatttct 2220

tgtctcactt ttggaagaga aaccgttata gagtatttgg tgtctttcgg agtgtggatt 2280

cgcactcctc cagcttatag accaccaaat gcccctatcc tatcaacact tccggaaact 2340

actgttgtta gacgacgagg caggtcccct agaagaagaa ctccctcgcc tcgcagacga 2400

aggtctcaat cgccgcgtcg cagaagatct caatctcggg aacctcaatg ttagtattcc 2460

ttggactcat aaggtgggga actttactgg tctttattct tctactgtac ctgtctttaa 2520

tcctcattgg aaaacaccat cttttcctaa tatacattta caccaagaca ttatcaaaaa 2580

atgtgaacag tttgtaggcc cacttacagt taatgagaaa agaagattgc aattgattat 2640

gcctgctagg ttttatccaa aggttaccaa atatttacca ttggataagg gtattaaacc 2700

ttattatcca gaacatctag ttaatcatta cttccaaact agacactatt tacacactct 2760

atggaaggcg ggtatattat ataagagaga aacaacacat agcgcctcat tttgtgggtc 2820

accatattct tgggaacaag atctacagca tggggcagaa tctttccacc agcaatcctc 2880

tgggattctt tcccgaccac cagttggatc cagccttcag agcaaacaca gcaaatccag 2940

attgggactt caatcccaac aaggacacct ggccagacgc caacaaggta ggagctggag 3000

cattcgggct gggtttcacc ccaccgcacg gaggcctttt ggggtggagc cctcaggctc 3060

agggcatact acaaactttg ccagcaaatc cgcctcctgc ctccaccaat cgccagacag 3120

gaaggcagcc taccccgctg tctccacctt tgagaaacac tcatcctcag gccatgcagt 3180

gg 3182

<210> 2
<211> 938
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2
gttgactaag tcaataatca gaatcagcag gtttgcagtc agattggcag ggataagcag 60

cctagctcag gagaagtgag tataaaagcc ccaggctggg agcagccatc acagaagtcc 120

actcattctt ggcaggatgg cttctcatcg tctgctcctc ctctgccttg ctggactggt 180

atttgtgtct gaggctggcc ctacgggcac cggtgaatcc aagtgtcctc tgatggtcaa 240

agttctagat gctgtccgag gcagtcctgc catcaatgtg gccgtgcatg tgttcagaaa 300

ggctgctgat gacacctggg agccatttgc ctctgggaaa accagtgagt ctggagagct 360

gcatgggctc acaactgagg aggaatttgt agaagggata tacaaagtgg aaatagacac 420

caaatcttac tggaaggcac ttggcatctc cccattccat gagcatgcag aggtggtatt 480

cacagccaac gactccggcc cccgccgcta caccattgcc gccctgctga gcccctactc 540

ctattccacc acggctgtcg tcaccaatcc caaggaatga gggacttctc ctccagtgga 600

cctgaaggac gagggatggg atttcatgta accaagagta ttccattttt actaaagcag 660

tgttttcacc tcatatgcta tgttagaagt ccaggcagag acaataaaac attcctgtga 720

aaggcacttt tcattccact ttaacttgat tttttaaatt cccttattgt cccttccaaa 780

aaaaagagaa tcaaaatttt acaaagaatc aaaggaattc tagaaagtat ctgggcagaa 840

cgctaggaga gatccaaatt tccattgtct tgcaagcaaa gcacgtatta aatatgatct 900

gcagccatta aaaagacaca ttctgtaaaa aaaaaaaa 938

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 3
gcagaggtga agcgaagtgc 20

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 4
ccaatttatg cctacagcct 20

<210> 5
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 5
ggcatagcag caggatg 17

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 6
aggagttccg cagtatggat 20

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 7
gtgaagcgaa gtgcacacgg 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 8
gtgcagaggt gaagcgaagt 20

<210> 9
<211> 16
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 9
aggtgaagcg aagtgc 16

<210> 10
<211> 16
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 10
tccgcagtat ggatcg 16

<210> 11
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 11
aatttatgcc tacagcct 18

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 12
tcttggttac atgaaatccc 20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 13
cttggttaca tgaaatccca 20

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 14
ggaatactct tggttacatg 20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 15
tggaatactc ttggttacat 20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 16
ttttattgtc tctgcctgga 20

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 17
gaatgtttta ttgtctctgc 20

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 18
aggaatgttt tattgtctct 20

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 19
acaggaatgt tttattgtct 20

<210> 20
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 20
agcttcttgt ccagctttat 20

<210> 21
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 21
agcttcttgt ccagctttat a 21

<210> 22
<211> 14
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 22
tcagtcatga cttc 14

<210> 23
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 23
tcagtcatga cttca 15

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 24
gctgattaga gagaggtccc 20

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 25
tcccatttca ggagacctgg 20

<210> 26
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 26
atcagtcatg acttc 15

<210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 27
cggtgcaagg cttaggaatt 20

<210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 28
gcttcagtca tgacttcctt 20

<210> 29
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 29
gcttcagtca tgacttcctt a 21

<210> 30
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 30
agcttcagtc atgacttcct t 21

<210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 31
tggtaatcca ctttcagagg 20

<210> 32
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 32
tggtaatcca ctttcagagg a 21

<210> 33
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 33
tgcttcagtc atgacttcct t 21

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 34
cactgatttt tgcccaggat 20

<210> 35
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 35
cactgatttt tgcccaggat a 21

<210> 36
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 36
aagcttcttg tccagcttta t 21

<210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 37
acccaattca gaaggaagga 20

<210> 38
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 38
acccaattca gaaggaagga a 21

<210> 39
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 39
aacccaattc agaaggaagg a 21

<210> 40
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 40
atggtaatcc actttcagag g 21

<210> 41
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 41
tcttggttac atgaaatccc 20

<210> 42
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 42
tcttggttac atgaaatccc a 21

<210> 43
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 43
attcactttc ataatgctgg 20

<210> 44
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 44
attcactttc ataatgctgg a 21

<210> 45
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 45
atcttggtta catgaaatcc c 21

<210> 46
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 46
atgcatggtg atgcttctga 20

<210> 47
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 47
cagctttatt agggacagca 20

<210> 48
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 48
cagctttatt agggacagca a 21

<210> 49
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 49
acagctttat tagggacagc a 21

<210> 50
<211> 16
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 50
ttcagtcatg acttcc 16

<210> 51
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<220>
<221> dấu hiệu_khác
<222> (1)..(4)
<223> các bazơ ở các vị trí này là ARN

<220>
<221> dấu hiệu_khác
<222> (15)..(18)
<223> các bazơ ở các vị trí này là ARN

<400> 51
gcuucagtca tgactucc 18

<210> 52
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 52
tgctccgttg gtgcttgttc a 21

<210> 53
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit tổng hợp

<400> 53
tgctccgttg gtgcttgttc 20