



(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)



1-0047258

(51)^{2019.01} C07K 14/00; C12N 15/113

(13) B

(21) 1-2019-04694

(22) 23/01/2018

(86) PCT/IB2018/000160 23/01/2018

(87) WO2018/138585 A1 02/08/2018

(30) 62/449,738 24/01/2017 US

(45) 25/06/2025 447

(43) 30/01/2020 382A

(73) OLIPASS CORPORATION (KR)

20th Floor, Ace Dongbaek Tower, 16 Beon-gil, 16-4 Dongbaek Jungang-ro,
Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 17015, Republic of Korea

(72) CHUNG Shin (KR); JUNG Daram (KR); CHO Bongjun (KR); JANG Kangwon
(KR); JEON Hyun Ju (KR); BAE Jinyoung (KR); BAE Taeyeon (KR); JEON Yeasel
(KR); LEE Jun Yeon (KR); PARK Sun Hwa (KR); AN Dan Bi (KR).

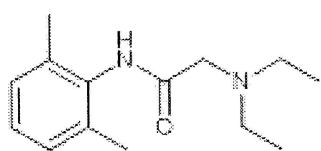
(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) DẪN XUẤT AXIT NUCLEIC PEPTIT NHẪM ĐÍCH TIỀN MARN SCN9A Ở
NGƯỜI

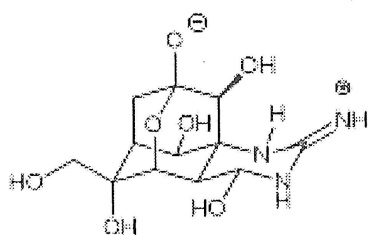
(21) 1-2019-04694

(57) Sáng chế đề cập đến các dẫn xuất axit nucleic peptit nhắm đích vị trí cắt nối 3' của exon 4 trong tiền mARN SCN9A ở người. Các dẫn xuất axit nucleic peptit có khả năng tạo ra (các) biến thể ghép nối mARN SCN9A thiếu exon 4 SCN9A trong các tế bào, và hữu ích để điều trị đau một cách an toàn hoặc các tình trạng liên quan đến hoạt động của $\text{Na}_v1.7$.

Hình 1A



Lidocaine



Tetrodotoxin

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các dẫn xuất axit nucleic peptit nhắm đích bổ thể tiền mARN gen SCN9A ở người để điều trị các cơn đau và rối loạn qua trung gian là kiểu phụ $Na_v1.7$ của kênh natri cảm ứng điện thế, và yêu cầu hưởng quyền ưu tiên của Đơn tạm thời nộp tại Hoa Kỳ số 62/449,738 vào ngày 24 tháng 1 năm 2017, được tham chiếu để tích hợp trọn vẹn vào tài liệu này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các kênh natri cảm ứng điện thế (các VGSC) là các protein xuyên màng gồm các đơn vị phụ α và β . VGSC hoạt động như một cửa ngõ cho các ion natri đi qua màng tế bào. Hoạt động của kênh natri được tạo ra bởi đơn vị phụ α . Kiểu phụ VGSC được xác định theo kiểu phụ của đơn vị phụ α -. Đến nay, có ít nhất 10 kiểu phụ của VGSC, tức là $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, ..., $Na_v1.9$ và Na_x .

Mỗi kiểu phụ VGSC có một đơn vị phụ α riêng biệt, và được dự định để hiển thị vai trò sinh lý đặc trưng tùy thuộc vào trình tự biểu hiện. Ví dụ, kiểu phụ $Na_v1.2$ được biểu hiện ở các nơ-ron trung tâm và dường như có liên quan đến chứng động kinh. [*Human Mol. Genet.* vol 24 (5), 1459-1468 (2015)]. Kiểu phụ $Na_v1.5$ được thể hiện phong phú trong các tế bào cơ tim. Sự ức chế $Na_v1.5$ có thể gây ra hội chứng QT dài và đột tử. [*Cẩm nang Exp. Dược điển.* vol 221, 137–168 (2014)] kiểu phụ $Na_v1.7$ được thể hiện phong phú trong các hạch rễ lưng tủy sống (dorsal root ganglia). Sự điều chỉnh tăng hoạt động của $Na_v1.7$ gây ra chứng đau đầu chi. [*J. Med. Genet.* tập 41, 171 -174 (2004)] Trong khi đó, người thiếu hoạt động di truyền $Na_v1.7$ (nghĩa là bệnh lý về kênh của gen SCN9A) không cảm thấy đau dữ dội, mặc dù những người này được phát hiện là bình thường trong các chức năng cảm giác khác. [*Thiên nhiên*, tập 444, 894-898 (2006)].

Tetrodotoxin (TTX) là một chất độc thần kinh được phát hiện trong cá nóc. TTX cực kỳ độc hại và LD₅₀ sau phúc mạc của nó là 10 µg/Kg ở chuột. [Độc tố tập 6, 693-755 (2014)]. TTX vào qua đường miệng có thể gây ra liệt nhẹ môi và lưỡi, quá mẫn, đỏ mề hôi, đau đầu, run, tê liệt, tím tái, co giật, tiêu chảy, đau bụng, hạ huyết áp, suy hô hấp, rối loạn nhịp tim, hôn mê, v.v.. TTX được biết là gây ra các tác động bất lợi như vậy bằng cách gắn kết không đặc hiệu với các vị trí hoạt động của các kiểu phụ VGSC. Do đó, việc ức chế không đặc hiệu các kiểu phụ VGSC sẽ gây ra các tác dụng phụ nghiêm trọng.

Lidocain là một chất ức chế VGSC không đặc hiệu, và đã được sử dụng rộng rãi như một tác nhân gây tê cục bộ. Khi tiêm tĩnh mạch, lidocain có thể gây ra tác dụng phụ không mong muốn như co giật cơ, nôn mửa, nhịp tim không đều, buồn ngủ, v.v.. Các tác dụng phụ như vậy được coi là do sự ức chế không đặc hiệu của các kiểu phụ của VGSC. Tuy nhiên, sự ức chế Na_v1.5 với lidocain sẽ hữu ích để điều trị nhịp nhanh thất. Tuy nhiên, việc sử dụng lidocain có hệ thống được coi là không mong muốn trong điều trị các cơn đau mãn tính do các tác dụng phụ phát sinh từ sự ức chế không đặc hiệu của các kiểu phụ của kênh natri.

Bệnh lý về kênh của gen SCN9A: gen SCN9A (kiểu phụ 9A của kênh natri) mã hóa đơn vị phụ α của kiểu phụ Na_v1.7 của VGSC. Có một số lượng rất ít người không cảm thấy đau nghiêm trọng nhưng là bình thường trong các chức năng cảm giác khác. Những người như vậy đã được thấy có gen SCN9A bị đột biến để mã hóa kiểu phụ Na_v1.7 không chức năng. [Nature vol 444, 894-898 (2006)]. Điều này được gọi là bệnh lý về kênh của gen SCN9A. Các kiểu hình hành vi của bệnh lý về kênh của gen SCN9A ở người được tái tạo khá nhiều ở chuột bị loại trừ SCN9A. [PLoS One 9 (9): e105895 (2014)] Do đó, sự ức chế chọn lọc kiểu phụ Na_v1.7 sẽ hữu ích để điều trị đau mãn tính một cách an toàn ở người bệnh.

Các chất ức chế có chọn lọc kiểu phụ Na_v1.7 dạng phân tử nhỏ: Phản ánh chức năng sinh lý của VGSC, các vị trí hoạt động của các kiểu phụ VGSC tương tự như cấu trúc 3D của chúng. Bằng cách nhắm đích trực tiếp vào vị trí hoạt động với các chất ức chế phân tử nhỏ, việc ức chế chọn lọc kiểu phụ Na_v1.7 sẽ rất khó

khăn. Lidocain và tetrodotoxin là những ví dụ điển hình cho các chất ức chế không chọn lọc như vậy đối với các kiểu phụ VGSC. (xem Hình 1A)

Các chất ức chế $Na_v1.7$ có độ chọn lọc khiêm tốn so với $Na_v1.5$ (khoảng 8 lần) đã được xác định thông qua một đợt sàng lọc thông lượng cao với một thư viện gồm 200,000 hợp chất để xác định các chất ức chế chọn lọc $Na_v1.8$. [*J. Gen. Physiol.* vol 131(5), 399-405 (2008)]. Một dẫn xuất 1-benzazepin-2-one đã được phát hiện để ức chế một cách chọn lọc $Na_v1.7$ trên $Na_v1.5$ với độ chọn lọc khiêm tốn $Na_v1.7$ (khoảng 8 lần) bằng xét nghiệm điện sinh lý học (xem Hình 1B)

Cho đến nay, một số chất ức chế có chọn lọc kiểu phụ $Na_v1.7$ dạng phân tử nhỏ đã được bộc lộ, và một số đã được đánh giá ở người bệnh. (xem Hình 1C). Ví dụ, funapit (XEN-402/TV-45070) đã được đánh giá ở một số ít bệnh nhân đau đầu chi. [*Pain* vol 153, 80-85 (2012)] Mặc dù funapit cho thấy hoạt động giảm đau, funapit đã cho thấy các tác dụng phụ liên quan đến việc điều trị và giới hạn liều bao gồm chóng mặt và buồn ngủ ở một phần tương đối lớn bệnh nhân đăng ký chữa bệnh. Các tác dụng phụ Hệ thần kinh trung ương cho thấy rằng độ chọn lọc $Na_v1.7$ của funapit có lẽ không đủ cao để điều trị đau mãn tính một cách an toàn.

Raxatrigin (CNV1014802/GSK-1014802) ức chế $Na_v1.7$ cũng như các kiểu phụ VGSC khác. Tuy nhiên, raxatrigin đã được tuyên bố là để ức chế hoạt động chức năng của kênh natri bằng cách ổn định có chọn lọc trạng thái bất hoạt của kênh natri. Mặc dù raxatrigin ức chế các kiểu phụ của kênh natri trong Hệ thần kinh trung ương, nhưng nó được dung nạp tốt ở liều điều trị. [*Dược phẩm J.* 11/03/2016. $Na_v1.7$: một kênh mới để điều trị đau]. Raxatrigin cho thấy hoạt động giảm đau tốt ở bệnh nhân đau dây thần kinh sinh ba, mặc dù các bệnh nhân đã được đăng ký đánh giá lâm sàng dựa trên các tiêu chí tim mạch nghiêm ngặt do độc tính tim tiềm ẩn từ độ chọn lọc $Na_v1.7$ tương đối kém.

PF-05089771 là chất ức chế chọn lọc $Na_v1.7$ với IC_{50} là 11 nM. PF-05089771 được tuyên bố là để ổn định dạng không hoạt động của $Na_v1.7$. [*Biophysical J.* vol 108 (2) Suppl., 1573a-1574a (2015)]. Tiềm năng điều trị của PF-05089771 được đánh giá ở bệnh nhân đau đầu chi hoặc đau răng sau khi

nhỏ răng khôn. Một phân tích dược động học của PF-05089771 cho thấy rằng nồng độ thuốc thấp trong mô đích chịu trách nhiệm cho chứng đau thần kinh có thể là một lời giải thích khả dĩ cho hoạt động giảm đau kém ở người bệnh. [*Clin. Dược động học*. vol 55 (7), 875-87 (2016)]. Mặc dù PF-05089771 đã được tuyên bố là có khả năng chọn lọc $Na_v1.7$ tuyệt vời so với $Na_v1.5$, kích thước phân tử của nó dường như quá lớn để thể hiện sự phân phối tốt đến các mô hệ thần kinh trung ương gây lo ngại trong điều trị đau thần kinh mạn tính.

Các chất ức chế có chọn lọc kiểu phụ $Na_v1.7$ dạng phân tử nhỏ đã được xem xét về mặt cấu trúc. [*Bioorg. Med. Chem. Lett.* vol 24, 3690-3699 (2014)]. Kích thước phân tử của các chất ức chế chọn lọc $Na_v1.7$ như vậy có xu hướng lớn hơn đáng kể so với lidocain, một chất ức chế không chọn lọc của các kiểu phụ VGSC. Độ chọn lọc $Na_v1.7$ đã được cải thiện bằng cách làm cho kích thước phân tử lớn. Mỗi chất ức chế chọn lọc $Na_v1.7$ được coi là gắn kết với một miền riêng biệt bên trong protein $Na_v1.7$ và miền gắn kết thay đổi tùy thuộc vào cấu trúc hóa học của chất ức chế. Trớ trêu thay, hiệu quả giảm đau của thuốc ức chế chọn lọc $Na_v1.7$ không mạnh và không đáp ứng được kỳ vọng được đề xuất từ những phát hiện ở những người mắc bệnh lý về kênh của gen SCN9A. [*Expert Opin. Ther. Targets* vol 20(8), 975-983 (2016)].

Các loại chất ức chế chọn lọc $Na_v1.7$ khác: độc tố peptit ProTx-II từ nọc độc nhện tarantula đã được thấy là ức chế chọn lọc $Na_v1.7$ so với các kiểu phụ VGSC khác. Tuy nhiên, nọc độc cho thấy hoạt động giảm đau yếu trong các mẫu động vật đau viêm cấp tính. [*Mol. Pharmacol.* vol 74, 1476-1484 (2008)]. Mặc dù điện sinh lý của peptit nọc độc được đánh giá trong các tế bào HEK-293 được thiết kế để thể hiện dòng dòng từng kiểu phụ của VGSC, ProTx-II có thể không gắn kết với vị trí hoạt động của $Na_v1.7$ trong các tế bào thần kinh nguyên phát (primary neuronal cells). Các tế bào thần kinh nguyên phát biểu hiện $Na_v1.7$ bao gồm các trình tự α - và β -, trong khi các tế bào HEK-293 thường được thiết kế để chỉ biểu hiện ổn định trình tự α của mỗi kiểu phụ VGSC.

Ssm6a, một peptit 46 mer được tách ra từ nọc độc rắn, đã được phát hiện để ức chế chọn lọc $Na_v1.7$ so với các kiểu phụ VGSC khác. IC_{50} ức chế chọn lọc Na_v

1,7 là 0,3 nM trong các tế bào HEK-293 được thiết kế để biểu hiện quá mức (overexpress) $\text{Na}_v1.7$. Peptit nọc độc của rắn cho thấy hiệu quả giảm đau tương đương với morphin bằng thử nghiệm formol ở chuột, một mô hình đau viêm cấp tính. Peptit 46 mer cũng ức chế dòng natri trong các tế bào DRG ở chuột. Mặc dù peptit nọc độc cho thấy sự ổn định mạnh mẽ trong huyết thanh, hoạt động giảm đau chỉ kéo dài trong vài giờ. [*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* vol 110(43), 17534-17539 (2013)].

SVmab1 là một kháng thể đơn dòng nhắm đích chọn lọc $\text{Na}_v1.7$ so với các kiểu phụ VGSC khác trong các tế bào HEK-293 biểu hiện quá mức mỗi kiểu phụ VGSC. SVmab1 ức chế chọn lọc dòng natri được $\text{Na}_v1.7$ gọi lên với IC_{50} là 30 nM trong các tế bào HEK-293. Kháng thể đơn dòng cho thấy hoạt động giảm đau rõ rệt khi tiêm tĩnh mạch (ở mức 50 mg/Kg), hoặc tiêm tĩnh mạch (10 g, tức là khoảng 0,5 mg/Kg) chống lại thử nghiệm formol ở chuột. Kháng thể đơn dòng cho thấy hoạt động giảm đau rõ rệt khi tiêm tĩnh mạch (ở mức 50 mg/Kg) hoặc tiêm tĩnh mạch (10 g, tức là ca 0,5 mg/Kg) chống lại thử nghiệm formol ở chuột. Dựa trên sự khác biệt về hiệu lực giảm đau của hai đường dùng, sự ức chế $\text{Na}_v1.7$ ở tủy sống hoặc hệ thần kinh trung ương phải là tác nhân chính trong hoạt động giảm đau chống lại thử nghiệm formol. [*Cell* vol 157(6), 1393-1404 (2014)]

Khác biệt về hình thái trong sự đóng góp của $\text{Na}_v1.7$ vào cảm giác đau: Gần đây các DRG ở người từ các tình nguyện viên khỏe mạnh đã được đánh giá bằng phương pháp qPCR về mức độ biểu hiện tương đối của các kiểu phụ VGSC. [*Neurosci. Bull.* DOI 10.1007/s12264-017-0132-3, xuất bản trực tuyến ngày 19 tháng 4 (2017)] Trong các DRG ở người, biểu hiện của kiểu phụ $\text{Na}_v1.7$ là khoảng 50% tổng số biểu hiện VGSC. $\text{Na}_v1.8$ đóng góp vào khoảng 12%. Thời gian ủ tế bào thần kinh DRG ở người trong 24 giờ với paclitaxel được điều chỉnh tăng $\text{Na}_v1.7$ nhưng không phải $\text{Na}_v1.8$, chỉ ra rằng $\text{Na}_v1.7$ phải là phân nhóm phụ quan trọng hơn đối với bệnh lý thần kinh so với $\text{Na}_v1.8$ ở người Những phát hiện này hỗ trợ mạnh mẽ cho các kiểu hình quan sát được trong bệnh lý về kênh của gen SCN9A ở người. [*Nature* vol 444, 894-898 (2006)]

Trong khi đó, sự đóng góp của $\text{Na}_v1.8$ đã chiếm 48% toàn bộ biểu hiện VGSC trong DRG ở chuột. Đóng góp của $\text{Na}_v1.7$ là 18% trong DRG từ những con chuột CD chưa bao giờ được đem ra thí nghiệm (8 đến 10 tuần tuổi). Do đó, nên thận trọng trong việc ngoại suy dữ liệu đau ở động vật đối với liệu điều trị ở người. Tương tự như vậy, các mô hình đau ở động vật cần được đánh giá cẩn thận, tính đến mức độ biểu hiện $\text{Na}_v1.7$ trong mô đích.

Tiền mARN: Thông tin di truyền được mang trên ADN (axit 2-deoxyriboza nucleic). ADN được phiên mã để tạo ra tiền mARN (tiền axit ribonucleic thông tin) trong nhân. Tiền mARN ở động vật có vú thường bao gồm các exon và intron, và exon và intron được kết nối với nhau. Các exon và intron được đánh số như được minh họa trong Hình 1D.

Sự ghép nối của tiền mARN: tiền mARN được xử lý thành mARN sau khi loại bỏ các intron bằng một loạt các phản ứng phức hợp được gọi chung là "sự ghép nối" như được minh họa bằng sơ đồ ở Hình 2A. [*Ann. Rev. Biochem.* 72(1), 291-336 (2003); *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6(5), 386-398 (2005); *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 15(2), 108-121 (2014)].

Quá trình cắt nối được bắt đầu bằng cách hình thành "phức hợp spliceosome E" (tức là phức hợp spliceosome ban đầu) giữa tiền mARN và các nhân tố đáp ứng cắt nối. Trong "phức hợp spliceosome E", U1 gắn kết với khớp nối của exon N và intron N, và U2AF35 gắn kết với khớp nối của intron N và exon (N+1). Như vậy, các khớp nối của exon/intron hoặc intron/exon rất quan trọng đối với sự hình thành phức hợp spliceosome sớm. "Phức hợp spliceosome E" phát triển thành "phức hợp spliceosome A" khi tạo phức thêm với U2. "Phức hợp spliceosome A" trải qua một loạt các phản ứng phức hợp để xóa hoặc tách intron để nối các exon lân cận với nhau.

Tổng hợp protein ribosom: Protein được mã hóa bởi mARN (axit ribonucleic thông tin). Để đáp ứng với sự kích thích tế bào hoặc một cách tự phát, ADN được phiên mã để tạo ra tiền mARN (tiền axit ribonucleic thông tin) trong nhân. Các intron của tiền mARN được tách ra bằng enzyme để tạo ra mARN, sau đó được chuyển vào tế bào chất. Trong tế bào chất, một phức hợp của bộ máy

dịch mã gọi là ribosom gắn kết với mARN và thực hiện quá trình tổng hợp protein khi nó quét các thông tin di truyền được mã hóa dọc theo mARN. [*Biochemistry* vol 41, 4503-4510 (2002); *Cancer Res.* vol 48, 2659-2668 (1988)].

Oligonucleotit đối nghĩa (Antisense Oligonucleotit-ASO): Một oligonucleotit gắn kết với axit nucleic bao gồm ADN, mARN và tiền mARN theo kiểu trình tự đặc biệt (tức là bổ sung) được gọi là oligonucleotit đối nghĩa (ASO).

Ví dụ, nếu một ASO gắn kết chặt chẽ với một mARN trong tế bào chất, thì ASO có thể ức chế sự tổng hợp protein ribosom dọc theo mARN. ASO cần phải có mặt bên trong tế bào chất để ức chế sự tổng hợp protein ribosom của protein đích của nó.

Nếu một ASO gắn kết chặt chẽ với một tiền mARN trong nhân, thì ASO có thể ức chế hoặc điều chỉnh sự ghép nối của tiền mARN thành mARN. ASO cần phải có mặt bên trong nhân để ức chế hoặc điều chỉnh sự ghép nối của tiền mARN thành mARN. Sự ức chế đối nghĩa của việc ghép nối như vậy tạo ra một mARN hoặc các mARN thiếu exon mà ASO nhắm vào. (Các) mARN như vậy được gọi là "(các) biến thể ghép nối" và mã hóa (các) protein nhỏ hơn protein được mã hóa bởi mARN có chiều dài đầy đủ.

Về nguyên tắc, việc ghép nối có thể bị gián đoạn do ức chế sự hình thành "phức hợp spliceosome E". Nếu một ASO gắn kết chặt chẽ với một khớp nối của exon-intron ($5' \rightarrow 3'$), tức là "vị trí cắt nối $5'$ ", thì ASO sẽ ngăn chặn sự hình thành phức hợp giữa tiền mARN và nhân tố U1, và ngăn chặn sự hình thành "phức hợp spliceosome E". Tương tự như vậy, "phức hợp spliceosome E" không thể được hình thành nếu một ASO gắn kết chặt chẽ với một khớp nối intron-exon ($5' \rightarrow 3'$), tức là "vị trí cắt nối $3'$ ". Vị trí cắt nối $3'$ và vị trí cắt nối $5'$ được minh họa bằng sơ đồ trong Hình 2B.

Các oligonucleotit không tự nhiên: Các oligonucleotit ADN hoặc ARN dễ bị thoái hóa bởi các nucleaza nội sinh, làm hạn chế khả năng sử dụng để trị liệu của chúng. Cho đến nay, nhiều loại oligonucleotit không tự nhiên (nghĩa là không có trong tự nhiên) đã được phát triển và nghiên cứu chuyên sâu. [*Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* tập 33, 533-540 (2006)] Một số trong số chúng cho thấy sự

ổn định trao đổi chất mở rộng so với ADN và ARN. Hình 3A là các cấu trúc hóa học của một số oligonucleotit không tự nhiên tiêu biểu. Các oligonucleotit như vậy dự đoán sẽ gắn kết với axit nucleic bổ sung như ADN hoặc ARN.

Oligonucleotit Phosphorothioat: Oligonucleotit phosphorothioat (PTO) là một chất tương tự ADN với một trong những nguyên tử oxy phosphat khung được thế bằng một nguyên tử lưu huỳnh trên mỗi monome. Một sự thay đổi cấu trúc nhỏ như vậy đã làm cho PTO chống lại sự thoái hóa bởi các nucleaza một cách tương đối. [*Ann. Rev. Biochem.* vol 54, 367-402 (1985)].

Phản ánh sự tương đồng trong cấu trúc của khung của PTO và ADN, cả hai đều thâm nhập kém vào màng tế bào trong hầu hết các loại tế bào của động vật có vú. Tuy nhiên, đối với một số loại tế bào biểu hiện dồi dào (các) chất vận chuyển của ADN, thì ADN và PTO cho thấy sự thâm nhập vào tế bào tốt. PTO được tiếp nhận một cách có hệ thống được biết là dễ dàng phân phối đến gan và thận. [*Axit nucleic Res.* tập 25, 3290-3296 (1997)].

Để tạo điều kiện cho sự thâm nhập tế bào của PTO trong ống nghiệm, phương pháp lipofection đã được sử dụng phổ biến. Tuy nhiên, phương pháp lipofection làm thay đổi tính chất vật lý của màng tế bào, gây độc tính tế bào, và do đó sẽ không lý tưởng cho việc sử dụng để điều trị trong cơ thể sống một cách lâu dài.

Trong 30 năm qua, các PTO đối nghĩa và các biến thể của PTO đã được đánh giá lâm sàng để điều trị ung thư, rối loạn miễn dịch, các bệnh chuyển hóa, v.v. [*Biochemistry* vol 41, 4503-4510 (2002); *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* vol 33, 533-540 (2006)]. Nhiều ứng cử viên thuốc đối nghĩa như vậy đã không được phát triển thành công một phần do tính thấm tế bào kém của PTO. Để khắc phục tình trạng thấm tế bào kém, PTO cần phải được dùng ở liều cao cho hoạt động trị liệu. Tuy nhiên, các PTO được biết là có liên quan đến độc tính giới hạn liều bao gồm tăng thời gian đông máu, kích hoạt bổ sung, bệnh ống thận, kích hoạt tế bào Kupffer, và kích thích miễn dịch bao gồm lách to, tăng sản bạch huyết, thâm nhiễm tế bào đơn nhân. [*Clin. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* vol 33, 533-540 (2006)].

Nhiều PTO đối nghĩa đã được phát hiện thể hiện hoạt tính lâm sàng đối với các bệnh với sự đóng góp đáng kể từ gan hoặc thận. Mipomersen là một chất tương tự PTO ức chế sự tổng hợp apoB-100, một protein liên quan đến vận chuyển cholesterol LDL. Mipomersen biểu thị hoạt tính lâm sàng trong một quần thể bệnh nhân xơ vữa động mạch rất có thể là do sự phân phối ưu tiên của nó đến gan. [*Circulation* vol 118 (7), 743-753 (2008)]. ISIS-113715 là một chất tương tự PTO đối nghĩa ức chế sự tổng hợp protein tyrosin phosphatase 1B (PTP1B), và đã được phát hiện thấy hoạt động trị liệu ở bệnh nhân tiểu đường typ II. [*Curr. Opin. Mol. Ther.* vol 6, 331-336 (2004)]

Axit nucleic dạng khóa (Locked Nucleic Acid): Trong axit nucleic dạng khóa (LNA), vòng ribose khung của ARN bị hạn chế về mặt cấu trúc để tăng ái lực gắn kết đối với ARN hoặc ADN. Do đó, LNA có thể được coi là một chất tương tự ADN hoặc ARN có ái lực cao. [*Biochemistry* vol 45, 7347-7355 (2006)]. LNA cũng cho thấy tính thâm tế bào kém.

Oligonucleotit Phosphorodiamidat Morpholino: Trong oligonucleotit phosphorodiamidat morpholino (PMO), phosphat và 2-deoxyriboza khung của ADN được thế bằng phosphoramidat và morpholin tương ứng. [*Appl. Microbiol. Biotechnol.* tập 71, 575-586 (2006)] Trong khi khung ADN bị tích điện âm, khung PMO không bị tích điện. Do đó, gắn kết giữa PMO và mARN không có lực đẩy tĩnh điện giữa các khung, và có xu hướng mạnh hơn so với gắn kết giữa ADN và mARN. Vì PMO khác biệt rõ rệt so với ADN trong cấu trúc hóa học, PMO sẽ không được nhận biết bởi chất vận chuyển thuộc gan, các chất này nhận biết ADN hoặc ARN. Tuy nhiên, PMO không dễ dàng xâm nhập màng tế bào.

Axit Nucleic Peptit: Axit Nucleic Peptit (PNA) là một polypeptit với N-(2-amintyl) glyxin là khung đơn vị, và được phát hiện bởi Tiến sĩ Nielsen và đồng nghiệp. [*Khoa học* tập 254, 1497-1500 (1991)]. Cấu trúc hóa học và danh pháp viết tắt của PNA được minh họa trong Hình 3B. Giống như ADN và ARN, PNA cũng gắn kết một cách chọn lọc với axit nucleic bổ sung. [*Tự nhiên (London)* tập 365, 566-568 (1992)]. Trong gắn kết với axit nucleic bổ sung, đầu N- của PNA

được coi là tương đương với "đầu 5' " của ADN hoặc ARN và đầu C của PNA tương đương với "đầu 3' " của ADN hoặc ARN.

Giống như PMO, khung PNA không tích điện. Do đó, gắn kết giữa PNA và ARN có xu hướng mạnh hơn gắn kết giữa ADN và ARN. Do PNA khác biệt rõ rệt với ADN trong cấu trúc hóa học, PNA sẽ không được công nhận bởi chất vận chuyển gan nhận biết ADN, và cho thấy tình trạng phân phối mô khác với tình trạng phân phối mô của ADN hoặc PTO. Tuy nhiên, PNA cũng thâm nhập kém vào màng tế bào của động vật có vú. (*Adv. Drug Delivery Rev.* tập 55, 267-280, 2003).

Nucleobazơ được sửa đổi để cải thiện tính thấm màng của PNA: PNA được tạo ra có tính thấm cao đối với màng tế bào động vật có vú bằng cách đưa các nucleobazơ biến đổi với lipid cation hoặc tương đương cộng hóa trị của nó. Các cấu trúc hóa học của các nucleobazơ biến đổi như vậy được thể hiện trong Hình 3C. Các nucleobazơ biến đổi như vậy của xytosin, adenin và guanin đã được phát hiện để sinh ra giống lai có thể dự đoán và bổ sung với guanin, thymin, và xytosin, một cách tương ứng. [PCT Appl. No. PCT/KR2009/001256; EP2268607; US8680253].

Việc kết hợp các nucleobazơ đã bị biến đổi như vậy vào PNA mô phỏng các tình huống của phương pháp lipofection. Bằng phương pháp lipofection, các phân tử oligonucleotit với khung phosphat được bọc bằng các phân tử lipid cation như lipofectamin, và các phức hợp lipofectamin/oligonucleotit như vậy có xu hướng xâm nhập vào màng tế bào khá dễ dàng so với các phân tử oligonucleotit trần.

Ngoài khả năng thấm màng tốt, những dẫn xuất PNA bị biến đổi này đã được phát hiện thấy ái lực cực mạnh đối với axit nucleic bổ sung. Ví dụ: giới thiệu 4 đến 5 nucleobazơ biến đổi trên các dẫn xuất PNA 11-mer đến 13-mer dễ dàng mang lại mức tăng T_m là 20°C hoặc cao hơn trong sự hình thành kép với ADN bổ sung. Các dẫn xuất PNA như vậy rất nhạy cảm với bắt cặp sai với bazơ đơn. Một sự bắt cặp sai với bazơ đơn dẫn đến sự mất T_m từ 11 đến 22°C tùy thuộc vào loại bazơ bị biến đổi cũng như trình tự PNA.

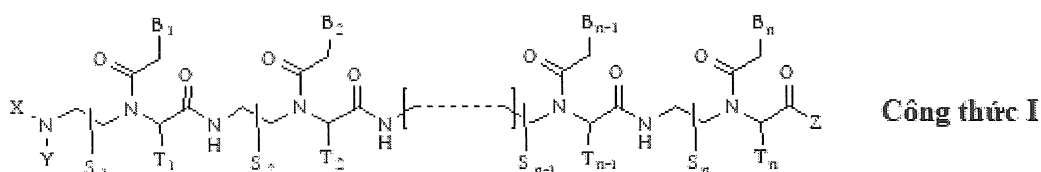
ARN can thiệp kích thước nhỏ (siARN): ARN can thiệp kích thước nhỏ (siARN) đề cập đến ARN sợi kép gồm 20-25 cặp cơ sở. [*Microbiol.Mol. Biol. Rev.* tập 67 (4), 657-685 (2003)] Sợi đối nghĩa của siARN bằng cách nào đó tương tác với protein để tạo thành một "Phức hợp im lặng do ARN gây ra" (RISC). Sau đó, RISC gắn kết với một phần nhất định của mARN bổ sung cho sợi đối nghĩa của siARN. mARN phức hợp với RISC này trải qua sự phân tách. Như vậy siARN bằng cách xúc tác gây ra sự phân tách của mARN đích của nó, và do đó ức chế sự biểu hiện protein thông qua mARN. RISC không phải lúc nào cũng gắn kết với trình tự bổ sung đầy đủ trong mARN đích của nó, điều này làm tăng mối lo ngại liên quan đến tác dụng ngoài đích của liệu pháp siARN. Giống như các nhóm oligonucleotit khác có khung ADN hoặc ARN, siARN có tính thấm tế bào kém và do đó có xu hướng tỏ ra hoạt động trị liệu trong ống nghiệm hoặc trong cơ thể sống kém trừ khi được điều chế đúng cách hoặc được biến đổi hóa học để có tính thấm màng tốt.

SCN9A siARN: Một nghiên cứu trước đây đã tiết lộ các siARN nhắm vào trình tự 19 mer [(5' → 3') GAUUAUGGCUACACGAGCU] bên trong exon 8 của mARN SCN9A ở người. [[US Patent 8183221] sau khi tiêm truyền, các siARN được tuyên bố hoạt động trị liệu trong các mô hình động vật của đau thần kinh và đau do viêm. Các siARN được cho là điều chỉnh giảm biểu hiện Na_v1.7 trong các tế bào DRG ở chuột.

ASO SCN9A: các ASO 2'-O-metoxyletyl PTO nhắm đích bổ thể mARN SCN9A ở chuột được đánh giá về khả năng ức chế biểu hiện protein Na_v1.7 của chúng trong DRG ở chuột khi tiêm dưới da một mũi 30 mg ASO cho mỗi đối tượng. Một ASO đã ức chế sự biểu hiện của protein Na_v1.7 trong DRG hơn 80% trong tuần thứ 4 sau tiêm. Các ASO SCN9A này đã ức chế cơn đau một cách cơ học trong xét nghiệm Randall-Selitto. Hiệu quả tương quan lớn với mức độ biểu hiện của protein Na_v1.7 trong DRG. [*Pain*, Mohan and Fitzsimmons et al. in press].

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế này là cung cấp một dẫn xuất axit nucleic peptit được biểu thị bởi Công thức I (Formula I) hoặc muối được dụng của nó:



n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 10 đến 25;

Hợp chất có Công thức I bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người, hoặc bổ sung một phần cho tiền mARN SCN9A ở người với một hoặc hai vị trí bất cặp sai;

S₁, S₂, ..., S_{n-1}, S_n, T₁, T₂, ..., T_{n-1}, và T_n một cách độc lập thể hiện deuterido [D], hydrido [H], alkyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế;

X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, formyl [HC (=O)-], aminocacbonyl [NH₂-C(=O)-], aminothiocacbonyl [NH₂-C(=S)-], alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxyacacbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxyacacbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminacacbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminacacbonyl được thế

hoặc không được thế, alkylaminthiocacbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminthiocacbonyl được thế hoặc không được thế, alkyloxythiocacbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxythiocacbonyl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, arylsulfonyl được thế hoặc không được thế, gốc alkylphosphonyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc arylphosphonyl được thế hoặc không được thế;

Z thể hiện hydrido, hydroxy, alkyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, amin được thế hoặc không được thế, alkyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ tự nhiên bao gồm adenin, thymin, guanin, xytosin và uraxin và các nucleobazơ không tự nhiên; và

ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên với một gốc amino được thế hoặc không được thế gắn kết cộng hóa trị với gốc nucleobazơ.

Hợp chất có Công thức I gây ra việc nhảy "exon 4" trong tiền mARN SCN9A ở người, tạo ra (các) biến thể ghép nối mARN SCN9A ở người thiếu "exon 4", và do đó rất hữu ích để điều trị đau, hoặc các điều kiện liên quan đến hoạt động của $Na_v1.7$.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1A. Các cấu trúc hóa học của lidocain và tetrodotoxin, chất ức chế phân tử nhỏ không chọn lọc của các kênh natri cảm ứng điện thế.

Hình 1B. Một chất ức chế 1-benzazepin-2-one của $Na_v1.7$ cho thấy độ chọn lọc khiếm tốn của $Na_v1.7$ so với $Na_v1.5$.

Hình 1C. Các cấu trúc hóa học của funapit, raxatrigen và PF-05089771, các chất ức chế phân tử nhỏ có chọn lọc của các kênh natri cảm ứng điện thế.

Hình 2A. Sơ đồ minh họa việc đánh số exon và intron bên trong tiền mARN.

Hình 2B. Sơ đồ minh họa quá trình cắt nối dẫn đến sự xóa intron N.

Hình 2C. Sơ đồ minh họa vị trí cắt nối 3' và vị trí cắt nối 5' liên quan đến phức hợp spliceosome E.

Hình 3A. Cấu trúc hóa học điển hình của ADN và các axit nucleic không tự nhiên.

Hình 3B. Minh họa cấu trúc hóa học và thuật ngữ viết tắt của PNA.

Hình 3C. Ví dụ về các nucleobazơ biến đổi được sử dụng để cải thiện tính thâm tế bào của axit nucleic peptit.

Hình 4. Ví dụ về các nucleobazơ (bị biến đổi) tự nhiên hoặc không tự nhiên có thể lựa chọn làm dẫn xuất axit nucleic peptit của Công thức I

Hình 5A. Ví dụ về các gốc alkyl được thế hoặc không được thế, có thể lựa chọn làm dẫn xuất axit nucleic peptit của Công thức I.

Hình 5B. Ví dụ về alkylaxyl được thế hoặc không được thế, và các gốc arylaxyl được thế hoặc không được thế, có thể lựa chọn làm dẫn xuất axit nucleic peptit của Công thức I.

Hình 5C. Ví dụ về alkylamin được thế, arylamin được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, arylsulfonyl được thế hoặc không được thế, alkylphosphonyl được thế hoặc không được thế, các gốc arylphosphonyl được thế hoặc không được thế, có thể lựa chọn làm dẫn xuất axit nucleic peptit của Công thức I.

Hình 5D. Ví dụ về alkyloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, và các gốc arylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, có thể lựa chọn làm dẫn xuất axit nucleic peptit của Công thức I.

Hình 5E. Ví dụ về alkyloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminothiocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminothiocarbonyl được thế hoặc không được thế, và các gốc alkyloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế, có thể lựa chọn làm dẫn xuất axit nucleic peptit của công thức I.

Hình 6. Các cấu trúc hóa học của các monome PNA được viết tắt là A (adenin), G (guanin), T (thymin), C (xytosin), C (pOq), A (p), A (pOq), G (p) và G (pOq).

Hình 7. Các cấu trúc hóa học của các chữ viết tắt dùng để mô tả nhóm thế cho đầu N- hoặc đầu C- trong Hợp chất có Công thức I.

Hình 8. Cấu trúc hóa học của dẫn xuất PNA 14 mer được biểu thị là "(N → C) Fethoc-TA (5) AA (5) TA (5) -CGC (102) -AA (5) AA (5) A-NH₂"

Hình 9. Cấu trúc hóa học của dẫn xuất PNA 16 mer được viết tắt là "(N → C) Fethoc-AG (5) khoảng (5) CT-TA (5) C-GC (102) AA (5) AA (202) -A- Lys-NH₂".

Hình 10. Cấu trúc hóa học của các monome Fmoc-PNA được sử dụng để tổng hợp các dẫn xuất PNA của sáng chế này.

Hình 11. Sơ đồ minh họa một chu kỳ kéo dài monome điển hình được áp dụng trong SPPS của sáng chế này.

Hình 12A. Biểu đồ sắc ký HPLC pha đảo C₁₈ của "ASO 2" trước khi tinh chế HPLC.

Hình 12B. Biểu đồ sắc ký HPLC pha đảo C₁₈ của "ASO 2" sau khi tinh chế HPLC.

Hình 13. Dữ liệu phổ khối lượng ES-TOF thu được nhờ điều trị bằng "ASO 2" sau khi tinh chế HPLC.

Hình 14A. Dữ liệu điện di của các sản phẩm RT-PCR lồng SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "ASO 7" trong 5 giờ ở 0 (đối chứng âm - negative control), 10 hoặc 100 zM.

Hình 14B. Dữ liệu giải trình tự Sanger của dải sản phẩm PCR được chỉ định để nhảy Exon 21-23.

Hình 14C. Dữ liệu điện di của các sản phẩm RT-PCR lồng nhau của SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "ASO 7" trong 24 giờ ở 0 (kiểm soát âm), 1, 10, 100 hoặc 1.000 aM.

Hình 15A. Dữ liệu qPCR của mARN SCN9A có độ dài đầy đủ trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "ASO 7" ở 0 (kiểm soát âm), 0,1, 1 hoặc 10 aM trong 24 giờ. cADN được tổng hợp bằng PCR một bước. (thanh lỗi theo lỗi tiêu chuẩn; và * với $p < 0,05$).

Hình 15B. Dữ liệu qPCR của mARN SCN9A có độ dài đầy đủ trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "ASO 7" ở 0 (kiểm soát âm), 0,1, 1 hoặc 10 aM trong 24 giờ. cADN đã được tổng hợp bằng cách sử dụng hexamers ngẫu nhiên. (thanh lỗi theo lỗi tiêu chuẩn; và ** với $p < 0,05$).

Hình 16A. Sự đảo ngược của dị cảm đau (allodynia) gây ra bởi sự thất L5/L6 ở chuột SD được tiêm dưới da nhờ điều trị bằng "ASO 7" ở 0 (đối chứng âm), 1, 3 hoặc 6 pmol/Kg, 2 ngày một lần. Ngưỡng von Frey cho thuốc pregabalin 30 mpk đã được thêm vào bằng cách áp dụng dữ liệu lịch sử nội bộ. (* với $p < 0,05$ theo thử nghiệm t của nhà nghiên cứu).

Hình 16B. Sự đảo ngược của allodynia gây ra bởi SNL (sự thất L5/L6) ở chuột SD được tiêm dưới da "ASO 2" ở 0 (đối chứng âm), 20 pmol/Kg QD, 100 pmol/Kg QD, 500 pmol/Kg QD và 100 pmol/Kg Q2D. Ngưỡng von Frey cho thuốc pregabalin 30 mpk đã được thêm vào bằng cách áp dụng dữ liệu lịch sử nội bộ. (* với $p < 0,05$ theo thử nghiệm t của nhà nghiên cứu)

Hình 17A. Các tín hiệu trung bình (average traces) của cường độ huỳnh quang tế bào (trái) trong các tế bào thần kinh DRG L5 ở chuột "thất L5/L6" sau 30 giờ ủ nhờ điều trị bằng "ASO 7" ở 0 (đối chứng âm), 100 hoặc 1.000 zM cùng với hình ảnh huỳnh quang mẫu của một tế bào thần kinh DRG được xử lý bằng "CoroNa Green" (phải).

Hình 17B. Các tín hiệu trung bình của cường độ huỳnh quang tế bào trong các tế bào thần kinh DRG L5 ở chuột mà không có "sự thất L5/L6" sau 30 giờ ủ nhờ điều trị bằng "ASO 7" ở 0 (đối chứng âm), 100 hoặc 1.000 zM.

Hình 18A. Sự đảo ngược của allodynia gây ra bởi DPNP ở chuột được tiêm dưới da với 100 pmol/Kg "ASO 1". (thanh lỗi theo lỗi tiêu chuẩn; * với $p < 0,05$ theo thử nghiệm t của nhà nghiên cứu)

Hình 18B. Sự đảo ngược của allodynia gây ra bởi DPNP ở chuột được tiêm dưới da với 60 pmol/Kg "ASO 2" hoặc 30 pmol/Kg "ASO 6" trong các ngày 0, 2 và 4. Ngưỡng von Frey không có DPNP đã được thêm vào bằng cách áp dụng dữ liệu lịch sử nội bộ. (thanh lỗi theo lỗi tiêu chuẩn; * và ** với $p < 0,05$ và $p < 0,01$ theo thử nghiệm t của nhà nghiên cứu, một cách tương ứng)

Hình 19A. Ưc chế cơn đau gây ra bởi mũi tiêm intraplantar 5% formol ở những con chuột được tiêm dưới da nhờ điều trị bằng "ASO 7" ở mức 0 (đối chứng âm), 10, 30 hoặc 100 pmol/Kg. (thanh lỗi do lỗi tiêu chuẩn; * $p < 0,05$ theo thử nghiệm t của nhà nghiên cứu)

Hình 19B. Ưc chế cơn đau gây ra bởi mũi tiêm intraplantar 5% formol ở những con chuột được tiêm dưới da nhờ điều trị bằng "ASO 10" ở mức 0 (đối chứng âm), 15, 50 hoặc 150 pmol/Kg. (thanh lỗi do lỗi tiêu chuẩn; * $p < 0,05$ theo thử nghiệm t của nhà nghiên cứu)

Hình 20A. Hình ảnh IHC đại diện theo nhóm đối với biểu hiện Nav1.7 trong DRG L5 ở chuột được tiêm dưới da nhờ điều trị bằng "ASO 7" ở 0 (đối chứng âm), 1, 6 hoặc 30 pmol/Kg.

Hình 20B. Mức độ biểu hiện Nav1.7 tương đối trong DRG L5 ở chuột được tiêm dưới da nhờ điều trị bằng "ASO 7" ở 0 (kiểm soát âm), 1, 6 hoặc 30 pmol/Kg. (thanh lỗi theo lỗi tiêu chuẩn; * với $p < 0,05$ và ** với $p < 0,01$ theo thử nghiệm t của nhà nghiên cứu)

Hình 21A. Sự đảo ngược của allodynia ở chuột thắt L5/L6 bằng việc tiêm dưới da "ASO 10" ở mức 1 (tăng lên 30 pmol/Kg trong Ngày 3 và 7), 3 và 10 pmol/Kg. (thanh lỗi theo lỗi tiêu chuẩn; * với $p < 0,05$ theo thử nghiệm t của nhà nghiên cứu).

Hình 21B. Sự đảo ngược của allodynia ở chuột thắt L5/L6 bằng cách tiêm dưới da "ASO 10" ở mức 100 pmol/Kg, cứ 4 hoặc 5 ngày một lần, hoặc bằng cách uống thuốc pregabalin 30 mpk.

Hình 22. Hình ảnh IHC của biểu hiện Nav1.7 (màu đỏ), thân tế bào thần kinh (màu xanh lá cây) và nhân (màu xanh) với các mẫu tủy sống lấy từ nhóm điều trị "ASO 10" được định lượng trong Ngày 0 và 4 (hình ảnh bảng trên cùng) và từ nhóm kiểm soát âm (hình ảnh bảng dưới cùng). (N = 3 mỗi nhóm)

Hình 23A. Dữ liệu Western blot về biểu hiện Nav1.7 trong các tế bào thần kinh DRG L5 được xử lý bằng "ASO 10" trong 24 giờ ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1,000 zM.

Hình 23B. Dữ liệu qPCR về mARN SCN9A có độ dài đầy đủ với sự tổng hợp cADN bằng phương pháp PCR một bước (hình bên trái) và tổng hợp cADN bằng cách sử dụng hexamers ngẫu nhiên (hình bên phải) trong các tế bào thần kinh DRG L5 được xử lý bằng "ASO 10" ở 0 (kiểm soát âm), 10, 30, 100 hoặc 300 zM trong 24 giờ. (thanh lỗi theo lỗi tiêu chuẩn; * với $p < 0,05$ và ** với $p < 0,01$ theo thử nghiệm t của nhà nghiên cứu)

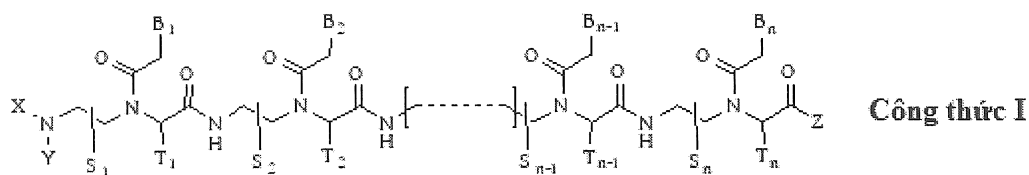
Hình 23C. Trung bình gập dữ liệu dòng natri trong các tế bào thần kinh DRG L5 được xử lý bằng "ASO 10" trong khoảng 6 giờ ở 0 (đối chứng âm), 10, 30 hoặc 100 zM (hình bên trái); và các tín hiệu trung bình của dữ liệu dòng natri gập đối với các tế bào kiểm soát âm và các tế bào được xử lý với 100 zM "ASO 10" trong khoảng 6 giờ (hình bên phải). Dữ liệu dòng natri đã được gập như bình thường so với kích thước tế bào. (N đề cập đến số lượng tế bào được gập để phân tích dữ liệu cho mỗi nhóm; thanh lỗi theo lỗi tiêu chuẩn và * với $p < 0,05$ theo thử nghiệm t của nhà nghiên cứu)

Hình 24A. Sự đảo ngược của allodynia gây ra bởi thất L5/L6 ở chuột SD được tiêm dưới da nhờ điều trị bằng "ASO 7" ở 0 (đối chứng âm), 5, 25, 125 hoặc 625 fmol/Kg trong các ngày 0, 3 và 6. Nhóm xử lý bằng thuốc pregabalin 30 mg/Kg po được đưa vào làm đối chứng dương tính. (N = 8 mỗi nhóm; và thanh lỗi theo lỗi tiêu chuẩn)

Hình 24B. Thay đổi ngưỡng đau bằng thử nghiệm Randall-Selitto ở chuột được tiêm dưới da nhờ điều trị bằng "ASO 2" ở mức 0 (đối chứng âm) hoặc 100 pmol/Kg trong Ngày 0 và 1. (thanh lỗi theo lỗi tiêu chuẩn; * với $p < 0,05$ theo thử nghiệm t của nhà nghiên cứu)

Mô tả chi tiết sáng chế

Mục đích của sáng chế này là đề cập đến dẫn xuất axit nucleic peptit được biểu thị bởi Công thức I (Formula I) hoặc muối được dụng của nó:



trong đó:

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 10 đến 25;

Hợp chất có Công thức I có ít nhất một phần trùng lặp bổ sung 10 mer với trình tự tiền mARN 14 mer của [(5' → 3') UGUUUAGGUACACU] bên trong tiền mARN SCN9A ở người;

Hợp chất có Công thức I bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người, hoặc bổ sung một phần cho tiền mARN SCN9A ở người với một hoặc hai vị trí bất cặp sai;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$, và T_n một cách độc lập thể hiện deuterido [D], hydrido [H], alkyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế;

X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, formyl [HC (=O)-], aminocacbonyl [NH₂-C(=O)-], aminothiocacbonyl [NH₂-C(=S)-], alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxyacacbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxyacacbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminothiocacbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminothiocacbonyl được thế hoặc không được thế, alkyloxythiocacbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxythiocacbonyl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, arylsulfonyl được thế hoặc không được thế, gốc alkylphosphonyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc arylphosphonyl được thế hoặc không được thế;

Z thể hiện hydrido, hydroxy, alkyloxy được thể hoặc không được thể, aryloxy được thể hoặc không được thể, amino được thể hoặc không được thể, alkyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc aryl được thể hoặc không được thể;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ tự nhiên bao gồm adenin, thymine, guanin, xytosin và uraxin và các nucleobazơ không tự nhiên; và

ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên với một gốc amino được thể hoặc không được thể gắn kết cộng hóa trị với gốc nucleobazơ.

Hợp chất có Công thức I gây ra việc nhảy "exon 4" trong tiền mARN SCN9A ở người, tạo ra (các) biến thể ghép nối mARN SCN9A ở người thiếu "exon 4", và do đó rất hữu ích để điều trị đau, hoặc các điều kiện liên quan đến hoạt động của $Na_v1.7$.

Trong một số phương án của Hợp chất có Công thức I, n là một số nguyên được chọn từ 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 và 24.

Hợp chất có Công thức I gắn kết bổ sung vào vị trí cắt nối 3 kéo dài qua điểm nối của intron 3 và exon 4 bên trong tiền mARN SCN9A ở người được đọc ra từ ADN bộ gen [Trình tự tham chiếu NCBI: NC_000002.12]. Trình tự 14 mer của [(5' → 3') UGUUUAGGUACACU] bên trong tiền mARN SCN9A ở người là một trình tự của vị trí cắt nối 3' bao gồm 7-mer từ "intron 3" và 7-mer từ "exon 4". Như vậy, trình tự tiền mARN 14-mer có thể được biểu diễn theo quy ước là [(5' → 3') uguuuag | GUACACU], trong đó các trình tự intron và exon được biểu thị bằng các chữ cái "thường" và "viết hoa" một cách tương ứng, và mỗi nối giữa "intron 3" và "exon 4" được đánh dấu bằng " | ".

Sự biểu thị theo quy ước cho tiền mARN được minh họa rõ hơn bằng trình tự 30 mer của [(5' → 3') gaauuuguguuuag | GUACACUUUUACUGG] kéo dài qua mỗi nối của "intron 3" và "exon 4" bên trong tiền mARN SCN9A ở người. Việc đánh số exon có thể thay đổi tùy theo bản sao mARN SCN9A được ghi chép. Việc cung cấp trình tự SCN9A 30-mer là để xác định một cách dứt khoát vị trí cắt

nội đích của hợp chất có Công thức I bất kể việc đánh số exon của tiền mARN SCN9A được ghi chép.

Các cấu trúc hóa học của các nucleobazơ tự nhiên (tức là tìm thấy trong tự nhiên) hoặc không tự nhiên (tức là không có trong tự nhiên) trong dẫn xuất PNA có Công thức I được minh họa bằng ví dụ trong Hình 4. Các nucleobazơ tự nhiên hoặc không tự nhiên của sáng chế này bao gồm nhưng không giới hạn các nucleobazơ được đưa ra trong Hình 4. Việc cung cấp các nucleobazơ tự nhiên và không tự nhiên như vậy là các ví dụ minh họa cho sự đa dạng của các nucleobazơ có thể chấp nhận được, và do đó không nên được hiểu để giới hạn phạm vi của sáng chế này.

Các nhóm thế được thông qua để mô tả dẫn xuất PNA có Công thức I được minh họa trong Hình 5A đến 5E. Hình 5 A đưa ra các ví dụ cho các gốc alkyl được thế hoặc không được thế. Các gốc alkylaxyl được thế hoặc không được thế và các gốc arylaxyl được thế hoặc không được thế được minh họa trong Hình 5B. Hình 5C minh họa các ví dụ về alkylamin được thế, arylamin được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, arylsulfonyl được thế hoặc không được thế, alkylphosphonyl được thế hoặc không được thế, và các gốc arylphosphonyl được thế hoặc không được thế. Hình 5D đưa ra các ví dụ về alkyloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, và các gốc arylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế. Trong Hình 5E, đưa ra các ví dụ về alkyloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminothiocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminothiocarbonyl được thế hoặc không được thế, và các gốc alkyloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế. Việc cung cấp các nhóm thế như vậy là để minh họa sự đa dạng của các nhóm thế có thể chấp nhận được, và do đó không nên được hiểu để giới hạn phạm vi của sáng chế. Người có hiểu biết trong lĩnh vực này có thể dễ dàng nhận ra rằng trình tự oligonucleotit là yếu tố quan trọng đối với gắn kết đặc hiệu theo trình tự của oligonucleotit với trình tự tiền mARN đích lên các nhóm thế ở đầu N hoặc đầu C.

Hợp chất có Công thức I gắn kết chặt chẽ với ADN bổ sung như được minh họa trong tình trạng kỹ thuật trước đây [PCT/KR2009/001256]. Sự bắt cặp giữa dẫn xuất PNA có Công thức I và ADN hoặc ARN bổ sung có độ dài đầy đủ của nó tạo ra một giá trị T_m quá cao để được xác định một cách chắc chắn trong dung dịch đậm. Hợp chất PNA của Công thức I mang lại giá trị T_m cao với các ADN bổ sung có chiều dài ngắn hơn.

Hợp chất của Công thức I gắn kết chặt chẽ với vị trí cắt nối đích 3' của tiền mARN SCN9A ở người được phiên mã từ gen SCN9A ở người, và cản trở sự hình thành "phức hợp sớm spliceosome" liên quan đến exon đích của hợp chất nói trên. Do hợp chất của sáng chế này ngăn chặn triệt để sự hình thành "phức hợp sớm spliceosome", "exon 4" SCN9A bị cắt ra để tạo ra (các) biến thể ghép nối mARN SCN9A thiếu "exon 4". Kết quả là, hợp chất của sáng chế này gây ra sự nhảy "exon 4" trong mARN SCN9A.

Do ái lực mạnh mẽ của hợp chất nói trên đối với trình tự tiền mARN bổ sung, hợp chất của sáng chế này cũng có thể gắn kết chặt chẽ với trình tự tiền mARN bổ sung một phần với một hoặc hai vị trí bắt cặp sai và gây ra sự nhảy exon đích bên trong tiền mARN SCN9A. Ví dụ, ngay cả khi một dẫn xuất PNA 14 mer của Công thức I có một vị trí bắt cặp sai duy nhất với tiền mARN SCN9A, thì ASO SCN9A 14-mer vẫn gây ra nhảy "exon 4" trong mARN SCN9A.

Hợp chất của Công thức I có tính thấm tế bào tốt và có thể dễ dàng được đưa vào tế bào dưới dạng oligonucleotit "trần" như được minh họa bằng ví dụ trong tình trạng kỹ thuật trước đây [PCT/KR2009/001256]. Như vậy, hợp chất của sáng chế này gây ra sự nhảy "exon 4" trong tiền mARN SCN9A để tạo ra (các) biến thể ghép nối mARN SCN9A thiếu "exon 4" SCN9A trong các tế bào được xử lý bằng hợp chất có Công thức I dưới dạng oligonucleotit "trần". Hợp chất nói trên không yêu cầu bất kỳ phương tiện hoặc công thức nào để phân phối vào tế bào để có tiềm năng gây ra sự nhảy exon đích một cách hiệu quả trong các tế bào. Hợp chất có Công thức I dễ dàng gây ra sự nhảy "exon 4" SCN9 trong các tế bào được xử lý bằng hợp chất của sáng chế này dưới dạng oligonucleotit "trần" ở nồng độ dưới 10-15 mol mỗi lít.

Các tế bào được xử lý bằng hợp chất có Công thức I dưới dạng "oligonucleotit trần" biểu lộ nồng độ mRNA SCN9A có độ dài đầy đủ thấp hơn, và do đó cho thấy hoạt động chức năng của $Na_v1.7$ yếu hơn so với các tế bào không được xử lý hợp chất. Hợp chất có Công thức I ức chế biểu hiện $Na_v1.7$ trong các tế bào thần kinh hoặc mô với việc sử dụng có hệ thống dưới dạng "oligonucleotit trần". Như vậy, hợp chất nói trên rất hữu ích để điều trị đau hoặc rối loạn liên quan đến biểu hiện quá mức của $Na_v1.7$.

Dẫn xuất PNA có Công thức I có thể được sử dụng một cách hệ thống dưới dạng oligonucleotit "trần" để gây ra sự nhảy "exon 4" SCN9A trong các mô đích, và do đó ức chế sự biểu hiện của mRNA SCN9A có độ dài đầy đủ. Hợp chất có Công thức I không yêu cầu một công thức cụ thể để tăng sự phân phối có hệ thống đến các mô đích cho hoạt động trị liệu hoặc sinh học dự định. Thông thường, hợp chất có Công thức I được hòa tan trong PBS hoặc nước muối sinh lý, và được sử dụng một cách có hệ thống để kích thích hoạt động trị liệu mong muốn trong các mô đích. Các hợp chất của sáng chế này không cần được điều chế nhiều hoặc tràn lan để kích thích các hoạt tính trị liệu có hệ thống.

Hợp chất có Công thức I có thể được sử dụng dưới dạng kết hợp với axit hoặc bazơ được dùng bao gồm nhưng không giới hạn trong số natri hydroxit, kali hydroxit, axit hydrocloric, axit metanesulfonic, axit xitric, axit trifloroaxetic, v.v.

Dẫn xuất PNA có Công thức I hoặc loại muối được dùng của nó có thể được sử dụng cho một đối tượng với sự kết hợp với một tá dược được dùng bao gồm nhưng không giới hạn trong số axit xitric, axit hydrocloric, axit tartaric, axit stearic, polyetylenglycol, polypropylenglycol, etanol, isopropanol, natri bicacbonat, nước cất, chất bảo quản, v.v.

Hợp chất của sáng chế có thể được sử dụng một cách có hệ thống cho một đối tượng với liều điều trị từ 1 fmol/Kg đến cao hơn 1nmol/Kg, có thể sẽ thay đổi tùy theo sự phân chia liều, điều kiện hoặc tình trạng của đối tượng, v.v.

Được ưu tiên là một dẫn xuất PNA có Công thức I, hoặc muối được dùng của nó:

trong đó,

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 10 đến 25;

Hợp chất có Công thức I có ít nhất một phần trùng lặp bổ sung 10 mer cho trình tự tiền mARN 14-mer của [(5' → 3') UGUUUAGGUACACU] bên trong tiền mARN SCN9A ở người;

Hợp chất có Công thức I bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người, hoặc bổ sung một phần cho tiền mARN SCN9A ở người với một hoặc hai vị trí bất cặp sai;

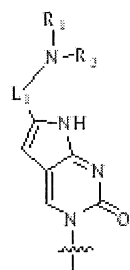
$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n một cách độc lập thể hiện deuterido, hydrido, alkyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế;

X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, formyl, aminocacbonyl, aminothiocabonyl, alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminothiocabonyl được thế hoặc không được thế, arylaminothiocabonyl được thế hoặc không được thế, alkyloxythiocabonyl được thế hoặc không được thế, aryloxythiocabonyl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, arylsulfonyl được thế hoặc không được thế, gốc alkylphosphonyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc arylphosphonyl được thế hoặc không được thế;

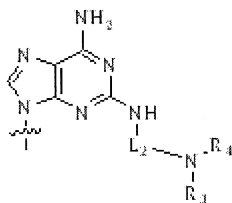
Z thể hiện hydrido, hydroxy, alkyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, amin được thế hoặc không được thế, alkyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ tự nhiên bao gồm adenin, thymine, guanin, xytosin và uraxin và các nucleobazơ không tự nhiên; và

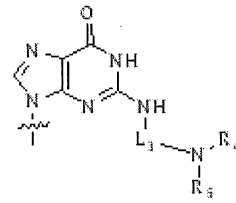
ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được thể hiện bằng Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV:



Công thức II



Công thức III

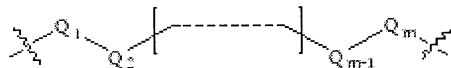


Công thức IV

trong đó,

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 và R_6 được lựa chọn một cách độc lập từ hydrido, và gốc alkyl được thế hoặc không được thế;

L_1, L_2 và L_3 là một gắn kết cộng hóa trị được thể hiện bằng Công thức V gắn kết cộng hóa trị giữa nhóm amino bazơ với gốc nucleobazơ:



Công thức V

trong đó,

Q_1 và Q_m là gốc metylen ($-\text{CH}_2-$) được thế hoặc không được thế và Q_m được liên kết trực tiếp với nhóm amino bazơ;

$Q_2, Q_3, \dots$, và Q_{m-1} được chọn một cách độc lập từ metylen được thế hoặc không được thế, oxy ($-\text{O}-$), lưu huỳnh ($-\text{S}-$) và gốc amino được thế hoặc không được thế [$-\text{N}(\text{H})-$, hoặc $-\text{N}$ (nhóm thế)-]; và,

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 15.

Trong một số phương án nhất định như vậy, $S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$, and T_n một cách độc lập thể hiện deuterido hoặc gốc hydrido và Z thể hiện hydrido, hydroxy, alkyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, gốc amino được thế hoặc không được thế. Trong các phương án khác như vậy, ít nhất một trong các $S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$, và T_n một cách độc lập thể hiện alkyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế, và/hoặc Z thể hiện alkyl được thế hoặc không được thế hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế.

Trong một số phương án, m trong Công thức V là một số nguyên được chọn từ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 và 14.

Điều đáng quan tâm là một oligome PNA của Công thức I, hoặc muối được dụng của nó:

trong đó,

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 21;

Hợp chất có Công thức I có ít nhất một phần trùng lặp bổ sung 10 mer cho trình tự tiền mARN 14-mer của $[(5' \rightarrow 3') \text{UGUUUAGGUACACU}]$ bên trong tiền mARN SCN9A ở người;

Hợp chất có Công thức I bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người, hoặc bổ sung một phần cho tiền mARN SCN9A ở người với một hoặc hai vị trí bất cặp sai;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n là gốc hydrido;

X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkyl được thể hoặc không được thể, aryl được thể hoặc không được thể, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, arylaxyl được thể hoặc không được thể, alkyloxyacacbonyl được thể hoặc không được thể, aryloxyacacbonyl được thể hoặc không được thể, alkylaminocacbonyl được thể hoặc không được thể, arylaminocacbonyl được thể hoặc không được thể, alkylsulfonyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc arylsulfonyl được thể hoặc không được thể;

Z thể hiện gốc amino được thể hoặc không được thể;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ tự nhiên bao gồm adenin, thymine, guanin, xytosin và uraxin và các nucleobazơ không tự nhiên;

ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được thể hiện bằng Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 và R_6 được lựa chọn một cách độc lập từ hydrido, và gốc alkyl được thể hoặc không được thể;

Q_1 và Q_m là gốc metylen được thể hoặc không được thể, và Q_m được liên kết trực tiếp với nhóm amino bazơ;

$Q_2, Q_3, \dots$ và Q_{m-1} được lựa chọn một cách độc lập từ metylen được thể hoặc không được thể, oxy và gốc amino; và

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 11.

Trong một phương án của oligome PNA của Công thức I, hoặc muối được dụng của nó, X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkyl được thể hoặc không được thể, aryl được thể hoặc không được thể, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, arylaxyl được thể hoặc không được thể, alkyloxyacacbonyl được thể hoặc không được thể hoặc gốc aryloxyacacbonyl được thể hoặc không được thể.

Trong một phương án khác của oligome PNA của Công thức I, hoặc muối được dụng của nó, ít nhất một trong số X và Y đại diện một cách độc lập với alkylaminocacbonyl được thể hoặc không được thể, arylaminocacbonyl được thể

hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc arylsulfonyl được thế hoặc không được thế.

Được quan tâm đặc biệt là một dẫn xuất PNA có Công thức I, hoặc muối được dụng của nó:

trong đó,

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 19;

Hợp chất có Công thức I có ít nhất một phần trùng lặp bổ sung 10 mer cho trình tự tiền mARN 14-mer của [(5' → 3') UGUUUAGGUACACU] bên trong tiền mARN SCN9A ở người;

Hợp chất có Công thức I bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n là gốc hydrido;

X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxyacetyl thay được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc arylsulfonyl được thế hoặc không được thế;

Z thể hiện gốc amino được thế hoặc không được thế;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ tự nhiên bao gồm adenin, thymin, guanin, xytosin và uraxin và các nucleobazơ không tự nhiên;

ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được thể hiện bằng Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 và R_6 được lựa chọn một cách độc lập từ hydrido, và gốc alkyl được thế hoặc không được thế;

Q_1 và Q_m là gốc metylen, và Q_m được gắn kết trực tiếp với nhóm amino bazơ;

$Q_2, Q_3, \dots$ và Q_{m-1} được chọn một cách độc lập từ metylen, oxy và gốc amino; và

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 9.

Trong một phương án của oligome PNA của Công thức I, hoặc muối được dụng của nó, X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể.

Trong một phương án khác của oligome PNA của Công thức I, hoặc muối được dụng của nó, ít nhất một trong số X và Y một cách độc lập thể hiện alkyl được thể hoặc không được thể, aryl được thể hoặc không được thể, arylaxyl được thể hoặc không được thể, alkylaminocarbonyl được thể hoặc không được thể, alkylsulfonyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc arylsulfonyl được thể hoặc không được thể.

Được quan tâm cao là một oligome PNA của Công thức I, hoặc muối được dụng của nó:

trong đó,

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 19;

Hợp chất có Công thức I có ít nhất một phần trùng lặp bổ sung 10 mer cho trình tự tiền mARN 14-mer của [(5' → 3') UGUUUAGGUACACU] bên trong tiền mARN SCN9A ở người;

Hợp chất có Công thức I bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n là gốc hydrido;

X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkyl được thể hoặc không được thể, aryl được thể hoặc không được thể, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, arylaxyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể;

Z thể hiện gốc amino được thể hoặc không được thể;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ tự nhiên bao gồm adenin, thymin, guanin, xytosin và uraxin và các nucleobazơ không tự nhiên;

ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được thể hiện bằng Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV;

R_1, R_3 và R_5 là gốc hydrido và R_2, R_4 và R_6 một cách độc lập thể hiện hydrido, hoặc gốc alkyl được thể hoặc không được thể;

Q_1 và Q_m là gốc metylen, và Q_m được liên kết trực tiếp với nhóm amino bazơ;

$Q_2, Q_3, \dots$, và Q_{m-1} được chọn một cách độc lập từ metylen, gốc oxy; và, m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8.

Trong một phương án của oligome PNA của Công thức I, hoặc muối được dụng của nó, X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể.

Trong một phương án khác của oligome PNA của Công thức I, hoặc muối được dụng của nó, ít nhất một trong số X và Y một cách độc lập thể hiện alkyl được thể hoặc không được thể, aryl được thể hoặc không được thể, hoặc arylaxyl được thể, hoặc không được thể.

Được quan tâm nhiều hơn là một dẫn xuất PNA có Công thức I, hoặc muối được dụng của nó:

trong đó,

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 19;

Hợp chất có Công thức I có ít nhất một phần trùng lặp bổ sung 10 mer cho trình tự tiền mARN 14-mer của $[(5' \rightarrow 3') \text{UGUUUAGGUACACU}]$ bên trong tiền mARN SCN9A ở người;

Hợp chất có Công thức I bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n là gốc hydrido;

X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, arylaxyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể;

Z thể hiện gốc amino được thể hoặc không được thể;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ adenin, thymin, guanin, xytosin, và các nucleobazơ không tự nhiên;

ít nhất năm trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được thể hiện bằng Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 và R_6 là gốc hydrido;

Q_1 và Q_m là gốc metylen, và Q_m được liên kết trực tiếp với nhóm amino bazơ;

$Q_2, Q_3, \dots$, và Q_{m-1} được chọn một cách độc lập từ metylen và gốc oxy; và, m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8.

Trong một phương án của oligome PNA của Công thức I, hoặc muối được dụng của nó, X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể.

Trong một phương án của oligome PNA của Công thức I, hoặc muối được dụng của nó, ít nhất một trong số X và Y một cách độc lập thể hiện gốc arylaxyl được thể hoặc không được thể.

Được quan tâm cao nhất là một dẫn xuất PNA có Công thức I, hoặc muối được dụng của nó:

trong đó,

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 19;

Hợp chất có Công thức I có ít nhất một phần trùng lặp bổ sung 10 mer cho trình tự tiền mARN 14-mer của [(5' → 3') UGUUUAGGUACACU] bên trong tiền mARN SCN9A ở người;

Hợp chất có Công thức I bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n là gốc hydrido;

X là gốc hydrido;

Y thể hiện alkylaxyl được thể hoặc không được thể, arylaxyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể;

Z thể hiện gốc amino được thể hoặc không được thể;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ adenin, thymine, guanin, xytosin, và các nucleobazơ không tự nhiên;

ít nhất năm trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được thể hiện bằng Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 và R_6 là gốc hydrido;

L_1 thể hiện $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$, $-CH_2-O-(CH_2)_2-$, $-CH_2-O-(CH_2)_3-$, $-CH_2-O-(CH_2)_4-$, hoặc $-CH_2-O-(CH_2)_5-$ với đầu bên phải được liên kết trực tiếp với nhóm amino bazơ; và,

L_2 và L_3 được chọn một cách độc lập từ $-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_6-$, $-(CH_2)_7-$, $-(CH_2)_8-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_2-$, and $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ với đầu bên phải được liên kết trực tiếp với nhóm amino bazơ.

Trong một phương án của oligome PNA của Công thức I, hoặc muối được dụng của nó, Y thể hiện gốc alkylaxyl được thể hoặc không được thể hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể.

Trong một phương án khác của oligome PNA của Công thức I, hoặc muối được dụng của nó, Y thể hiện arylaxyl được thể hoặc không được thể.

Được quan tâm đặc biệt là một dẫn xuất PNA có Công thức I, được chọn từ nhóm các hợp chất được đưa ra dưới đây, hoặc muối được dụng của nó:

$(N \rightarrow C)$ Fethoc-TA(5)A-A(5)AG(6)-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)-NH₂;

$(N \rightarrow C)$ Fethoc-TA(5)A-A(4)AG(6)-TG(6)T-A(5)CC(1O3)-TA(5)A-A-NH₂;

$(N \rightarrow C)$ Fmoc-TA(5)A-A(4)AG(6)-TG(6)T-A(5)CC(1O3)-TA(5)A-A-NH₂;

$(N \rightarrow C)$ Piv-Leu-TA(5)A-A(5)AG(3O2)-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)-NH₂;

$(N \rightarrow C)$ Fethoc-TA(5)T-A(5)AG(6)-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)-NH₂;

(N → C) Benzoyl-Gly-TA(2O2)A-A(5)AG(6)-TG(6)T-A(5)CT-TA(5)A-Lys-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA(5)-A-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-CG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA(5)-A-NH₂;

(N → C) Fmoc-AA(5)G-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA(5)-A-NH₂;

(N → C) Benzensulfonyl-AA(5)G-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA(5)-A-NH₂;

(N → C) Ac-AA(5)G-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA(5)-A-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(3)A-A(5)-NH₂;

(N → C) Fmoc-AA(5)G-TG(6)T-AC(1O2)C-TAA(5)-A-NH₂;

(N → C) Metyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(3)A-A(5)-Gly-Arg-NH₂;

(N → C) Fethoc-A(5)AG-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA-A(5)-NH₂;

(N → C) Ac-Val-A(5)AG-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA-A(5)-NH₂;

(N → C) Fethoc-AAG(6)-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)AC(1O2)-TA(5)T-A(5)C-NH₂;

(N → C) H-AA(5)G-TG(2O2)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) Fethoc-Lys-Leu-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(2O2)A-A(5)C-Lys-NH₂;

(N → C) [N-(2-Phenyletyl)amin]cacbonyl-AA(3)G-TG(5)T-A(5)CC(1O5)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) N,N-Phenyl-Me-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(4)C-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TA(5)T-A(5)CC(1O2)-TG(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) p-Toluenesulfonyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) p-Toluenesulfonyl-AA(5)G-TG(2O3)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-Lys-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(2O3)T-A(5)CC(1O3)-TA(7)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) n-Propyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O3)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) Benzoyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) Benzyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O3)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) Benzoyl-AA(5)G-TG(3)T-A(5)CC(2O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-Leu-Lys-NH₂;

(N → C) Piv-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) Fethoc-TA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)C-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) Methylsulfonyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) n-Hexyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) n-Hexanoyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) n-Hexanoyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(8)A-A(5)C-

NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(3)G-TG(2O2)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(3)G-TG(2O2)T-A(5)CC(1O3)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(3)G-TG(2O2)T-A(5)CC(2O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) FAM-HEX-HEX-AA(3)G-TG(2O2)T-A(5)CC(2O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) Fethoc-A(5)GT-G(5)TA(5)-CC(1O2)T-A(5)AA(5)-C-NH₂;

(N → C) Fethoc-AG(5)T-G(7)TA-CC(1O2)T-AA(6)A-C-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(6)G-TG(5)T-A(6)CC(1O2)-TA(6)A-A(6)C-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(3)CA-C(1O5)AA-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TCT-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(3)CA-C(1O5)AA-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TCT-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(3)CA(3)-CTA-NH₂;

(N → C) Fethoc-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(3)CA-CA(7)A-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(3)CA(5)-C-NH₂;

(N → C) Fethoc-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(3)CA(5)-C-NH₂;

(N → C) p-Toluenesulfonyl-TG(2O3)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(3)CA-C-Lys-NH₂;

(N → C) Fethoc-TG(5)T-A(5)CC(2O2)-TA(5)A-A(3)CA-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Piv-TG(5)T-A(5)CC(2O2)-TA(5)A-A(3)CA-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Benzoyl-TG(5)T-A(5)CC(2O2)-TA(5)A-A(3)CA-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Propionyl-TG(5)T-A(5)CC(2O2)-TA(5)A-A(3)CA-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Fethoc-TG(5)T-A(5)CC(2O2)-TA(5)A-A(3)CA-CA(5)A-Arg-Val-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)G-NH₂;

(N → C) Fethoc-AG(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)G-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)CA-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)GG-NH₂;

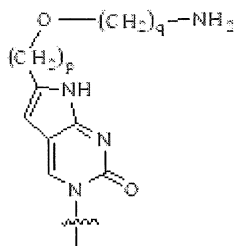
và,

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-ACC(1O2)-TA(5)A-A(5)CA(5)-C-NH₂;

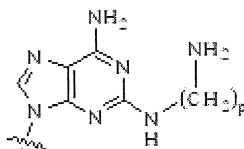
trong đó,

A, G, T và C là các monome PNA với nucleobazơ tự nhiên là adenin, guanin, thymin và xytosin, một cách tương ứng;

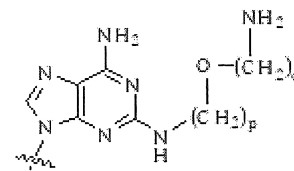
C (pOq), A (p), A (pOq), G (p) và G (pOq) là các monome PNA có nucleobazơ không tự nhiên được thể hiện bằng công thức VI, Công thức VII, Công thức VIII, Công thức IX và Công thức X, một cách tương ứng;



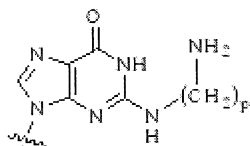
Công thức VI



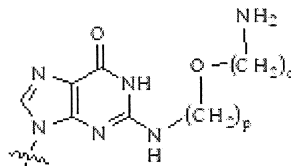
Công thức VII



Công thức VIII



Công thức IX



Công thức X

trong đó,

p và q là các số nguyên; và,

các chữ viết tắt cho các nhóm thế đầu N- và C- được định nghĩa cụ thể như sau: "Fmoc-" là tên viết tắt của "[(9-fluorenyl) metyloxy] cacbonyl-"; "Fethoc-" cho "[2- (9-fluorenyl) etyl-1-oxy] cacbonyl-"; "Ac-" cho "axetyl-"; "n-Hexanoyl-" cho "1- (n-hexanoyl) -"; "Benzoyl-" cho "benzencabonyl-"; "Piv-" cho "pivalyl-"; "n-Propyl-" cho "1- (n-propyl) -"; "n-Hexyl-" cho "1- (n-hexyl) -"; "H-" cho "hydrido-"; "p-Toluenesulfonyl" cho "(4-metylbenzen) -1-sulfonyl-"; "Benzensulfonyl" cho "benzen-1-sulfonyl-"; "Metylsulfonyl" cho "metyl-1-sulfonyl-"; "-Lys-" cho gốc axit amin "lysin"; "-Val-" cho gốc axit amin "valin"; "-Leu-" cho gốc axit amin "leuxin"; "-Arg-" cho gốc axit amin "arginin"; "-Gly-" cho gốc axit amin "glyxin"; "[N- (2-Phenyletyl) amin] cacbonyl-" cho "[N-1- (2-phenyletyl) -amin] cacbonyl-"; "Benzyl-" cho "1- (phenyl) metyl-"; "Phenyl-" cho "phenyl-"; "Me-" cho "metyl-"; "-HEX-" cho "6-amin-1-hexanoyl-", "FAM-" cho "5, hoặc 6-fluorescein-cacbonyl-" (hỗn hợp đồng phân) và "-NH₂" cho nhóm amin không được thế ".

Hình 6 cung cấp chung các cấu trúc hóa học cho các monome PNA được viết tắt là A, G, T, C, C (pOq), A (p), A (pOq), G (p) và G (pOq). Như đã thảo luận trong tình trạng kỹ thuật trước đây [PCT/KR2009/001256], C (pOq) được coi là một monome PNA biến đổi thể hiện "xytosin" do sự lai tạo ưa thích của nó

với "guanin". A (p) và A (pOq) được coi là các monome PNA biến đổi đóng vai trò như là "adenin" do ái lực chặt chẽ của chúng đối với "thymin". Tương tự như vậy G (p) và G (pOq) được coi là các monome PNA biến đổi tương đương với "guanin" nhờ vào sự ghép đôi bazơ bổ sung của chúng với "xytosin".

Hình 7 cung cấp một cách rõ ràng các cấu trúc hóa học cho một loạt các chữ viết tắt cho các nhóm thế được sử dụng để tạo ra sự đa dạng trong đầu N- hoặc đầu C- của dẫn xuất PNA của công thức I.

Để minh họa cho các chữ viết tắt cho các dẫn xuất PNA, cấu trúc hóa học cho dẫn xuất PNA 14 mer được ký hiệu là "(N → C) Fethoc-TA(5)A-A(5)TA(5)-CGC(1O2)-AA(5)A-A(5)A-NH₂" được đưa ra trong Hình 8. Theo một minh họa khác, cấu trúc hóa học cho dẫn xuất PNA 16 mer được viết tắt là "(N → C) Fethoc-AG(5)C-A(5)CT-TA(5)C-GC(1O2)A-A(5)AA(2O2)-A-Lys-NH₂" được đưa ra trong Hình 9.

Một trình tự PNA 14 mer của "(N → C) Fethoc-AA(3)G-TG(2O2)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂" tương đương với trình tự ADN của "(5' → 3') AAG-TGT-ACC-TAA-AC", có phần trùng lặp bổ sung 14 mer với trình tự tiền mARN 20 mer như được đánh dấu "**in đậm**" và "**gạch chân**" trong [(5' → 3') uuguuguuag | GUACACUUUU] trải dài qua mỗi nối của intron 3 và exon 4 bên trong tiền mARN SCN9A ở người.

Một trình tự PNA 18 mer của (N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(3)CA-C(1O5)AA-NH₂" tương đương với trình tự ADN của "(5' → 3') AAG-TGT-ACC-TAA-ACA-CAA", có phần trùng lặp bổ sung 18 mer với trình tự tiền mARN 20-mer SCN9A như được đánh dấu "**in đậm**" và "**gạch chân**" trong [(5' → 3') uuguguuuag | GUACACUUUU].

Một trình tự PNA 18 mer của "(N → C) Fethoc-AA (5) G-TCT-A (5) CC (1O2) -TA (5) AA (3) khoảng (3) -CTA-NH₂" tương đương với trình tự ADN của "(5' → 3') AAG-TCT-ACC-TAA-ACA-CTA", có phần trùng lặp bổ sung 16 mer với trình tự tiền mARN SCN9A 20-mer được đánh dấu "**in đậm**" và "**gạch chân**" trong [(5' → 3') u"u"guuguuuag | GUA"C"ACUUUU]. Như vậy, PNA 18

mer có hai điểm bắt cặp sai đơn với vị trí cắt nối 3' của exon 4 trong tiền mARN SCN9A ở người. Hai bắt cặp sai đơn này được tìm thấy trong intron 3 và trong exon 4 được đánh dấu bằng dấu ngoặc kép (" ").

Trình tự PNA 14-mer của "(N → C) Fethoc-AA (5) G-TG (5) TA (5) CC (102) -TA (5) AA (5) G-NH₂ " tương đương với trình tự ADN của "(5' → 3') AAG-TGT-ACC-TAA-AG", mà có phần trùng lặp bổ sung 13 mer với trình tự tiền mARN SCN9A 20 mer được đánh dấu là " **in đậm** " và " **gạch chân** " trong [(5' → 3') uugu" **g**"**uuuag** | **GUACACUUUU**]. Như vậy, PNA 14 mer có một bắt cặp sai đơn với vị trí cắt nối 3' của exon 4 trong tiền mARN SCN9A ở người. Bắt cặp sai đơn được tìm thấy trong intron 3 được đánh dấu bằng dấu ngoặc kép (" ").

Quy trình chung để điều chế các Oligome PNA

Các các oligome PNA được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp peptit pha rắn (SPPS) dựa trên hóa - Fmoc (Fmoc-chemistry) theo phương pháp được bộc lộ trong tình trạng kỹ thuật trước đây [US 6,133,444; WO 96/40685] với các sửa đổi nhỏ nếu cần. Chất làm rắn (solid support) được sử dụng trong nghiên cứu này là H-Rink Amit-ChemMatrix được mua từ PCAS BioMatrix Inc. (Quebec, Canada). Các monome Fmoc-PNA với nucleobazơ biến đổi đã được tổng hợp như mô tả trong tình trạng kỹ thuật trước đây [PCT/KR 2009/001256] hoặc với các sửa đổi nhỏ. Các monome Fmoc-PNA như vậy với một nucleobazơ biến đổi và các monome Fmoc-PNA với nucleobazơ tự nhiên đã được sử dụng để tổng hợp các dẫn xuất PNA trong sáng chế này. Các monome Fmoc-PNA với nucleobazơ biến đổi được thể hiện trong Hình 10. Tuy nhiên, đối với một người có hiểu biết trong lĩnh vực này, rõ ràng có rất nhiều biến thể nhỏ cho các nhóm bảo vệ trên các monome PNA như vậy. Do đó, các monome Fmoc-PNA trong Hình 10 nên được lấy làm ví dụ, và do đó không nên lấy để giới hạn phạm vi của sáng chế này. Các các oligome PNA được tinh chế bằng HPLC pha đảo C₁₈ (nước/axetonitril hoặc nước/metanol với 0,1% TFA) và được đặc trưng bởi Phương pháp phổ khối lượng bao gồm ESI/TOF/MS.

Hình 11 minh họa sơ đồ một chu kỳ kéo dài monome điển hình được áp dụng trong SPPS của nghiên cứu này, và các chi tiết tổng hợp được thể hiện dưới đây. Tuy nhiên, đối với một người có hiểu biết trong lĩnh vực này, rõ ràng có thể có rất nhiều biến thể nhỏ trong việc thực hiện các phản ứng SPPS như vậy một cách hiệu quả trên bộ tổng hợp peptit tự động hoặc bộ tổng hợp peptit thủ công. Mỗi bước phản ứng được đưa ra ngắn gọn như sau.

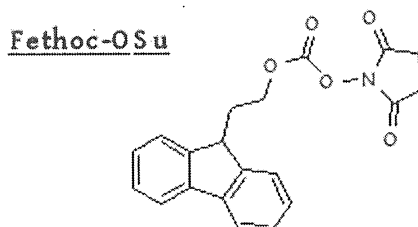
[Hoạt hóa keo H-Rink-ChemMatrix] 0,01 mmol (khoảng 20 mg keo) keo ChemMatrix trong 1,5 ml piperidin/DMF 20% được trộn trong ống libra trong 20 phút và dung dịch DeFmoc được lọc ra. Keo được rửa trong 30 giây mỗi lần với 1,5 mL metylen clorua (MC), 1,5 mL dimetylformamit (DMF), 1,5 mL MC, 1,5 mL DMF và 1,5 mL MC. Các amin tự do thu được trên chất làm rắn (solid support) đã được bắt cặp hoặc với một monome Fmoc-PNA hoặc với một dẫn xuất axit amin được bảo vệ bởi Fmoc.

[DeFmoc] Keo được trộn trong 1,5 ml piperidin/DMF 20% trong 7 phút, và dung dịch DeFmoc được lọc ra. Keo được rửa trong 30 giây mỗi lần với 1,5 mL MC, 1,5 mL DMF, 1,5 mL MC, 1,5 mL DMF và 1,5 mL MC. Các amin tự do thu được trên chất làm rắn (solid support) ngay lập tức bắt cặp với một monome Fmoc-PNA.

[Bắt cặp với monome Fmoc-PNA] Các amin tự do trên chất làm rắn (solid support) được bắt cặp với một monome Fmoc-PNA như sau. 0,04 mmol của một monome Fmoc-PNA, 0,05 mmol HBTU [2-(1*H* -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylluronium hexa fluoro-phosphat], và 10 mmol DIEA (*N,N* -diisopropyletylamin) được ủ trong 2 phút trong 1 mL DMF khan, và bổ sung các amin tự do vào keo. Dung dịch keo được khuấy trộn trong 1 giờ và môi trường phản ứng được lọc ra. Sau đó, keo được rửa trong 30 giây mỗi lần với 1,5 mL MC, 1,5 mL DMF và 1,5 mL MC.

[Gắn mũ] Sau phản ứng bắt cặp, các amin tự do không phản ứng được gắn mũ bằng cách lắc trong 5 phút trong 1,5 ml dung dịch gắn mũ (anhydrid axetic 5% và 2,6-leutidin 6% trong DMF). Sau đó, dung dịch gắn mũ được lọc và rửa trong 30 giây mỗi lần với 1,5 mL MC, 1,5 mL DMF và 1,5 mL MC.

[Gắn gốc "Fethoc-" vào đầu N] Gốc "Fethoc-" được gắn vào đầu N bằng phản ứng của amin tự do trên keo với "Fethoc-OSu" trong các điều kiện bất cặp cơ bản thông thường. Cấu trúc hóa học của "Fethoc-OSu" [CAS số 179337-69-0, $C_{20}H_{17}NO_5$, MW 351.36] được đưa ra như sau.



[Sự phân tách từ keo] Các oligome PNA gắn kết với keo được tách ra khỏi keo bằng cách lắc trong 3 giờ trong 1,5 ml dung dịch phân tách (2,5% tri-isopropylsilan và 2,5% nước trong axit trifloroaxetic). Keo được lọc ra và dịch lọc được cô đặc dưới áp suất đã được giảm đi. Dư lượng thu được được nghiền nhỏ bằng diethylene và kết tủa thu được được thu thập bằng cách lọc để tinh chế bằng HPLC pha đảo.

[Phân tích và tinh chế HPLC] Sau khi phân tách từ keo, sản phẩm thô của mỗi dẫn xuất PNA được tinh chế bằng HPLC pha đảo C_{18} tách nước/axetonitril hoặc nước/metanol (phương pháp gradient) chứa TFA 0,1%. Hình 12A và 12B là các biểu đồ sắc ký HPLC mẫu cho "ASO 2" trước và sau khi tinh chế HPLC, một cách tương ứng. Trình tự oligome của "ASO 2" được đưa ra trong Bảng 1.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ về tổng hợp dẫn xuất PNA có Công thức I

Để nhắm đích bổ sung vào vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 3 và exon 4 bên trong tiền mARN SCN9A ở người, các dẫn xuất PNA của sáng chế này đã được điều chế theo các quy trình tổng hợp được đưa ra ở trên hoặc với các sửa đổi nhỏ. Việc cung cấp các dẫn xuất PNA như vậy nhắm vào tiền mARN SCN9A ở người là để minh họa cho các dẫn xuất PNA có Công thức I, và không nên được hiểu để giới hạn phạm vi của sáng chế này.

Bảng 1 cung cấp các dẫn xuất PNA nhằm bổ sung vào vị trí cắt nối 3' của "exon 4" trong tiền mARN SCN9A ở người cùng với dữ liệu đặc trưng có cấu trúc theo phương pháp khối phổ. Việc cung cấp các ASO SCN9A trong Bảng 1 là để minh họa cho các dẫn xuất PNA có Công thức I, và không nên được hiểu là để giới hạn phạm vi của sáng chế này.

Bảng 1. Các dẫn xuất PNA nhằm bổ sung vào vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 3 và exon 4 bên trong tiền mARN SCN9A ở người cùng với dữ liệu đặc trưng có cấu trúc bằng phương pháp phổ khối.

Ví dụ PNA	Trình tự PNA (N → C)	Khối lượng chính xác, m/z	
		lý thuyết. ^a	quan sát. ^b
ASO 1	Fethoc-TA(5)A-A(5)AG(6)-TG(6)T- A(5)CC(102)-TA(5)A-A(5)-NH ₂	5398,60	5398,58
ASO 2	Fethoc-AA(5)G-TG(6)T-A(5)CC(102)- TAA(5)-A-NH ₂	4282,97	4284,99
ASO 3	Fethoc-AA(5)G-TG(6)T-AC(102)C- TAA(5)-A-NH ₂	4182,87	4182,89
ASO 4	Fethoc-A(5)AG-TG(6)T-A(5)CC(102)- TAA-A(5)-NH ₂	4282,97	4283,00
ASO 5	Fethoc-AAG(6)-TG(6)T-A(5)CC(102)- TA(5)A-A-NH ₂	4281,98	4282,05
ASO 6	Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(102)- TA(5)A-A(5)-NH ₂	4369,06	4369,08
ASO 7	Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(102)- TA(5)A-A(5)C-NH ₂	4620,16	4620,14

ASO 8	Fethoc-A(5)GT-G(5)TA(5)-CC(1O2)T- A(5)AA(5)-C-NH ₂	4345,04	4345,08
ASO 9	Fethoc-AA(6)G-TG(5)T-A(6)CC(1O2)- TA(6)A-A(6)C-NH ₂	4676,22	4676,25
ASO 10	Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)- TA(5)A-A(5)G-NH ₂	4660,16	4660,15
ASO 11	Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)- TA(5)A-A(5)CA-NH ₂	4895,27	4895,20
ASO 12	Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)- TA(5)A-A(5)GG-NH ₂	4951,27	4951,26
ASO 13	Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-ACC(1O2)- TA(5)A-A(5)CA(5)-C-NH ₂	5146,37	5146,35
ASO 14	Benzoyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)- TA(5)A-A(5)C-NH ₂	4488,10	4488,06
ASO 15	Piv-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)- TA(5)A-A(5)C-NH ₂	4468,13	4468,04
ASO 16	Fethoc-AA(5)G-TA(5)T-A(5)CC(1O2)- TG(5)A-A(5)C-NH ₂	4620,16	4620,14
ASO 17	p-Toluenesulfonyl-AA(5)G-TG(2O3)T- A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-Lys-NH ₂	4682,17	4682,15
ASO 18	n-Hexanoyl-AA(5)G-TG(5)T- A(5)CC(1O2)-TA(8)A-A(5)C-NH ₂	4524,19	4524,20
ASO 19	Fethoc-Lys-Leu-AA(5)G-TG(5)T- A(5)CC(1O2)-TA(2O2)A-A(5)C-Lys-NH ₂	4991,41	4991,37
ASO 20	[N-(2-Phenyletyl)amin]cacbonyl- AA(3)G-TG(5)T-A(5)CC(1O5)-TA(5)A-A(5)C- NH ₂	4545,16	4545,15
ASO 21	H-AA(5)G-TG(2O2)T-A(5)CC(1O2)- TA(5)A-A(5)C-NH ₂	4386,05	4386,03

ASO 22	n-Propyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O3)- TA(5)A-A(5)C-NH ₂	4440,14	4440,06
ASO 23	N,N-Phenyl-Me-AA(5)G-TG(5)T- A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(4)C-NH ₂	4460,10	4460,09
ASO 24	Benzoyl-AA(5)G-TG(3)T-A(5)CC(2O2)- TA(5)A-A(5)C-NH ₂	4474,08	4474,11
ASO 25	p-Toluenesulfonyl-TG(2O3)T- A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(3)CA-C-Lys-NH ₂	4238,92	4238,95
ASO 26	Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)AC(1O2)- TA(5)T-A(5)C-NH ₂	4635,16	4635,14

^{a)} khối lượng chính xác về mặt lý thuyết, ^{b)} khối lượng chính xác quan sát được

Hình 12A là biểu đồ sắc ký theo Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) thu được với sản phẩm "ASO 2" thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng HPLC điều chế pha đảo C₁₈ (RP). Hình 12B là biểu đồ sắc ký HPLC cho sản phẩm "ASO 2" đã tinh chế. Độ tinh khiết của "ASO 2" được cải thiện rõ rệt nhờ quá trình tinh chế bằng HPLC điều chế. Hình 13 cung cấp phổ khối ESI-TOF thu được với sản phẩm được tinh chế "ASO 2". Việc cung cấp dữ liệu phân tích cho "ASO 2" là để minh họa cách các dẫn xuất PNA có Công thức I đã được tinh chế và xác định trong sáng chế này, và không nên được hiểu để giới hạn phạm vi của sáng chế này.

Ái lực gắn kết của các dẫn xuất PNA đối với ADN bổ sung

Các dẫn xuất PNA trong Bảng 1 đã được đánh giá về ái lực gắn kết của chúng đối với các ADN 10-mer bổ sung nhắm đích vào đầu N hoặc đầu C của PNA. ái lực gắn kết được đánh giá bằng giá trị T_m cho song công giữa PNA và ADN bổ sung 10 mer. Sự song công giữa các dẫn xuất PNA trong Bảng 1 và ADN bổ sung đầy đủ cho thấy giá trị T_m quá cao để được xác định một cách đáng tin cậy trong dung dịch đệm nước, vì dung dịch đệm có xu hướng sôi trong quá trình đo T_m.

Giá trị T_m được xác định trên máy quang phổ UV/Vis như sau. Một dung dịch hỗn hợp của 4 μM các oligome PNA và 4 μM bổ sung ADN 10-mer trong 4 mL dung dịch đệm chứa nước (độ pH 7, 16, natri phosphat 10 mM, NaCl 100 mM) trong ống lưu mẫu polypropylen 15 ml, hỗn hợp được ủ ở 90°C trong vòng một phút và từ từ hạ nhiệt độ xuống nhiệt độ môi trường. Sau đó, dung dịch được chuyển vào một cuvette UV thạch anh 3 ml có nắp đậy kín khí và chịu phép đo T_m trên máy quang phổ UV/Visible ở 260nm như được mô tả trong tình trạng kỹ thuật trước đây [PCT/KR2009/001256] hoặc với những sửa đổi nhỏ. Các ADN bổ sung 10 mer cho phép đo T_m đã được mua từ Bione (www.bione.com, Dajeon, Hàn Quốc) và được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

Các giá trị T_m được quan sát của các dẫn xuất PNA có Công thức I là rất cao đối với gắn kết bổ sung vào ADN 10-mer và được cung cấp trong Bảng 2 ở dạng không được hiệu chỉnh. Ví dụ, "ASO 7" cho thấy một giá trị T_m 77,0°C để cặp đôi với ADN 10-mer bổ sung [tức là (5' $\rightarrow$ 3') AGG-TAC-ACT-T] nhắm đích đầu cuối N- 10-mer ở PNA được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong [(N $\rightarrow$ C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(102)-TA(5)A-A(5)C-NH₂]. Trong khi đó, "ASO 7" cho thấy một T_m 69,0°C để cặp đôi với ADN 10-mer bổ sung [tức là (5' $\rightarrow$ 3') GTT-TAG-GTA-C] nhắm đích đầu cuối C 10-mer trong PNA là được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong [(N $\rightarrow$ C) Fethoc-AA (5) GT G(5) TA (5) CC (102) -TA (5) AA (5) C - NH₂].

Bảng 2. Giá trị T_m giữa các PNA trong Bảng 1 và ADN bổ sung 10mer nhắm đích hoặc đầu N hoặc đầu C của PNA.

PNA	Giá trị T_m , °C	
	ADN 10mer với đầu N	ADN 10mer với đầu C
ASO 2	74,0	65,0
ASO 4	77,0	66,0
ASO 5	78,0	66,0

ASO 6	75,0	72,0
ASO 7	77,0	69,0
ASO 8	78,1	70,0
ASO 10	79,0	74,0

Các ví dụ về hoạt tính sinh học của các dẫn xuất PNA có Công thức I

Các dẫn xuất PNA có Công thức I được đánh giá cho các hoạt động sinh học trong phòng thí nghiệm và trong cơ thể. Các ví dụ sinh học được cung cấp dưới đây là để minh họa hoạt động chống lại các dẫn xuất PNA có Công thức I trong tế bào cũng như ở động vật, và do đó không nên được hiểu để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với các hợp chất được liệt kê trong Bảng 1.

Ví dụ 1. Nhảy Exon gây ra nhờ điều trị bằng "ASO 7" trong các tế bào PC3 (A).

"ASO 7" được chỉ định trong Bảng 1 là ASO 14 mer gắn kết bổ sung với trình tự 14 mer của vị trí cắt nối 3 qua mỗi nối của intron 3 và exon 4 trong tiền mARN SCN9A ở người. Trình tự đích 14-mer bên trong vị trí cắt nối 3' được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong [(5' → 3') uugu **guuuag** | **GUACACUU** UU]. "ASO 7" có phần trùng lặp bổ sung 6 mer với intron 3 và phần trùng lặp bổ sung 8 mer với exon 4.

Vì các tế bào PC3 (Cat. Số CRL1435, ATCC) được biết là biểu hiện rất phong phú mARN SCN9A ở người [*Br. J. Dược điển*. vol 156, 420-431 (2009)], "ASO 7" được đánh giá về khả năng tạo ra sự nhảy của exon 4 trong các tế bào PC3 như sau.

[Nuôi cấy tế bào & Điều trị bằng ASO] Các tế bào PC3 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa 5 ml môi trường F-12K được xử lý bằng "ASO 7" ở 0 (đối chứng âm), 1, 10 hoặc 100 zM.

[Tách xuất ARN & Tổng hợp cADN bằng phương pháp PCR một bước] Sau khi ủ nhờ điều trị bằng "ASO 7" trong 5 giờ, tổng số ARN được chiết xuất

bằng cách sử dụng Bộ tách chiết ARN phổ quát (Cat. Số 9767, Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu ARN 200 ng đã bị phản ứng sao chép ngược 25 μ L sử dụng bộ Super Script® One-Step RT-PCR với Platinum® Taq polymeraza (Cat. Số 10928-042, Invitrogen) chống lại một bộ mỗi đặc hiệu exon của [exon 2_tinh tiến: (5' $\rightarrow$ 3') CTTTCTCCTTTCAGTCCTCT; và exon 9 đảo ngược: (5' $\rightarrow$ 3') CGTCTGTTGGTAAAGGTTTT] theo các điều kiện chu kỳ sau: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, sau đó là 15 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 55°C, và 2 phút ở 72°C.

[Khuếch đại PCR lồng nhau] 1 μ L cADN sau đó đã bị phản ứng PCR lồng nhau 20 μ L (Cat. và exon 9n_reverse: (5' $\rightarrow$ 3') GCTAAGAAGGC-CCAGCTGAA] theo các điều kiện chu kỳ sau: 95 °C trong 2 phút tiếp theo 34 chu kỳ 30 giây tại 95 °C, 30 giây tại 55 °C, và 1 phút ở 72 °C.

[Nhận diện các sản phẩm nhảy Exon] Các sản phẩm PCR đã được phân tách điện di trên gel agarose 2%. Các dải có kích thước đích được thu thập và phân tích bởi phương pháp giải trình tự Sanger.

Hình 14A cung cấp dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng nhau, trong đó các tế bào được xử lý bằng "ASO 7" mang lại một dải PCR mạnh có thể gán cho việc nhảy Exon 4-5. Tuy nhiên, băng PCR cho mARN SCN9A có chiều dài đầy đủ có xu hướng là mạnh hơn trong các mẫu được xử lý với 10 hoặc 100 μ M ASO so với mẫu đối chứng âm. Kiểu phản ứng liều lệ trong PCR lồng nhau có thể là do sự điều hòa phiên mã bởi "ARN vòng tròn exon intron (EIciARN)" được tích lũy trong quá trình nhảy Exon nhờ điều trị bằng "ASO 7". [*Nature Struc.Mol Biol.* vol 22 (3), 256-264 (2015)] Sản phẩm PCR nhảy Exon được xác nhận bởi giải trình tự Sanger là nhảy Exon 4-5 như trong Hình 14B.

Ví dụ 2. Nhảy Exon gây ra nhờ điều trị bằng "ASO 7" trong các tế bào PC3 (B).

"ASO 7" được đánh giá về khả năng tạo ra việc nhảy "exon 4" trong các tế bào PC3 như trong "Ví dụ 1", trừ khi có ghi chú khác. Trong thí nghiệm này, các

tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 27" ở 0 (đối chứng âm tính), 1, 10, 100 và 1,000 aM trong 24 giờ. Phản ứng PCR lồng nhau được thực hiện đối với một bộ mồi của [exon 3/6_tình tiền: (5' → 3') GGACCAAAAATGTCGAGCCT; và exon 9_đảo ngược: (5' → 3') GCTAAGAAGGCCAGCTGAA] được thiết kế để khuếch đại sản phẩm có trình tự mồi nối của exon 3 và exon 6.

Trình tự mồi của "SCN-exon 3/6_tình tiền" nhận ra "điểm nối của exon 3 và exon 6" có chọn lọc hơn "mối nối của exon 3 và exon 4" được phát hiện trong ARN thông tin SCN9A có đủ độ dài. Trình tự mồi được thiết kế để phát hiện biến thể cắt nối SCN9A thiếu các exon 4-5 nhạy cảm hơn so với ARN thông tin SCN9A đủ độ dài. Một mồi nhảy Exon như vậy sẽ hữu ích để phát hiện các biến thể cắt nối ARN thông tin với độ ổn định trao đổi chất kém, vì các ARN thông tin đủ độ dài có xu hướng cho thấy sự ổn định trao đổi chất tốt đạt được qua quá trình tiến triển trong hàng tỷ năm.

Hình 14C cung cấp dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng nhau, trong đó các tế bào được xử lý bằng "ASO 7" mang lại một dải PCR mạnh có thể gán cho việc nhảy Exon 4-5. Sản phẩm PCR nhảy Exon đã được xác nhận bởi dải trình tự Sanger là nhảy Exon 4-5.

Ví dụ 3. Phương pháp qPCR cho mARN SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "ASO 7" (A)

"ASO 7" được đánh giá bởi phương pháp qPCR lồng nhau SCN9A về khả năng tạo ra những thay đổi về mức độ mARN SCN9A ở người trong các tế bào PC3 như được mô tả dưới đây.

[Điều trị bằng ASO] Các tế bào PC3 được xử lý bằng "ASO 7" ở 0 (đối chứng âm), 0,1, 1 hoặc 10 aM. (2 đĩa nuôi cấy cho mỗi nồng độ ASO)

[Tách xuất ARN & Tổng hợp cADN bằng phương pháp PCR một bước] Sau khi ủ nhờ điều trị bằng "ASO 7" trong 24 giờ, tổng ARN được chiết xuất và chịu sự khuếch đại PCR một bước như mô tả trong "Ví dụ 1".

[Khuếch đại qPCR lồng nhau] Các dung dịch cADN đã được pha loãng 100 lần và 1 µL của mỗi sản phẩm PCR được pha loãng đã phản ứng với phản ứng

PCR thời gian thực 20 μ L đối với một bộ môi cụ thể exon của [exon 3_tỉnh tiến: (5' $\rightarrow$ 3') TGACCATGAATAACCCAC; và exon 4_reverse: (5' $\rightarrow$ 3') GCAAGGATTTTTACAAGT] theo các điều kiện chu kỳ sau: 95 °C trong 30 giây tiếp theo là 40 chu kỳ 5 giây ở 95 °C, và 30 giây tại 60°C. Phản ứng qPCR được theo dõi với đầu dò TaqMan của [(5' $\rightarrow$ 3') 5,6-FAM-GGACCAAAA-Zen-ATGTCGAGTACAC-3IABkFQ] nhắm vào ngã ba của exon 3 và exon 4 trong mARN SCN9A có độ dài đầy đủ.

Hình 15A tóm tắt dữ liệu qPCR được quan sát, trong đó mức mARN SCN9A có đủ độ dài đã giảm đáng kể (thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) trong các tế bào được xử lý bằng "ASO 7" khoảng 35 ~ 45%.

Ví dụ 4. Phương pháp qPCR cho mARN SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "ASO 7" (B)

"ASO 7" được đánh giá bởi phương pháp qPCR lồng nhau SCN9A về khả năng tạo ra những thay đổi về mức độ mARN SCN9A ở người trong các tế bào PC3 như trong "Ví dụ 3", trừ khi có ghi chú khác. cADN được tổng hợp bằng cách sử dụng hexamers ngẫu nhiên và chịu phản ứng qPCR SCN9A chống lại đầu dò TaqMan.

Hình 15B cung cấp dữ liệu qPCR được quan sát, trong đó mức mARN SCN9A có độ dài đầy đủ giảm đáng kể (Thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) trong các tế bào được xử lý bằng "ASO 7" khoảng 50 ~ 60%.

Ví dụ 5. Gây bệnh lý thần kinh cột sống ở chuột bằng thắt dây thần kinh cột sống L5/L6.

Thắt dây thần kinh cột sống (SNL) gây ra bệnh lý thần kinh trong các hạch rễ lưng tủy sống (DRG) và tủy sống, và đã được sử dụng rộng rãi như một mô hình cho các loại đau do thần kinh. [*Pain* vol 50 (3), 355-363 (1992)] Tuy nhiên, có nhiều cách SNL tùy thuộc vào cách bó dây thần kinh cột sống được thắt. Mức độ và thời gian của bệnh lý thần kinh trong DRG dường như thay đổi tùy thuộc

vào cách thắt bó dây thần kinh cột sống. [*Pain* vol 43 (2), 205-218 (1990)] Theo kinh nghiệm nội bộ, việc thắt hai dây thần kinh cột sống L5 và L6 (nghĩa là "thắt L5/L6") gây ra bệnh thần kinh nghiêm trọng hơn và kéo dài hơn thắt một dây thần kinh cột sống L5 (tức là "thắt L5").

[Phẫu thuật SNL với việc thắt L5/L6] các con chuột SD được gây mê bằng zoletil/rompun. Sau đó, dây thần kinh cột sống L5 và L6 (bên trái) lộ ra và được thắt lại. Sau đó, cơ và da đã được đóng lại và cắt theo quy trình vô trùng thích hợp.

[Gây đau thần kinh] 6 đến 7 ngày sau khi phẫu thuật SNL, chân ở bên bị thắt được kích thích bằng cách ghi von Frey bằng máy gây mê von Frey điện tử (Model Number 2390, IITC Inc. Life Science) như được mô tả dưới đây. Chấm điểm bằng thiết bị Von Frey được thực hiện hàng ngày cho đến khi phân nhóm để đánh giá được lý.

[Chấm điểm bằng thiết bị Von Frey điện tử] Sau khi ổn định dưới 30 phút, mỗi con vật trong chuồng nhựa được tùy chỉnh để chấm điểm von Frey, chân sau của mỗi con vật đã bị von Frey chấm điểm 6 lần với khoảng thời gian vài phút giữa các lần ghi điểm. Điểm số từ điểm số đầu tiên đã bị loại bỏ vì các con vật không ổn định trong lần ghi điểm đầu tiên. Trong số năm điểm còn lại, điểm cao nhất và thấp nhất đã bị loại trừ. Sau đó, trung bình của ba điểm còn lại được lấy là điểm von Frey cho con vật.

Ví dụ 6. Sự đảo ngược của dị cảm đau nhờ điều trị bằng "ASO 7" ở chuột bị bệnh thần kinh cột sống. (1)

"ASO 7" là một ASO SCN9A 14 mer bổ sung một phần cho tiền mARN SCN9A ở chuột được lấy dữ liệu từ ADN genomic ở chuột [Trình tự tham chiếu NCBI: NC_000002.12] với một bất cặp sai đơn ở đầu 3'. Trình tự 13-đích của "ASO 7" trong tiền mARN của chuột SCN9A được chỉ định "đậm" và "gạch chân" như được đánh dấu trong trình tự tiền mARN 20-bit SCN9A của [(5' → 3') uuuc "c "uuuag | GUACACUU UU], trong đó bất cặp sai đơn được phát hiện trong intron 3 được đánh dấu bằng dấu trích dẫn (" ").

"ASO 7" được đánh giá về khả năng đảo ngược dị cảm đau ở chuột bị bệnh thần kinh cột sống gây ra bởi "thắt L5/L6" như mô tả dưới đây.

[Phẫu thuật và phân nhóm SNL (SNL Surgery and Grouping)] Vào ngày -10, các con chuột SD đực (6 tuần tuổi, Phòng thí nghiệm Harlan, Ý) đã bị "thắt L5 L6". Động vật được kích thích bằng cách ghi điểm von Frey từ Ngày -4 hàng ngày. Trong Ngày 0, 30 con vật đã được chọn dựa trên điểm số von Frey riêng lẻ trong Ngày 0 và được chỉ định vào 4 nhóm của nhóm đối chứng âm (nghĩa là không Điều trị bằng ASO) và ba nhóm điều trị 1, 3 và 6 pmol/Kg "ASO 7". (6 hoặc 9 động vật mỗi nhóm)

[Điều trị bằng ASO và chấm điểm Von Frey] Chuột được tiêm dưới da "ASO 7" ở 0 (đối chứng âm), 1, 3 hoặc 6 pmol/Kg vào buổi chiều trong các ngày 0, 2, 4, 6, 8 và 10. Dị cảm đau được ghi điểm bằng phương pháp tính điểm von Frey điện tử được mô tả trong "Ví dụ 5" vào buổi sáng. ASO được quản lý dưới dạng oligonucleotit "trần", như được hòa tan trong PBS.

[Reversal of Allodynia (Sự đảo ngược dị cảm đau)] Hình 16A tóm tắt các kết quả quan sát được của các điểm von Frey. Các động vật trong nhóm đối chứng âm cho thấy điểm von Frey trung bình (ngưỡng vật vã vì thiếu thuốc) ổn định trong khoảng từ 6 đến 7 g trong khoảng thời gian 12 ngày sau khi phân nhóm. "ASO 7" đã đảo ngược đáng kể (thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) dị cảm đau từ ngày thứ 4 trở đi. Mặc dù hoạt động trị liệu có thể so sánh ở tất cả các nhóm điều trị, nhóm 6 pmol/Kg bắt đầu cho thấy hoạt động trị liệu từ Ngày 2 đáng liệu đầu tiên.

Mặc dù không có so sánh đối chứng dương tính trong đánh giá cụ thể này, nhưng điểm số von Frey từ 10 đến 12 g thường được quan sát theo các đánh giá nội bộ ở chuột (với "thắt L5/L6") bằng đường uống với thuốc pregabalin ở mức 30 mg/Kg. Do đó, hiệu quả của "ASO 7" ở mức 1 đến 6 pmol/Kg sẽ tương đương với thuốc pregabalin 30 mg/Kg trong mô hình đau thần kinh cụ thể này.

Ví dụ 7. Sự đảo ngược của dị cảm đau (Allodynia) bằng "ASO 2" ở chuột bị bệnh thần kinh cột sống.

"ASO 2" được chỉ định trong Bảng 1 là ASO 13 điểm bổ sung đầy đủ cho vị trí cắt nối 3' kéo dài qua mỗi nối của intron 3 và exon 4 trong tiền mARN SCN9A ở người như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong [(5' → 3') uugug uuuag | GUACACUU UU]. "ASO 2" có lớp phủ 5 mer với intron 3 và lớp phủ 8 mer với exon 4. Trình tự đích của "ASO 2" được bảo tồn trong tiền mARN của chuột SCN9A.

"ASO 2" được đánh giá về khả năng đảo ngược dị cảm đau ở chuột bị bệnh thần kinh cột sống gây ra bởi "thắt L5/L6" như mô tả trong "Ví dụ 6", trừ khi có ghi chú khác.

[Phân nhóm và điều trị bằng ASO] Các con chuột SD đực (5 tuần tuổi, Phòng thí nghiệm Harlan, Ý) đã được tiến hành SNL trong Ngày -16. Trong Ngày 0, 30 con chuột được chọn và chỉ định thành 5 nhóm của nhóm đối chứng âm (nghĩa là không Điều trị bằng ASO) và bốn nhóm điều trị 20 pmol/Kg QD (nghĩa là hàng ngày một lần), 100 pmol/Kg QD, 500 pmol/Kg QD và 100 pmol/Kg Q2D (tức là cứ sau hai ngày một lần) "ASO 2". (6 con trên mỗi nhóm) Các con vật được tiêm dưới da nhờ điều trị bằng "ASO 2" trong các ngày từ 0 đến 13 theo lịch trình dùng thuốc của QD và Q2D. ASO được quản lý dưới dạng oligonucleotit "trần", như được hòa tan trong PBS.

[Cho điểm dị cảm đau (Allodynia Scoring)] Dị cảm đau được cho điểm trong Ngày 0 đến 14 theo phương pháp von Frey được mô tả trong "Ví dụ 5". Trong ngày 7, chân phải (bên không thắt) đã được ghi điểm von Frey.

[Sự đảo ngược của dị cảm đau (Reversal of Allodynia)] Hình 16B tóm tắt các kết quả quan sát được của các điểm số von Frey. Các động vật trong nhóm đối chứng âm cho thấy điểm von Frey trung bình ổn định trong khoảng từ 6 đến 8 g trong khoảng thời gian 14 ngày sau khi phân nhóm.

Trong trường hợp chân ở bên bị thắt, dị cảm đau (allodynia) đã đảo ngược đáng kể (thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) vào Ngày 1 và sau đó ở các động vật được tiêm ASO lúc 20 pmol/Kg QD, 100 pmol/Kg Q2D và 500 pmol/Kg QD ngoại trừ nhóm 100 pmol/Kg. Tuy nhiên, vào ngày 14, dị cảm đau (allodynia) cũng được đảo ngược đáng kể trong 100 pmol/Kg QD.

Trong trường hợp chân ở bên không bị thắt, điểm số von Frey của các nhóm Điều trị bằng ASO trong Ngày 7 cao hơn điểm số của nhóm đối chứng âm. Điểm số von Frey quan sát được là 15,3 g (đối chứng âm), 17,6 g (20 pmol/Kg QD), 19,2 g (100 pmol/Kg QD), 20,1 g (100 pmol/Kg Q2D) và 19,5 g (500 pmol/Kg QD). Tuy nhiên, không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm Điều trị bằng ASO và nhóm đối chứng âm.

Ví dụ 8. Ưc chế dòng natri bằng "ASO 7" trong các tế bào DRG L5 ở chuột được kích hoạt bằng việc thắt dây thần kinh cột sống L5/L6.

Dòng natri tế bào thường được đo bằng kẹp rập nối. Khi các ion natri được đưa vào tế bào, nồng độ ion natri trong tế bào sẽ tăng lên. Có thể đánh giá mức độ natri nội tế bào bằng cách sử dụng thuốc nhuộm nhạy với ion natri. "CoroNa Green" là một loại thuốc nhuộm có chất tạo cang đặc hiệu ion natri thuộc loại ete vòng (crown ether). Sau khi tạo cang với ion natri, "CoroNa Green" phát ra huỳnh quang màu xanh lá cây. "CoroNa Green" đã được sử dụng để đo gián tiếp nồng độ natri trong tế bào. Mức natri được đo bằng "CoroNa Green" được phát hiện có mối tương quan tốt với dòng ion natri được đo bằng kẹp rập nối ion natri. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Khoa học Hoa Kỳ tập 106 (38), 16145-16150 (2009)]

"ASO 7" được đánh giá về khả năng điều chỉnh dòng ion natri trong các tế bào DRG của chuột bằng cách sử dụng "CoroNa Green" như sau.

[Trích xuất DRG (Extraction of DRG)] Vào ngày 0, các con chuột SD đực (6 tuần tuổi, Phòng thí nghiệm Harlan, Ý) được "thắt L5/L6" như mô tả trong "Ví dụ 5". Từng con chuột được chấm điểm von Frey trong khoảng thời gian 4 tuần. Vào ngày 31, một con chuột cho thấy điểm von Frey thấp đã bị làm vật hy sinh để trích xuất DRG L5 cả bên trái (bên thắt) và bên phải (bên không thắt). Các DRG được ngâm trong 0,5 mL PBS ngay sau khi chiết.

[Điều chế các tế bào thần kinh DRG L5 (Reversal of Allodynia)] Các tế bào DRG được điều chế theo các quy trình được tiết lộ trong tài liệu [*Phương pháp Mol Biol.* tập 846, 179-187 (2012); *PLoS Một* tập 8 (4); e60558 (2013)], được mô tả ngắn gọn trong loạt bài như sau: ① DRG được chuyển vào một ống

điện tử 1,5 mL chứa 0,2 ml 0,125% collagenaza (collagenaza loại IV, Cat. số C5138-100MG, Sigma.) trong HBSS (cân bằng Salt Solution của Hank, Cat.t. Số 14025-092, Life Technologies), cắt nhỏ thành từng miếng càng nhỏ càng tốt bằng kéo, và ủ trong 20 phút trong một lồng ấp CO₂ ở 37°C dưới 5% CO₂ và 95% RH; ② 50µL 0,25% trypsin/EDTA đã được thêm vào ống điện tử, được giữ trong tủ ấm thêm 10 phút nữa; ③ ống điện tử được sạc với 1 mL môi trường DMEM hoàn chỉnh và chịu sự lắng đọng ly tâm ở 600g trong 5 phút; ④ kết quả bị đình chỉ trong 4 mL môi trường Neurobasal-A (Neurobasal® Medium, Cat. Số 21103-049, Gibco) được bổ sung 2X B-27 (B-27® Bổ sung không chứa huyết thanh, Cat. Số 17504-044, Gibco), 1X penicillin-streptomycin, 1X L-glutamin và 1 mL huyền phù tế bào đã được cấy cẩn thận lên một tấm kính phủ laminin (Cat. Số GG-25-1.5-laminin, Neuvitro) được đặt trong một Đĩa văn hóa 35 mm; ⑤ một ngày sau khi gieo hạt, đĩa nuôi cấy được sạc cẩn thận với 1 ml môi trường Neurobasal-A tươi khác; ⑥ Hai ngày sau khi ươm, môi trường được thể bằng 2 mL môi trường Neurobasal-A tươi bổ sung 1 µM Ara-C (xytosin-D-arabinofuranosit, Cat. C1768-100MG, Sigma) để ngăn chặn có chọn lọc sự phát triển của các tế bào khác ngoài tế bào thần kinh DRG; ⑦ Bốn ngày sau khi gieo hạt, môi trường được thể một lần nữa bằng 2 mL môi trường Neurobasal-A tươi bổ sung 1µM Ara-C; và ⑧ Năm hoặc sáu ngày sau khi gieo hạt, các tế bào thần kinh DRG đã được xử lý bằng ASO.

[Xử lý bằng ASO & thử nghiệm CoroNa (ASO Treatment & CoroNa Assay)] Các tế bào thần kinh DRG L5 có "thắt L5/L6" hoặc không có "thắt L5/L6" được xử lý bằng "ASO 7" ở 0 (đối chứng âm), 100 hoặc 1,000 zM. 30 giờ sau, các tế bào được rửa bằng 2 mL HBSS, và sau đó được sạc bằng 2 mL HBSS mới. Sau đó, các tế bào được xử lý bằng 5 mM "CoroNa xanh" (Cat. No. C36676, Life Technologies) ở 37°C. 30 phút sau, các tế bào được rửa 2 lần với 2 mL HBSS và được sạc bằng 2 mL HBSS tươi. Đĩa nuôi cấy được gắn trên kính hiển vi huỳnh quang Olympus (Model BX53, Olympus) được trang bị camera CCD để liên tục

chụp ảnh huỳnh quang màu xanh lá cây của các tế bào. Các tế bào được xử lý sâu bằng NaCl 10 mM, và sau đó những thay đổi về cường độ huỳnh quang của tế bào được ghi lại bằng kỹ thuật số trong khoảng thời gian 300 giây. Có 4 đến 5 tế bào trên mỗi khung, tức là trên mỗi nồng độ ASO. Cường độ huỳnh quang từ mỗi tế bào riêng lẻ được theo dõi ở độ phân giải thứ hai. Các tín hiệu của cường độ huỳnh quang nội bào từ các tế bào riêng lẻ được tính trung bình bằng chương trình ImageJ (phiên bản 1.50i, NIH) và các tín hiệu trung bình được thể hiện trong Hình 13A và 13B đối với các tế bào "thất L5/L6" và "không thất L5/L6", một cách tương ứng. Tín hiệu cường độ huỳnh quang trung bình được lấy là tín hiệu nồng độ natri trong tế bào riêng lẻ đối với các tế bào được xử lý bằng "ASO 7" ở mức 0 (đối chứng âm), 100 hoặc 1,000 zM.

[Kết quả khảo nghiệm CoroNa (CoroNa Assay Results)] Trong các tế bào thần kinh DRG được kích thích bằng "thất L5/L6" [x.Hình 17A], phương pháp điều trị nhờ điều trị bằng "ASO 7" ở 100 zM hoặc 1 aM đã ức chế rõ rệt cường độ huỳnh quang trung bình của tế bào. Ví dụ, tại thời điểm 150 giây, cường độ huỳnh quang trung bình của tế bào (tức là dòng natri) giảm 80 ~ 85% trong các tế bào được xử lý bằng ASO.

Trong các tế bào thần kinh DRG không "thất L5/L6" [x.Hình 17B], việc xử lý bằng "ASO 7" ở mức 1 aM gây ra sự giảm cường độ huỳnh quang trung bình của tế bào. Tuy nhiên, mức giảm quan sát được là khoảng 50% tại thời điểm 150 giây và không được đánh dấu như trong các tế bào được kích thích bằng "sự thất L5/L6". Hơn nữa, việc xử lý bằng "ASO 7" ở 100 zM đã thất bại trong việc ức chế dòng natri trong các tế bào thần kinh mà không có "kích thích L5/L6".

Các tế bào thần kinh DRG không có kích thích thần kinh được biết là thể hiện các kiểu phụ khác nhau của VGSC bao gồm $Na_v1.7$, $Na_v1.8$, $Na_v1.2$, v.v. Kiểu phụ $Na_v1.7$ cho thấy sự đóng góp hạn chế vào toàn bộ dòng natri trong các tế bào thần kinh DRG mà không cần kích thích. [Nat Comm. tập 3, Số bài viết 791: DOI: 10.1038/ncomms1795 (2012)] Các tế bào thần kinh DRG chuột không có "sự thất L5/L6" có thể mô phỏng các tế bào thần kinh DRG như vậy mà không có bệnh lý thần kinh. Sự ức chế quan sát được của dòng natri trong các tế bào

DRG mà không có "sự thất L5/L6" có thể chỉ phản ánh sự đóng góp của dòng natri từ kiểu phụ $\text{Na}_v1.7$.

Trong khi đó, các tế bào thần kinh được biết là điều chỉnh tăng biểu hiện $\text{Na}_v1.7$ để đáp ứng với bệnh lý thần kinh dai dẳng. [*J Biol Hóa.* tập 279 (28), 29341-29350 (2004); *J Neurosci.* vol 28 (26), 6652-6658 (2008)] Các tế bào thần kinh DRG chuột với "sự thất L5/L6" có thể mô phỏng các tế bào thần kinh DRG với bệnh lý thần kinh. "ASO 7" ở cả 100 μM và 1 μM đã ức chế dòng natri 80 ~ 85% trong các tế bào thần kinh được kích thích bởi "sự thất L5/L6". Sự ức chế cao hơn của dòng natri bằng "ASO 7" trong các tế bào DRG với "sự thất L5/L6" phù hợp với sự điều hòa của $\text{Na}_v1.7$ trong các tế bào thần kinh bởi bệnh lý thần kinh mãn tính.

Kết hợp các phát hiện quan sát được trong các tế bào thần kinh DRG chuột có và không có "sự thất L5/L6", "ASO 7" được kết luận là có tác dụng ức chế chọn lọc biểu hiện của kiểu phụ $\text{Na}_v1.7$. "ASO 7" dường như ức chế biểu hiện $\text{Na}_v1.7$ mạnh hơn ở các tế bào thần kinh có bệnh lý thần kinh so với các tế bào không có bệnh lý thần kinh.

Ví dụ 9. Đảo ngược dị cảm đau nhờ điều trị bằng "ASO 1" ở chuột bị đau thần kinh ngoại biên do tiểu đường.

"ASO 1" được chỉ định trong Bảng 1 là ASO 16-mer bổ sung đầy đủ cho vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 3 và exon 4 trong tiền mARN SCN9A ở người như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền mARN SCN9A 25 -mer của [(5' → 3') uuguguuag | GUACACUUUUACUGG]. "ASO 1" có đoạn trùng lặp 5 mer với intron 3 và đoạn trùng lặp 11 mer với exon 4. "ASO 1" bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở chuột.

"ASO 1" được đánh giá về khả năng đảo ngược dị cảm đau do cơn đau thần kinh ngoại biên liên quan đến bệnh tiểu đường (DPNP) ở chuột.

[Gây đau thần kinh ngoại biên liên quan đến bệnh tiểu đường và sự phân nhóm (Induction of DPNP and Grouping)] Trong ngày 0, streptozotocin hòa tan trong citrat đệm (pH 6) là nội phúc mạc quản lý tại 60 mg/Kg để chuột SD nam

nặng 200 g khoảng để gây ra bệnh tiểu đường loại I. [*J. Ethnopharmacol.* vol 72 (1-2), 69-76 (2000)] Vào ngày 10, chuột bị DPNP được phân ngẫu nhiên thành 2 nhóm đối chứng âm (chỉ xe, PBS) và 100 pmol/Kg "ASO 1" và dựa trên điểm số von Frey của từng động vật trong Ngày 10 bằng cách sử dụng các vi chất von Frey như được mô tả dưới đây. (N = 8 mỗi nhóm)

[Ghi điểm Von Frey theo phương pháp Lên & Xuống (Von Frey Scoring by Up & Down Method)] Dị cảm đau (allodynia) được ghi điểm bằng một bộ vi chất von Frey (Touch Test[®]) theo phương pháp "Lên & Xuống". [*J Neurosci. Các phương pháp* vol 53 (1), 55-63 (1994)]

[Sử dụng ASO & ghi điểm dị cảm đau (allodynia)] "ASO 1" được hòa tan trong PBS và tiêm dưới da cho chuột trong các ngày 11, 13, 15, 17 và 19. Dị cảm đau (allodynia) đã được ghi 2 giờ sau liều trong các ngày 11, 13, 15, 17 và 19, và thêm vào đó là ngày 21 và 23 để đánh giá thời gian của hoạt động trị liệu sau liều cuối cùng.

[Sự đảo ngược của dị cảm đau (Reversal of Allodynia)] Hình 18A tóm tắt các kết quả quan sát được của các điểm von Frey. Các động vật trong nhóm đối chứng âm cho thấy ngưỡng von Frey ổn định trong khoảng từ 6 đến 7 g trong khoảng thời gian từ ngày 10 đến 23. Trong các động vật nhận được "ASO 1" ở tốc độ 100 pmol/Kg, dị cảm đau đáng kể (thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) đã đảo ngược khoảng 80% sau 2 giờ sau liều đầu tiên, tức là vào ngày 11. Hoạt động trị liệu hơi tăng nhưng tăng dần đến 90% khi ASO được lặp đi lặp lại cho đến ngày 19. Do hoạt động trị liệu đã được rửa sạch hoàn toàn sau 2 ngày dùng liều cuối cùng, tức là vào ngày 21, "ASO 1" có thể không có thời gian bán hủy dược lý đủ lâu để hỗ trợ lịch dùng thuốc mỗi ngày hai lần, tức là Q2D.

Tuy nhiên, "ASO 1" cho thấy thời gian khởi phát của một vài giờ trong sự đảo ngược của allodynia nếu được đánh giá bằng điểm số von Frey trong Ngày 11.

Ví dụ 10. Sự đảo ngược của dị cảm đau (Reversal of Allodynia) nhờ điều trị bằng "ASO 2" và "ASO 6" ở chuột bị DPNP.

"ASO 6" là một ASO 13 mer gắn kết bổ sung với chuỗi 13 mer của vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 3 và exon 4 trong tiền mARN SCN9A ở người được đánh dấu "bôi đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền mARN SCN9A 25-mer của [(5' → 3') uuguguuuag | GUACACUUUUACUGG]. "ASO 6" có lớp phủ 5 mer với intron 3 và lớp phủ 8 mer với exon 4. Mặc dù "ASO 2" và "ASO 6" nhắm vào cùng một trình tự trong tiền mARN SCN9A ở người, "ASO 6" được coi là có ái lực mạnh hơn đối với ARN bổ sung hơn là "ASO 2".

"ASO 2" và "ASO 6" đã được đánh giá về khả năng đảo ngược dị cảm đau do DPNP gợi ra ở chuột như được mô tả trong "Ví dụ 9", trừ khi có ghi chú khác.

Bệnh tiểu đường được gây ra ở các con chuột SD đực (6 tuần tuổi, Phòng thí nghiệm Harlan, Ý) bằng cách tiêm streptozotocin trong màng bụng với liều 60 mg/Kg trong ngày -10. Trong Ngày 0, 18 động vật có điểm von Frey thấp nhất đã được chọn và gán cho ba nhóm đối chứng âm (chỉ xe, PBS), 60 pmol/Kg "ASO 2" và 30 pmol/Kg "ASO 6". (N = 6 mỗi nhóm) Chuột được tiêm dưới da bằng xe hoặc ASO hòa tan trong PBS trong các ngày 0, 2 và 4. Dị cảm đau (allodynia) được tính điểm bằng phương pháp von Frey điện tử như được mô tả trong "Ví dụ 5".

[Sự đảo ngược của dị cảm đau (Reversal of Allodynia)] Hình 18B tóm tắt các điểm von Frey được quan sát. Các động vật trong nhóm đối chứng âm cho thấy ngưỡng von Frey trung bình ổn định ở khoảng 10 đến 12 g trong khoảng thời gian từ ngày 0 đến 9.

Ở những động vật nhận được 60 pmol/Kg "ASO 2", dị cảm đau đã dần dần trở lại mức cơ bản mà không có bệnh lý thần kinh tiểu đường (tức là mức độ hồi phục hoàn toàn theo ngưỡng lịch sử trong nhà) trong Ngày 4 đăng liều đầu tiên vào Ngày 0. Hoạt động trị liệu đáng kể (thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) vẫn tồn tại trong 3 ngày nữa sau khi dùng liều cuối cùng trong Ngày 4.

Trong các động vật nhận được 30 pmol/Kg "ASO 6", hoạt động trị liệu đáng kể (thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) đã diễn ra trong Ngày 2, và tồn tại thêm 4 ngày nữa sau liều cuối cùng vào Ngày 4. Do đó, "ASO 6" đã đảo ngược allodynia mạnh hơn so nhờ điều trị bằng "ASO 2". Không giống như "ASO 1"

trong "Ví dụ 9", "ASO 6" cho thấy thời gian hoạt động trị liệu đủ dài để hỗ trợ lịch dùng thuốc 2 lần mỗi tuần ở chuột.

[Các kiểu khác (Miscellaneous)] Khi bệnh tiểu đường vẫn tồn tại, động vật trong nhóm kiểm soát tiêu cực có dấu hiệu suy sụp về thể chất trong quá trình ghi điểm von Frey. Các động vật trong các nhóm điều trị rất sống động và phản ứng với thử thách von Frey, phù hợp với hoạt động trị liệu của các ASO.

Ví dụ 11. Hoạt động giảm đau của "ASO 7" trong thử nghiệm formol ở chuột.

Con đau gây ra do mũi tiêm intraplantar 20 μ L 2% formol giảm rõ rệt ở chuột KO SCN9A toàn cầu. Mức độ ức chế là 73% và 86% đối với Giai đoạn I (0 đến 10 phút sau khi tiêm formol) và Giai đoạn II (15 đến 45 phút sau khi tiêm formol). [*PLoS One* vol 9 (9), e105895 (tháng 9 năm 2014)]

"ASO 7" có một bất cặp sai đơn ở đầu 5' của chuột SCN9A trước mARN và được đánh giá về hoạt tính giảm đau của nó trong thử nghiệm formol ở chuột như sau.

[Phân nhóm và điều trị bằng ASO] Trong Ngày -6, 24 con các con chuột SD đực (6 tuần tuổi, Phòng thí nghiệm Harlan, Ý) được phân ngẫu nhiên vào 4 nhóm đối chứng âm tính (không điều trị bằng ASO) và ba nhóm điều trị bằng "ASO 7" gồm 10, 30 và 100 pmol/Kg. (N = 6 mỗi nhóm) Mỗi nhóm động vật được tiêm dưới da "ASO 7" ở mức 0 (đối chứng âm), 10, 30 hoặc 100 pmol/Kg trong Ngày -6 và -2. "ASO 7" đã được pha loãng trong PBS để tiêm.

[Thử nghiệm formol (Formalin Test)] Vào ngày 0, con đau cấp tính được gây ra do mũi tiêm intraplantar 50 μ L 5% formol ở chân sau bên trái. Ngay sau khi tiêm formol, mỗi con chuột đã được quay video riêng trong một giờ sau khi tiêm formol. Video được phát lại để ghi điểm trực quan các phản ứng đau cho từng con vật thí nghiệm.

[Hoạt động giảm đau] Hình 19A tóm tắt các điểm đau được quan sát theo nhóm tại các thời điểm khác nhau sau khi tiêm formol. Các phản ứng đau ở Giai đoạn II (AUC trong khoảng từ 10 đến 40 phút) đã giảm đáng kể (* $p < 0,05$ khi

thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) xuống 33%, 36% và 32% trong các nhóm điều trị 10, 30 và 100 pmol/Kg, tương ứng. Trong khi đó, các phản ứng đau ở Giai đoạn I (AUC trong khoảng từ 0 đến 10 phút) giảm 14%, 40% và 43% mà không có ý nghĩa thống kê trong các nhóm điều trị lần lượt là 10, 30 và 100 pmol/Kg.

Ví dụ 12. Hoạt động giảm đau của "ASO 10" trong thử nghiệm formol ở chuột.

"ASO 10" được chỉ định trong Bảng 1 là SCN9A ASO 14 phần bổ sung một phần cho tiền mARN SCN9A ở người với một sự không khớp duy nhất ở đầu 5' của trình tự tiền mARN đích được đánh dấu là "đậm" và "gạch chân" trong SCN9A 25-mer tiền mARN trình tự các [(5' → 3') uugu "g" uuuag | GUACACUU UUACUGG], trong đó không phù hợp duy nhất trong intron 3 được đánh dấu bằng dấu trích dẫn (" "). Trong khi đó, "ASO 10" hoàn toàn bổ sung cho vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 3 và exon 4 trong chuột SCN9A trước mARN như được đánh dấu " **đậm** " và " **gạch chân** " trong tiền tố SCN9A 20 điểm -mARN trình tự của [(5' → 3') uuuc uuuag | GUACACUU UU]. "ASO 10" có sự trùng lặp 6 mer với intron 3 và 8 mer chồng chéo với exon 4.

"ASO 10" được đánh giá về hoạt tính giảm đau của nó trong thử nghiệm formol ở chuột như được mô tả trong "Ví dụ 11", trừ khi có ghi chú khác.

[Phân nhóm và Điều trị bằng ASO] 36 con các con chuột SD đực (7 tuần tuổi, Phòng thí nghiệm Harlan, Ý) được phân ngẫu nhiên vào bốn nhóm đối chứng âm tính (không Điều trị bằng ASO) và ba nhóm điều trị "ASO 10" gồm 15, 50 và 150 pmol/Kilôgam. (N = 9 mỗi nhóm) Mỗi nhóm động vật được tiêm dưới da nhờ điều trị bằng "ASO 10" ở mức 0 (đối chứng âm), 15, 50 hoặc 150 pmol/Kg trong Ngày -6 và -2. ASO được quản lý như đã giải thể trong PBS.

[Hoạt động giảm đau] Hình 19B tóm tắt các điểm đau quan sát theo nhóm tại các thời điểm khác nhau. Các phản ứng đau ở Giai đoạn II (AUC trong khoảng từ 10 đến 40 phút) giảm đáng kể (thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) lần lượt là

17% và 4 1% trong các nhóm điều trị 15 và 50 pmol/Kg. Tôi n khi đó, phản ứng đau ở giai đoạn I (AUC giữa 0 và 10 phút) giảm đáng kể 38% và 50% trong nhóm điều trị từ 15 đến 50 pmol/Kg, tương ứng.

Thật thú vị, nhóm 150 pmol/Kg không thể hiện thị hoạt động trị liệu cả trong Giai đoạn I và Giai đoạn II. "ASO 10" ở 150 pmol/Kg sẽ là quá liều gây ra sự điều hòa phiên mã bởi "ARN vòng tròn exon intron (EIciARN)" được tích lũy trong quá trình nhảy Exon nhờ điều trị bằng "ASO 10 ". [*Nature Struc.Mol Biol.* tập 22 (3), 256-264 (2015)].

Ví dụ 13. Ưc chế biểu hiện Nav1.7 trong DRG L5 nhờ điều trị bằng "ASO 7" ở những con chuột bị tổn thương với mũi tiêm Intraplantar formol.

"ASO 7" được IHC (hóa mô miễn dịch) đánh giá về khả năng của nó để ức chế sự biểu hiện của Nav1.7 trong DRG L5 của các con chuột SD đực bị tổn thương với mũi tiêm Intraplantar formol như sau.

[Điều trị bằng ASO và tiêm formol (ASO Treatment and Formalin Injection)] Vào ngày -5, các con chuột SD đực (6 tuần tuổi, Phòng thí nghiệm Harlan, Ý) được phân ngẫu nhiên vào 4 nhóm đối chứng âm tính (không Điều trị bằng ASO) và ba nhóm điều trị "ASO 7" của 1, 6 và 30 pmol/Kg. Mỗi nhóm động vật được tiêm dưới da "ASO 7" ở mức 0 (đối chứng âm), 1, 6 hoặc 3 0 pmol/Kg trong các ngày -5 và -1. "ASO 7" đã được pha loãng trong PBS và được sử dụng để tiêm. Trong ngày 0, tất cả các động vật đã được tiêm một mũi tiêm intraplantar formol 50 μ L 5%.

[Trích xuất DRG L5 và Nav1.7 IHC] Vào ngày 8, những con chuột được gây mê bằng zoletil/rompun và được lấy mẫu DRG L5 của bên được tiêm chính thức. (N = 2 mỗi nhóm) Các mẫu DRG phải tuân theo Nav1.7 IHC như được mô tả ngắn gọn dưới đây.

Các mẫu DRG được phân tích bằng cryo và được bảo vệ miễn dịch nối tiếp với kháng thể kháng Nav1.7 chính (Cat. Số ASC-008, Alomon) với tỷ lệ pha loãng 1:500, với kháng IgG thứ cấp (Cat số BA -1100, Vector) với độ pha loãng 1: 200, và sau đó với Dylight 594-steptavidin (Cat số SA-5594, Vector, CA, USA) với độ

pha loãng 1:200 để gắn thẻ huỳnh quang màu đỏ. Hình ảnh IHC được chụp trên máy quét slide Zeiss cho biểu thức $Na_v1.7$ trong DRG.

[Ức chế biểu hiện $Na_v1.7$ trong DRG L5] Hình 20A cung cấp một bộ ảnh đại diện của $Na_v1.7$ IHC theo nhóm. Biểu hiện $Na_v1.7$ trong DRG cao đáng chú ý ở nhóm đối chứng âm so với biểu hiện ở nhóm Điều trị bằng ASO.

Mức độ màu đỏ trong mỗi hình ảnh IHC riêng lẻ được ghi bằng kỹ thuật số bằng cách sử dụng chương trình NIH ImageJ và các cấp độ riêng lẻ được phân tích thống kê theo nhóm. ($N = 2$ mỗi nhóm) Hình 20B tóm tắt mức biểu thức $Na_v1.7$ được định lượng kỹ thuật số theo nhóm. Mức độ biểu hiện $Na_v1.7$ giảm đáng kể (thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) khoảng 50 ~ 60% trong tất cả các nhóm Điều trị bằng ASO.

Ví dụ 14. Sự đảo ngược của dị cảm đau (Allodynia) ở chuột bị bệnh thần kinh cột sống nhờ điều trị bằng "ASO 10" (1).

"ASO 10" được đánh giá về khả năng đảo ngược dị cảm đau ở chuột bị bệnh thần kinh cột sống gây ra bởi "sự thắt L5/L6" như mô tả trong "Ví dụ 6" trừ khi có ghi chú khác.

[phân nhóm] Vào ngày -14, các con chuột SD đực (5 tuần tuổi, Phòng thí nghiệm Harlan, Ý) đã bị "thắt L5/L6". Trong Ngày 0, 36 động vật đã được chọn dựa trên điểm số von Frey cá nhân của chúng trong Ngày 0 và được chỉ định cho 4 nhóm của nhóm đối chứng âm (nghĩa là không Điều trị bằng ASO), ba nhóm Điều trị bằng ASO là 1, 3 và 10 pmol/Kg. ($N = 9$ mỗi nhóm)

[Điều trị bằng ASO và chấm điểm Von Frey] Chuột được tiêm dưới da vào buổi chiều "ASO 10" ở 0 (đối chứng âm), 3 và 10 pmol/Kg trong các ngày 0, 3 và 7. Trong nhóm điều trị 1 pmol/Kg, liều ban đầu là 1 pmol/Kg vào ngày 0, sau đó tăng lên 30 pmol/Kg trong ngày 3 và 7 do thiếu hoạt động trị liệu vào lúc 1 pmol/Kg trong ngày 2 và 3.

[Sự đảo ngược của dị cảm đau] Hình 21A tóm tắt các điểm von Frey được quan sát. Các động vật trong nhóm đối chứng âm cho thấy điểm von Frey trung

bình (ngưỡng vật vã vì thiếu thuốc) ổn định trong khoảng từ 6 đến 7 g trong khoảng thời gian 9 ngày sau khi phân nhóm.

Allodynia đã được đảo ngược dần dần và đáng kể trong khoảng thời gian một tuần bởi chính quyền nhờ điều trị bằng "ASO 10" ở mức 3 đến 30 pmol/Kg. Các hoạt động trị liệu được đưa ra cho điểm von Frey của khoảng 13 g cho tất cả các nhóm điều trị.

Tuy nhiên, trong nhóm 1 pmol/Kg, hoạt động trị liệu bắt đầu tăng sau khi tăng liều từ 1 pmol/Kg lên 30 pmol/Kg trong ngày 3. Allodynia đã đảo ngược đáng kể khoảng 40% trong Ngày 6 sau khi tăng liều lên 30 pmol/Kg, nếu ngưỡng nền lịch sử của khoảng 18 g được lấy là điểm von Frey mà không cần thất "L5/L6". Hiệu quả giảm đau tăng lên khoảng 60% trong ngày 8.

Trong nhóm 3 pmol/Kg, allodynia đã được đảo ngược đáng kể (thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) vào Ngày 6 với hiệu quả khiêm tốn (khoảng 40 ~ 50%). Hiệu quả điều trị tăng lên 65 + % trong ngày 8.

Trong nhóm 10 pmol/Kg, allodynia đã đảo ngược đáng kể trong Ngày 4 với hiệu quả khoảng 25 ~ 30%. Hiệu quả điều trị tăng lên khoảng 60% trong ngày 9. Tuy nhiên, hiệu quả vẫn trì trệ từ ngày 6.

Ví dụ 15. Sự đảo ngược của dị cảm đau (Allodynia) ở chuột bị bệnh thần kinh cột sống nhờ điều trị bằng "ASO 10".

"ASO 10" được đánh giá về khả năng đảo ngược dị cảm đau ở chuột bị bệnh thần kinh cột sống gây ra bởi "thất L5/L6" như mô tả trong "Ví dụ 6" trừ khi có ghi chú khác.

[Phân nhóm] Vào ngày -10, các con chuột SD đực (6 tuần tuổi, Phòng thí nghiệm Harlan, Ý) đã bị "thất L5/L6". Trong Ngày 0, 36 động vật đã được chọn dựa trên điểm số von Frey cá nhân của chúng trong Ngày 0 và được chỉ định ngẫu nhiên cho 4 nhóm của nhóm đối chứng âm (nghĩa là không Điều trị bằng ASO), mỗi nhóm Điều trị bằng ASO 100 pmol/Kg mỗi lần 4 hoặc 5 ngày và nhóm kiểm soát dương tính với thuốc pregabalin 30 mg/Kg. (N = 9 mỗi nhóm)

[Điều trị bằng ASO và chấm điểm Von Frey] Chuột được tiêm dưới da vào buổi chiều "ASO 10" ở 0 (đối chứng âm), 100 pmol/Kg trong Ngày 0 và 4, 100 pmol/Kg trong Ngày 0 và 5. Allodynia đã được ghi vào buổi sáng hàng ngày. Những con chuột của nhóm kiểm soát dương tính được dùng bằng đường uống với thuốc pregabalin 30 mg/Kg một giờ trước khi ghi điểm von Frey. ASO được quản lý như đã giải thể trong PBS.

[Sự đảo ngược của dị cảm đau (Reversal of Allodynia)] Hình 21B tóm tắt các điểm von Frey được quan sát. Các động vật trong nhóm đối chứng âm cho thấy điểm von Frey trung bình (ngưỡng vật vã vì thiếu thuốc) ổn định trong khoảng từ 6 đến 7 g trong khoảng thời gian 7 ngày sau lần Điều trị bằng ASO đầu tiên. Những con chuột trong nhóm 30 mg/Kg thuốc pregabalin cho thấy điểm von Frey trung bình khoảng 10 ~ 11 g, mặc dù điểm số quan sát được trong Ngày 7 là khoảng 13 g do thuốc an thần.

Trong nhóm Điều trị bằng ASO cứ sau 4 ngày một lần, allodynia đã đảo ngược đáng kể (thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) trong tất cả các lần thử nghiệm trong Ngày 3, 6 và 7, và vượt trội hơn đáng kể so với thuốc pregabalin 30 mg/Kg trong Ngày 3 và 6. Do đó, tần suất dùng thuốc cứ sau 4 ngày một lần ở chuột dường như là phù hợp để duy trì hoạt động trị liệu vượt trội so với thuốc pregabalin 30 mpk. Cần lưu ý rằng allodynia đã được đảo ngược trong Ngày 8 để đạt 90% mức cơ bản mà không có bệnh lý thần kinh cột sống chống lại bối cảnh lịch sử trong nhà.

Trong nhóm Điều trị bằng ASO cứ sau 5 ngày một lần, allodynia đã được đảo ngược đáng kể (thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) trong tất cả các lần thử nghiệm trong Ngày 3, 6 và 7, và vượt trội hơn đáng kể so với thuốc pregabalin 30 mg/Kg chỉ trong Ngày 3. Do đó, tần suất dùng thuốc cứ sau 5 ngày lại xuất hiện quá lâu để đảm bảo hoạt động trị liệu vượt trội hơn đáng kể so với thuốc pregabalin 30 mg/Kg.

[Na_v1.7 Biểu hiện ở tủy sống] Vào ngày 7, động vật được gây mê bằng zoletil/rompun, được tưới máu bằng PBS bổ sung chính thức để bảo vệ tính toàn vẹn cấu trúc của tủy sống và được lấy mẫu tủy sống. (N = 3 mỗi nhóm) Các mẫu

tủy sống được xử lý thành khối parafin và được xử lý IHC theo trình tự cho biểu hiện Na_v1.7 (nhuộm màu đỏ) với kháng thể Na_v1.7 (Cat. Số ASC-008, Alomon) và đối với cơ thể tế bào thần kinh (nhuộm màu xanh lá cây) với kháng thể Neu (Cat. Số Ab104224, Abcam). Hạt nhân được nhuộm bằng DAPI (màu xanh).

Hình 22 cung cấp hình ảnh IHC được chụp trên máy quét slide Zeiss. Mức độ biểu hiện Na_v1.7 giảm rõ rệt trong các mẫu tủy sống của nhóm Điều trị bằng ASO với liều trong Ngày 0 và 4 so với mức độ biểu hiện trong các mẫu tủy sống của nhóm đối chứng âm. Do đó, ASO dường như đã phân phối dễ dàng đến tủy sống và ức chế sự biểu hiện của Na_v1.7 trong tủy sống khi tiêm dưới da.

Ví dụ 16. Ức chế biểu hiện Na_v1.7 trong các tế bào thần kinh DRG ở chuột nhờ điều trị bằng "ASO 10".

"ASO 10" được đánh giá về khả năng ức chế sự biểu hiện của Na_v1.7 trong các tế bào thần kinh DRG L5 của chuột như mô tả dưới đây.

[Điều chế tế bào thần kinh DRG L5] các con chuột SD đực (7 tuần tuổi, Phòng thí nghiệm Harlan, Ý) đã bị buộc chặt "thắt L5/L6" như mô tả trong "Ví dụ 5". 7 ngày sau đó, 4 con chuột đã được gây mê bằng zoletil/rompun để trích xuất DRG L5 của bên thắt. Các DRG được gộp chung và xử lý để điều chế các tế bào thần kinh DRG như được mô tả trong "Ví dụ 8".

[Điều trị bằng ASO] Các tế bào thần kinh DRG được xử lý bằng "ASO 10" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM trong 24 giờ, và sau đó bị ly giải để làm mờ vết thương của phương Tây đối với kháng thể Na_v1.7 (Cat. Không. ab85015, Abcam) thăm dò đầu C của protein Na_v1.7. β -actin đã được thăm dò để tham khảo. Các dung dịch gốc "ASO 10" đã được hòa tan trong DDW và được chia thành môi trường nuôi cấy.

[Ức chế biểu hiện Na_v1.7] Hình 23A cung cấp dữ liệu blot phía tây thu được với các tế bào thần kinh DRG được xử lý bằng "ASO 10" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1,000 zM. Tất cả các lysate mang lại một dải mạnh ở mức 170 ~ 200K, đó sẽ là chất chuyển hóa của protein Na_v1.7. Dải protein Na_v1.7 có độ dài đầy đủ được phát hiện ở mức 220 ~ 240K chỉ với các lysates của đối chứng âm và 10 zM

"ASO 10". Do đó, biểu hiện $Na_v1.7$ đã bị ức chế hoàn toàn trong các tế bào thần kinh DRG của chuột sau khi ủ 24 giờ nhờ điều trị bằng "ASO 10" ở 100 đến 1.000 zM.

"ASO 10" là ASO 14 mer bổ sung đầy đủ cho tiền mARN của chuột SCN9A, trong khi "ASO 7" là ASO 14-mer bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người. Các cấu hình ức chế SCN9A thu được nhờ điều trị bằng "ASO 10" trong các tế bào thần kinh chuột có thể được dự đoán ngoại suy thành các cấu hình ức chế SCN9A của "ASO 7" trong các tế bào thần kinh ở người.

Ví dụ 17. PCR định lượng (qPCR) cho mARN SCN9A trong các tế bào thần kinh DRG ở chuột được xử lý bằng "ASO 10" với cADN được tổng hợp bằng PCR một bước.

"ASO 10" được đánh giá bởi phương pháp qPCR lồng nhau SCN9A về khả năng tạo ra những thay đổi về mức độ mARN SCN9A của chuột trong các tế bào DRG của chuột như được mô tả dưới đây.

[Điều chế các tế bào thần kinh DRG L5] Một con chuột SD đực (6 tuần tuổi, Phòng thí nghiệm Harlan, Ý) đã được gây mê bằng zoletil/rompun để trích xuất DRG L5s. Các mẫu DRG L5 đã được xử lý như mô tả trong "Ví dụ 8" để điều chế các tế bào thần kinh DRG L5.

[Điều trị bằng ASO] Các tế bào thần kinh Rat DRG L5 được xử lý bằng "ASO 10" ở 0 (đối chứng âm), 10, 30, 100 hoặc 300 zM. (1 đĩa nuôi cấy trên mỗi nồng độ ASO) Các dung dịch gốc "ASO 10" đã được hòa tan trong DDW và được chia thành môi trường nuôi cấy.

[Trích xuất ARN & Tổng hợp cADN bằng phương pháp PCR một bước] Sau khi ủ nhờ điều trị bằng "ASO 10" trong 24 giờ, tổng ARN được chiết xuất từ các tế bào bằng cách sử dụng Kit chiết tách ARN phổ quát (Cat. Số 9767, Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu ARN 200 ng đã bị phản ứng sao chép ngược 25 μ L sử dụng bộ công cụ One Step RT-PCR (Invitrogen, Hoa Kỳ) chống lại một bộ mồi đặc hiệu exon của [exon 2_tịnh tiến: (5' $\rightarrow$ 3') CAATCTTCCG-TTCAACGCC, và exon 10 reverse: (5' $\rightarrow$ 3')]

ACCACAGCCAGGATCAAGTT] theo các điều kiện chu trình sau: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, sau đó là 15 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 55°C, và 2 phút ở 72°C.

[Sự khuếch đại qPCR dạng lồng] Các dung dịch cADN (nhân đôi trên mỗi nồng độ ASO) đã được pha loãng 100 lần và 1 µL mỗi dung dịch cADN pha loãng đã chịu phản ứng PCR thời gian thực 20 withL với đầu dò TaqMan (Cat. Số Rn01514993_mH, ThermoFisher) nhắm đích giao lộ giữa exon 3 và exon 4 trong SCN9A tiền mARN theo các điều kiện chu kỳ sau: 95°C trong 30 giây tiếp theo là 40 chu kỳ 5 giây ở 95°C, và 30 giây tại 60°C.

Hình bên trái trong Hình 23B tóm tắt dữ liệu qPCR được quan sát, trong đó mức mARN SCN9A có độ dài đầy đủ giảm đáng kể (thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) trong các tế bào được xử lý bằng "ASO 10" khoảng 50 ~ 60%.

Ví dụ 18. PCR định lượng (qPCR) cho mARN SCN9A trong các tế bào thần kinh DRG ở chuột được điều trị bằng "ASO 10" với sự tổng hợp cADN với Hexamers ngẫu nhiên.

"ASO 10" được qPCR SCN9A đánh giá về khả năng ức chế sự biểu hiện của mARN SCN9A trong các tế bào thần kinh DRG L5 của chuột. ARN tổng được điều chế như mô tả trong "Ví dụ 15 SCN9A" và chịu sự tổng hợp cADN bằng cách sử dụng hexamers ngẫu nhiên. Các dung dịch cADN (nhân đôi trên mỗi nồng độ ASO) đã được pha loãng 100 lần và 1 µL của mỗi sản phẩm PCR được pha loãng đã bị phản ứng PCR thời gian thực 20 µL với đầu dò TaqMan nhắm vào điểm nối của SCN9A exon 3 và exon 4 các điều kiện chu trình sau: 95°C trong 30 giây tiếp theo 40 chu kỳ 5 giây ở 95°C và 30 giây ở 60°C.

Các dung dịch cADN cũng đã được khuếch đại qPCR cho ARN thông tin GAPDH. Các giá trị Ct của ARN thông tin SCN9A đã được chuẩn hóa so với các giá trị Ct của GAPDH ARN thông tin.

Hình bên phải trong Hình 23B cung cấp dữ liệu qPCR SCN9A được chuẩn hóa theo GAPDH. Mức độ biểu hiện mARN SCN9A chiều dài đầy đủ giảm đáng

kể (thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) trong các tế bào được xử lý nhờ điều trị bằng "ASO 10" khoảng 45 ~ 75%.

Ví dụ 19. Ức chế dòng natri trong các tế bào thần kinh DRG L5 nhờ điều trị bằng "ASO 10" (1).

"ASO 10" được đánh giá về khả năng ức chế dòng natri trong các tế bào thần kinh DRG L5 của chuột như sau.

[Điều chế tế bào thần kinh DRG] các con chuột SD đực (5 tuần tuổi, Daehan Biolink, Hàn Quốc, www.dbl.co.kr) đã bị buộc chặt "thắt L5/L6" như mô tả trong "Ví dụ 5". 10 đến 14 ngày sau khi thắt, chuột được gây mê bằng zoletil/rompun để chiết xuất DRG L5 của bên thắt. Các tế bào thần kinh DRG L5 đã được điều chế như mô tả dưới đây.

- ① DRG L5 được chiết xuất acutely từ chuột được chuyển thành một 1,5 mL e-ống chứa 0,2 ml 0,125% collagenaza (collagenaza Loại IV, Cat. No. C5138-100MG, Sigma) trong HBSS (Balanced Salt Solution của Hank, Cát Số. 14025-092, Life Technologies), xắt nhỏ thành từng miếng càng nhỏ càng tốt bằng kéo, và sau đó ủ trong 20 phút trong một lồng ấp CO₂ ở 37°C dưới 5% CO₂ và 95% rh;
- ② sau đó 50 µL 0,25% trypsin/EDTA đã được thêm vào ống điện tử, được giữ trong tủ ấm thêm 10 phút nữa;
- ③ e-ống bị buộc tội vừa DMEM 1 mL hoàn tất, và chịu lắng ly tâm tại 600g trong 5 phút;
- ④ sau đó các viên kết quả được treo và vận chuyển như được niêm phong trong ống falcon 15 mL chứa khoảng 15 mL Neurobasal-A môi trường;
- ⑤ Sau khi vận chuyển khoảng một giờ, 0,5 ml huyền phù tế bào đã được gieo cẩn thận vào một tấm kính được phủ bằng gỗ được đặt trong một cái đĩa nuôi cấy 24 giếng;
- ⑥ tấm nền văn hóa được ủ trong tủ nuôi cấy CO₂ ở 37°C trong 2 giờ để gắn các tế bào lên tấm kính.

[Điều trị bằng ASO] Các tế bào thần kinh DRG L5 được điều chế như trên được xử lý bằng "ASO 10" ở 0 (đối chứng âm), 10, 30 hoặc 100 zM và được giữ trong lồng ấp trong 4 giờ. Các dung dịch gốc ASO đã được điều chế trong DDW

bổ sung 0,1% (v/v) Tween80. Mỗi dung dịch gốc (bao gồm cả phương tiện chỉ dành cho đối chứng âm) được phân bổ vào môi trường nuôi cấy để chứa 0,0001% (v/v) Tween80 cho các thử nghiệm kẹp vá.

[Xét nghiệm kẹp ráp nối thủ công] Sau đó, các tế bào thần kinh DRG phải chịu các xét nghiệm kẹp kẹp thủ công hiện tại bằng natri trên thiết bị kẹp vá natri (Bộ khuếch đại Axopatch 200B, Dụng cụ Axon). Các thử nghiệm kẹp vá thường mất 4 giờ. Do đó, các tế bào được coi là đã được xử lý bằng ASO trong 4 đến 8 giờ (tức là trung bình khoảng 6 giờ).

[Phân tích & phân tích dữ liệu] Thí nghiệm trên được lặp lại trong nhiều lần độc lập để tăng sức mạnh thống kê cho mỗi liều ASO. Chỉ có dữ liệu hiện tại natri từ các tế bào nhạy cảm TTX được đưa vào nhóm để phân tích thống kê.

Hình 23C tóm tắt dữ liệu dòng natri tổng hợp được chuẩn hóa theo kích thước tế bào của các tế bào thần kinh DRG. Dòng natri giảm dần khi nồng độ ASO tăng từ 10 zM lên 100 zM. Dòng natri giảm đáng kể khoảng 40% trong các tế bào được xử lý với 100 zM "ASO 10" trong khoảng 6 giờ trung bình. Cho rằng các tế bào thần kinh DRG không chỉ thể hiện $Na_v1.7$ mà còn các kiểu phụ khác của kênh natri cảm ứng điện thế, nên giảm mức độ quan sát của khoảng 40% trong dòng natri ở 100 zM "ASO 10" như được đánh dấu cho $Na_v1.7$ hạ gục nhờ điều trị bằng "ASO 10".

Ví dụ 20. Ức chế dòng natri trong tế bào thần kinh DRG L5 nhờ điều trị bằng "ASO 10" (2).

Đánh giá nội bộ của chuột từ một số nhà cung cấp cho thấy mức độ biểu hiện $Na_v1.7$ trong DRG L5 sẽ thay đổi nhiều theo tuổi và nhà cung cấp. "ASO 10" được đánh giá về khả năng ức chế dòng natri trong các tế bào thần kinh DRG L5 của chuột ở một nguồn khác như mô tả trong "Ví dụ 19", trừ khi có ghi chú khác.

[Điều chế tế bào thần kinh DRG] các con chuột SD đực (5 tuần tuổi, Phòng thí nghiệm Harlan/Envigo, Đan Mạch) đã bị buộc chặt "thắt L5/L6" như mô tả trong "Ví dụ 5". 10 đến 14 ngày sau khi thắt, chuột được gây mê bằng

zoletil/rompun để chiết xuất DRG L5 của bên thất. Các tế bào thần kinh DRG L5 đã được điều chế như mô tả dưới đây.

[Điều trị bằng ASO] Các tế bào thần kinh DRG L5 được điều chế như trên được xử lý bằng "ASO 10" ở 0 (đối chứng âm) hoặc 100 zM, và được giữ trong lồng ấp trong 4 giờ. Các dung dịch gốc ASO vì vậy đã được điều chế trong DDW.

Dòng natri bình thường hóa so với kích thước tế bào đáng kể ($p < 0,05$) giảm khoảng 55% trong các tế bào được xử lý với 100 zM "ASO 10" trong khoảng 6 giờ trung bình. ($N = 14$ cho đối chứng âm; và $N = 15$ cho 100 zM "ASO 10") Dòng natri được chuẩn hóa cho đối chứng âm cao hơn 37% trong ví dụ này so với "Ví dụ 19". Do đó, sự đóng góp của $Na_v1.7$ vào dòng natri trong các tế bào thần kinh DRG nên cao hơn đáng kể ở những con chuột từ Phòng thí nghiệm Harlan của ví dụ này so với những con chuột từ Daehan Biolink của "Ví dụ 19".

Ví dụ 21. Sự đảo ngược của dị cảm đau (Allodynia) nhờ điều trị bằng "ASO 7" ở chuột bị bệnh thần kinh cột sống. (2)

"ASO 7" được đánh giá về khả năng đảo ngược dị cảm đau ở chuột bị bệnh thần kinh cột sống gây ra bởi "thắt L5/L6" như mô tả trong "Ví dụ 6", trừ khi có ghi chú khác.

[Phẫu thuật và phân nhóm SNL ((SNL Surgery and Grouping))] Vào ngày -10, các con chuột SD đực (5 tuần tuổi, Daehan Biolink, Hàn Quốc, www.dbl.co.kr) đã bị "thắt L5/L6". Trong Ngày 0, 48 động vật đã được chọn dựa trên điểm số von Frey cá nhân thấp nhất trong Ngày 0 và được phân ngẫu nhiên vào 6 nhóm của nhóm đối chứng âm tính (nghĩa là không Điều trị bằng ASO), thuốc pregabalin 30 mg/Kg và bốn nhóm điều trị 5, 25, 125 và 625 fmol/Kg "ASO 7". (8 con mỗi nhóm)

[Điều trị bằng ASO và chấm điểm Von Frey] Chuột được tiêm dưới da "ASO 7" ở 0 (đối chứng âm), 1, 3 hoặc 6 pmol/Kg vào buổi chiều trong các ngày 0, 3, 6 và 9. Allodynia được ghi điểm bằng phương pháp tính điểm von Frey điện tử được mô tả trong "Ví dụ 5" vào buổi sáng. thuốc pregabalin được dùng bằng

đường uống một giờ trước mỗi dịp ghi điểm von Fret. ASO được quản lý dưới dạng hòa tan trong PBS bổ sung 0,1% Tween80.

[Reversal of Allodynia] Hình 24 A tóm tắt các kết quả quan sát được của các điểm von Frey. Các động vật trong nhóm đối chứng âm cho thấy điểm von Frey trung bình (ngưỡng vật vã vì thiếu thuốc) ổn định ở khoảng 6 g trong Ngày 4 đến 8. Trong khi đó, nhóm thuốc pregabalin 30 mg/Kg (nghĩa là nhóm đối chứng dương) cho thấy điểm von Frey trung bình ổn định ở mức 10 g. Cho rằng điểm số von Frey trung bình của khoảng 21 g đã được quan sát thấy ở những động vật ngây thơ (nghĩa là không cần thiết và điều trị), dị cảm đau đã được đảo ngược đáng kể trong các ngày 2, 4 và 6 đến 20 đến 30% trong nhóm điều trị pregabalin.

"ASO 7" đã đảo ngược đáng kể (thử nghiệm t của nhà nghiên cứu) sự mất ngủ ở Ngày 2 đến 8 ở mức 5 fmol/Kg, trong Ngày 2, 4 và 6 ở 25 và 125 fmol/Kg, và trong Ngày 4 và 6 ở mức 625 fmol/Kg. Nhóm tích cực nhất là nhóm 5 fmol/Kg, mặc dù không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm Điều trị bằng ASO. thuốc pregabalin cũng đảo ngược đáng kể allodynia từ 20 đến 30% trong Ngày 2 đến 8. Nhóm tích cực nhất là nhóm 5 fmol/Kg cho thấy sự đảo ngược 40% của allodynia, mặc dù không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm Điều trị bằng ASO. Tuy nhiên, hiệu quả của các nhóm điều trị không khác biệt đáng kể so với hiệu quả của nhóm pregabalin.

Ví dụ 22. Hoạt động giảm đau của "ASO 2" chống lại chứng đau do viêm bán mãn tính ở chuột.

"ASO 2" được đánh giá về khả năng ức chế cơn đau viêm bán mãn tính ở những con chuột bị tổn thương với mũi tiêm Intraplantar thuốc hỗ trợ đầy đủ của Freund (FCA) như được mô tả dưới đây.

[Gây viêm bán mãn tính] Trong ngày -17, chuột SD nam (7 tuần tuổi) nhận được tiêm nội plantar 100 μ L Fkhoảng (Cat. No. F5881-6X10ML, Sigma) trong chân sau bên trái.

[Ghi điểm đau do viêm & phân nhóm] Đau viêm ở chân sau trái được ghi bằng thử nghiệm Randall-Selitto bằng thiết bị Randall-Selitto điện tử [Model

2390, IITC Life Science]. Chuột được thả trên võng trong 10 phút trước khi ghi điểm đau. (N = 5 mỗi nhóm)

Trong ngày 0, 10 con vật ổn định cho thấy điểm đau thấp nhất trong vài ngày đã được chọn để phân nhóm. 10 động vật được chỉ định vào hai nhóm của nhóm đối chứng âm tính (không Điều trị bằng ASO) và nhóm điều trị ("ASO 2" 100 pmol/Kg).

[Đánh giá điều trị và giảm đau bằng ASO] Các động vật trong nhóm điều trị đã nhận được "ASO 2" vào lúc 100 pmol/Kg vào chiều ngày 0 và sáng ngày 1. ASO đã được giải thể trong PBS và tiêm dưới da. Đau được đánh giá 2 giờ sau liều vào ngày 1 và buổi sáng vào ngày 4.

[Hoạt động giảm đau] Hình 24B tóm tắt các điểm đau quan sát được. Ngưỡng đau của nhóm Điều trị bằng ASO trong Ngày 1 tăng lên khoảng 27 g so với giá trị trong Ngày 0, trong khi ngưỡng của nhóm đối chứng âm giảm xuống còn 3 g. Ngưỡng đau trước khi gây ra phù chân là khoảng 23 g. Do đó, việc dùng ASO đã đảo ngược hoàn toàn cơn đau do viêm mà không bị phù chân. Tuy nhiên, hoạt động giảm đau của "ASO 2" đã bị loại bỏ hoàn toàn trong Ngày 4.

thể, alkylsulfonyl được thể hoặc không được thể, arylsulfonyl được thể hoặc không được thể, gốc alkylphosphonyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc arylphosphonyl được thể hoặc không được thể;

Z thể hiện hydrido, hydroxy, alkyloxy được thể hoặc không được thể, aryloxy được thể hoặc không được thể, amino được thể hoặc không được thể, alkyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc aryl được thể hoặc không được thể;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazo tự nhiên bao gồm adenin, thymin, guanin, xytosin và uraxin và các nucleobazo không tự nhiên; và

ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazo không tự nhiên với gốc aminoo được thể hoặc không được thể gắn kết cộng hóa trị với gốc nucleobazo.

2. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 1 hoặc muối được dụng của nó:

trong đó,

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 10 đến 25;

Hợp chất có Công thức I có ít nhất một phần trùng lặp bổ sung 10 mer cho trình tự tiền mARN 14-mer của [(5' → 3') UGUUUAGGUACACU] bên trong tiền mARN SCN9A ở người;

Hợp chất có Công thức I bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người, hoặc bổ sung một phần cho tiền mARN SCN9A ở người với một hoặc hai vị trí bất cặp sai;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n một cách độc lập thể hiện deuterido, hydrido, alkyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc aryl được thể hoặc không được thể;

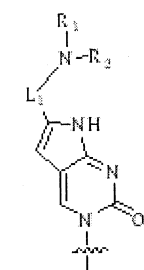
X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, formyl, aminocacbonyl, aminothiocacbonyl, alkyl được thể hoặc không được thể, aryl được thể hoặc không được thể, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, arylaxyl được thể hoặc không được thể, alkyloxyacacbonyl được thể hoặc không được thể, aryloxyacacbonyl được thể hoặc không được thể, alkylaminocacbonyl được thể

hoặc không được thế, arylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminothiocacbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminothiocacbonyl được thế hoặc không được thế, alkyloxythiocacbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxythiocacbonyl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, arylsulfonyl được thế hoặc không được thế, gốc alkylphosphonyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc arylphosphonyl được thế hoặc không được thế;

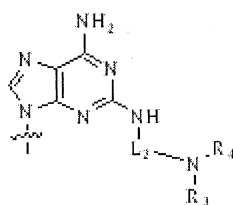
Z thể hiện hydrido, hydroxy, alkyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, amino được thế hoặc không được thế, alkyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ tự nhiên bao gồm adenin, thymin, guanin, xytosin và uraxin và các nucleobazơ không tự nhiên; và

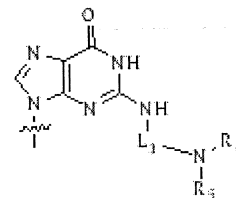
ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được thể hiện bằng Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV:



Công thức II



Công thức III

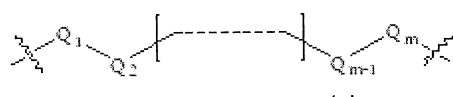


Công thức IV

trong đó,

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 và R_6 được chọn một cách độc lập từ hydrido, và gốc alkyl được thế hoặc không được thế;

L_1, L_2 và L_3 là một gắn kết cộng hóa trị được thể hiện bằng Công thức V gắn kết cộng hóa trị giữa nhóm amino bazơ với gốc nucleobazơ:



Công thức V

trong đó,

Q_1 và Q_m là gốc metylen ($-\text{CH}_2-$) được thế hoặc không được thế và Q_m được liên kết trực tiếp với nhóm amino bazơ;

$Q_2, Q_3, \dots$, và Q_{m-1} được chọn một cách độc lập từ metylen được thế hoặc không được thế, oxy ($-\text{O}-$), lưu huỳnh ($-\text{S}-$) và gốc amino được thế hoặc không được thế [$-\text{N}(\text{H})-$, hoặc $-\text{N}$ (nhóm thế)-]; và,

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 15.

3. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 2, trong đó $S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$, and T_n một cách độc lập thể hiện deuterido hoặc gốc hydrido và Z thể hiện hydrido, hydroxy, alkyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, gốc aminox được thế hoặc không được thế.

4. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 2, trong đó ít nhất một trong số các $S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$, và T_n một cách độc lập thể hiện alkyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế, và/hoặc Z thể hiện alkyl được thế hoặc không được thế hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế.

5. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 2 hoặc muối được dụng của nó:

trong đó,

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 21;

Hợp chất có Công thức I có ít nhất một phần trùng lặp bổ sung 10 mer cho trình tự tiền mARN 14-mer của $[(5' \rightarrow 3') \text{UGUUUAGGUACACU}]$ bên trong tiền mARN SCN9A ở người;

Hợp chất có Công thức I bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người, hoặc bổ sung một phần cho tiền mARN SCN9A ở người với một hoặc hai vị trí bất cặp sai;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n là gốc hydrido;

X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkyl được thể hoặc không được thể, aryl được thể hoặc không được thể, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, arylaxyl được thể hoặc không được thể, alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể, aryloxycarbonyl được thể hoặc không được thể, alkylaminocarbonyl được thể hoặc không được thể, arylaminocarbonyl được thể hoặc không được thể, alkylsulfonyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc arylsulfonyl được thể hoặc không được thể;

Z thể hiện gốc aminoo được thể hoặc không được thể;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ tự nhiên bao gồm adenin, thymine, guanin, xytosin và uraxin và các nucleobazơ không tự nhiên;

ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được thể hiện bằng Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 và R_6 được chọn một cách độc lập từ hydrido, và gốc alkyl được thể hoặc không được thể;

Q_1 và Q_m là gốc metylen được thể hoặc không được thể, và Q_m được liên kết trực tiếp với nhóm amino bazơ;

$Q_2, Q_3, \dots$ và Q_{m-1} được lựa chọn một cách độc lập từ metylen được thể hoặc không được thể, oxy và gốc aminoo; và

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 11.

6. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 5, trong đó X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkyl được thể hoặc không được thể, aryl được thể hoặc không được thể, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, arylaxyl được thể hoặc không được thể, alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể hoặc gốc aryloxycarbonyl được thể hoặc không được thể.

7. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 5, trong đó ít nhất một trong số X và Y một cách độc lập thể hiện alkylaminocarbonyl được thể hoặc không được thể,

arylaminoacetyl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc arylsulfonyl được thế hoặc không được thế.

8. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 2 hoặc muối được dụng của nó:

trong đó,

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 19;

Hợp chất có Công thức I có ít nhất một phần trùng lặp bổ sung 10 mer cho trình tự tiền mARN 14-mer của $[(5' \rightarrow 3') \text{UGUUUAGGUACACU}]$ bên trong tiền mARN SCN9A ở người;

Hợp chất có Công thức I bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n là gốc hydrido;

X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc arylsulfonyl được thế hoặc không được thế;

Z thể hiện gốc aminoo được thế hoặc không được thế;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ tự nhiên bao gồm adenin, thymine, guanin, xytosin và uraxin và các nucleobazơ không tự nhiên;

ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được thể hiện bằng Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 và R_6 được chọn một cách độc lập từ hydrido, và gốc alkyl được thế hoặc không được thế;

Q_1 và Q_m là gốc metylen, và Q_m được liên kết trực tiếp với nhóm aminobazơ;

$Q_2, Q_3, \dots$ và Q_{m-1} được chọn một cách độc lập từ metylen, oxy và gốc amino; và

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 9.

9. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 8, trong đó X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc alkyloxycacbonyl được thể hoặc không được thể.

10. Dẫn xuất axit nucleic peptit của điểm 8, trong đó ít nhất một trong số X và Y độc lập thể hiện alkyl được thể hoặc không được thể, aryl được thể hoặc không được thể, arylaxyl được thể hoặc không được thể, alkylaminocacbonyl được thể hoặc không được thể, alkylsulfonyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc arylsulfonyl được thể hoặc không được thể.

11. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 2 hoặc muối được dụng của nó:

trong đó,

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 19;

Hợp chất có Công thức I có ít nhất một phần trùng lặp bổ sung 10 mer cho trình tự tiền mARN 14-mer của [(5' → 3') UGUUUAGGUACACU] bên trong tiền mARN SCN9A ở người;

Hợp chất có Công thức I bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n là gốc hydrido;

X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkyl được thể hoặc không được thể, aryl được thể hoặc không được thể, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, arylaxyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc alkyloxycacbonyl được thể hoặc không được thể;

Z thể hiện gốc amino được thể hoặc không được thể;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazo tự nhiên bao gồm adenin, thymine, guanin, xytosin và uraxin và các nucleobazo không tự nhiên;

ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazo không tự nhiên được thể hiện bằng Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV;

R_1 , R_3 và R_5 là gốc hydrido và R_2 , R_4 và R_6 một cách độc lập thể hiện hydrido, hoặc gốc alkyl được thể hoặc không được thể;

Q_1 và Q_m là gốc metylen, và Q_m được gắn kết trực tiếp với nhóm amino bazơ;

Q_2 , Q_3 , ..., và Q_{m-1} được chọn một cách độc lập từ metylen, gốc oxy; và, m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8.

12. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 11, trong đó X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể.

13. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 11, trong đó ít nhất một trong số X và Y độc lập thể hiện alkyl được thể hoặc không được thể, aryl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc arylaxyl được thể hoặc không được thể.

14. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 2 hoặc muối được dụng của nó:
trong đó,

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 19;

Hợp chất có Công thức I có ít nhất một phần trùng lặp bổ sung 10 mer cho trình tự tiền mARN 14-mer của [(5' → 3') UGUUUAGGUACACU] bên trong tiền mARN SCN9A ở người;

Hợp chất có Công thức I bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người;

S_1 , S_2 , ..., S_{n-1} , S_n , T_1 , T_2 , ..., T_{n-1} và T_n là gốc hydrido;

X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, arylaxyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể;

Z thể hiện gốc aminoo được thể hoặc không được thể;

B_1 , B_2 , ..., B_{n-1} , và B_n được chọn một cách độc lập từ adenin, thymin, guanin, xytosin, và các nucleobazơ không tự nhiên;

ít nhất năm trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được thể hiện bằng Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 và R_6 là gốc hydrido;

Q_1 và Q_m là gốc metylen, và Q_m được liên kết trực tiếp với nhóm aminobazơ;

$Q_2, Q_3, \dots$, và Q_{m-1} được chọn một cách độc lập từ metylen và gốc oxy; và, m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8.

15. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 14, trong đó X và Y một cách độc lập thể hiện hydrido, alkylaxyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể.

16. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 14, trong đó ít nhất một trong số X và Y một cách độc lập thể hiện arylaxyl được thể hoặc không được thể.

17. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 2, hoặc muối được dụng của nó:

trong đó,

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 19;

Hợp chất có Công thức I có ít nhất một phần trùng lặp bổ sung 10 mer cho trình tự tiền mARN 14-mer của $[(5' \rightarrow 3') \text{UGUUUAGGUACACU}]$ bên trong tiền mARN SCN9A ở người;

Hợp chất có Công thức I bổ sung đầy đủ cho tiền mARN SCN9A ở người;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n là gốc hydrido;

X là gốc hydrido;

Y thể hiện alkylaxyl được thể hoặc không được thể, arylaxyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể;

Z thể hiện gốc aminoo được thể hoặc không được thể;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn một cách độc lập từ adenin, thymine, guanin, xytosin, và các nucleobazơ không tự nhiên;

ít nhất năm trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn một cách độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được thể hiện bằng Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 và R_6 là gốc hydrido;

L1 thể hiện $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$, $-CH_2-O-(CH_2)_2-$, $-CH_2-O-(CH_2)_3-$, $-CH_2-O-(CH_2)_4-$, hoặc $-CH_2-O-(CH_2)_5-$ với đầu bên phải được liên kết trực tiếp với nhóm amino bazơ; và,

L2 và L3 được chọn một cách độc lập từ $-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_6-$, $-(CH_2)_7-$, $-(CH_2)_8-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_2-$, và $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ với đầu bên phải được liên kết trực tiếp với nhóm amino bazơ.

18. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 17, trong đó Y thể hiện gốc alkylaxyl được thể hoặc không được thể hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể.

19. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 17, trong đó Y thể hiện arylaxyl được thể hoặc không được thể.

20. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 1, được chọn từ nhóm các dẫn xuất axit nucleic peptit được đưa ra dưới đây, hoặc muối được dụng của nó:

$(N \rightarrow C)$ Fethoc-TA(5)A-A(5)AG(6)-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)-NH₂;

$(N \rightarrow C)$ Fethoc-TA(5)A-A(4)AG(6)-TG(6)T-A(5)CC(1O3)-TA(5)A-A-NH₂;

$(N \rightarrow C)$ Fmoc-TA(5)A-A(4)AG(6)-TG(6)T-A(5)CC(1O3)-TA(5)A-A-NH₂;

$(N \rightarrow C)$ Piv-Leu-TA(5)A-A(5)AG(3O2)-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)-NH₂;

$(N \rightarrow C)$ Fethoc-TA(5)T-A(5)AG(6)-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)-NH₂;

(N → C) Benzoyl-Gly-TA(2O2)A-A(5)AG(6)-TG(6)T-A(5)CT-TA(5)A-Lys-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA(5)-A-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-CG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA(5)-A-NH₂;

(N → C) Fmoc-AA(5)G-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA(5)-A-NH₂;

(N → C) Benzensulfonyl-AA(5)G-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA(5)-A-NH₂;

(N → C) Ac-AA(5)G-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA(5)-A-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(3)A-A(5)-NH₂;

(N → C) Fmoc-AA(5)G-TG(6)T-AC(1O2)C-TAA(5)-A-NH₂;

(N → C) Metyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(3)A-A(5)-Gly-Arg-NH₂;

(N → C) Fethoc-A(5)AG-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA-A(5)-NH₂;

(N → C) Ac-Val-A(5)AG-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA-A(5)-NH₂;

(N → C) Fethoc-AAG(6)-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)AC(1O2)-TA(5)T-A(5)C-NH₂;

(N → C) H-AA(5)G-TG(2O2)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) Fethoc-Lys-Leu-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(2O2)A-A(5)C-Lys-NH₂;

(N → C) [N-(2-Phenyletyl)amin]cacbonyl-AA(3)G-TG(5)T-A(5)CC(1O5)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) N,N-Phenyl-Me-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(4)C-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TA(5)T-A(5)CC(1O2)-TG(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) p-Toluenesulfonyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;

(N → C) p-Toluenesulfonyl-AA(5)G-TG(2O3)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-Lys-NH₂;

(N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(203)T-A(5)CC(103)-TA(7)A-A(5)C-NH₂;
 (N → C) n-Propyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(103)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;
 (N → C) Benzoyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(102)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;
 (N → C) Benzyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(103)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;
 (N → C) Benzoyl-AA(5)G-TG(3)T-A(5)CC(202)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;
 (N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(102)-TA(5)A-A(5)C-Leu-
 Lys-NH₂;
 (N → C) Piv-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(102)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;
 (N → C) Fethoc-TA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(102)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;
 (N → C) Fethoc-AA(5)C-TG(5)T-A(5)CC(102)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;
 (N → C) Metylsulfonyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(102)-TA(5)A-A(5)C-
 NH₂;
 (N → C) n-Hexyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(102)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;
 (N → C) n-Hexanoyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(102)-TA(5)A-A(5)C-
 NH₂;
 (N → C) n-Hexanoyl-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(102)-TA(8)A-A(5)C-
 NH₂;
 (N → C) Fethoc-AA(3)G-TG(202)T-A(5)CC(102)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;
 (N → C) Fethoc-AA(3)G-TG(202)T-A(5)CC(103)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;
 (N → C) Fethoc-AA(3)G-TG(202)T-A(5)CC(202)-TA(5)A-A(5)C-NH₂;
 (N → C) FAM-HEX-HEX-AA(3)G-TG(202)T-A(5)CC(202)-TA(5)A-
 A(5)C-NH₂;
 (N → C) Fethoc-A(5)GT-G(5)TA(5)-CC(102)T-A(5)AA(5)-C-NH₂;
 (N → C) Fethoc-AG(5)T-G(7)TA-CC(102)T-AA(6)A-C-NH₂;
 (N → C) Fethoc-AA(6)G-TG(5)T-A(6)CC(102)-TA(6)A-A(6)C-NH₂;
 (N → C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(102)-TA(5)A-A(3)CA-
 C(105)AA-NH₂;
 (N → C) Fethoc-AA(5)G-TCT-A(5)CC(102)-TA(5)A-A(3)CA-
 C(105)AA-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-AA(5)G-TCT-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(3)CA(3)-CTA-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(3)CA-CA(7)A-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(3)CA(5)-C-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(3)CA(5)-C-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) p-Toluenesulfonyl-TG(2O3)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(3)CA-C-Lys-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-TG(5)T-A(5)CC(2O2)-TA(5)A-A(3)CA-CA(5)A-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Piv-TG(5)T-A(5)CC(2O2)-TA(5)A-A(3)CA-CA(5)A-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Benzoyl-TG(5)T-A(5)CC(2O2)-TA(5)A-A(3)CA-CA(5)A-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Propionyl-TG(5)T-A(5)CC(2O2)-TA(5)A-A(3)CA-CA(5)A-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-TG(5)T-A(5)CC(2O2)-TA(5)A-A(3)CA-CA(5)A-Arg-Val-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)G-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-AG(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)G-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)CA-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)GG-NH₂;

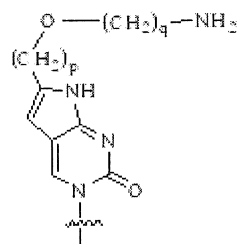
and,

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-ACC(1O2)-TA(5)A-A(5)CA(5)-C-NH₂;

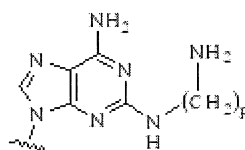
trong đó,

A, G, T và C là các monome PNA với một nucleobazơ tự nhiên là adenin, guanin, thymin và xytosin tương ứng;

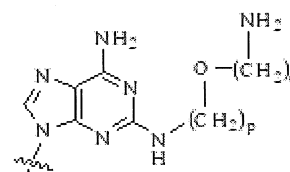
C (pOq), A (p), A (pOq), G (p) và G (pOq) là các monome PNA với một nucleobazơ không tự nhiên được thể hiện bằng công thức VI, Công thức VII, Công thức VIII, Công thức IX và Công thức X, tương ứng;



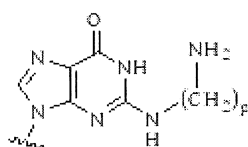
Công thức VI



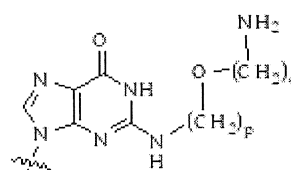
Công thức VII



Công thức VIII



Công thức IX

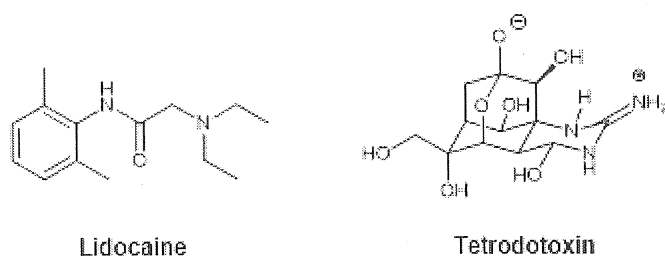
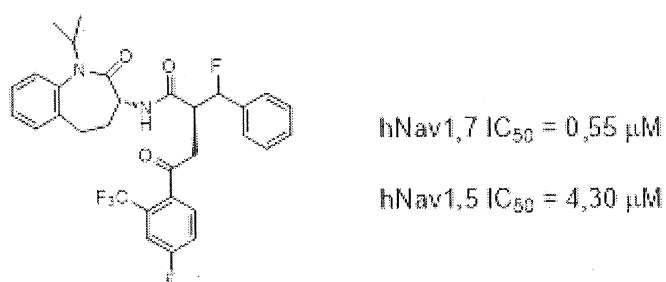
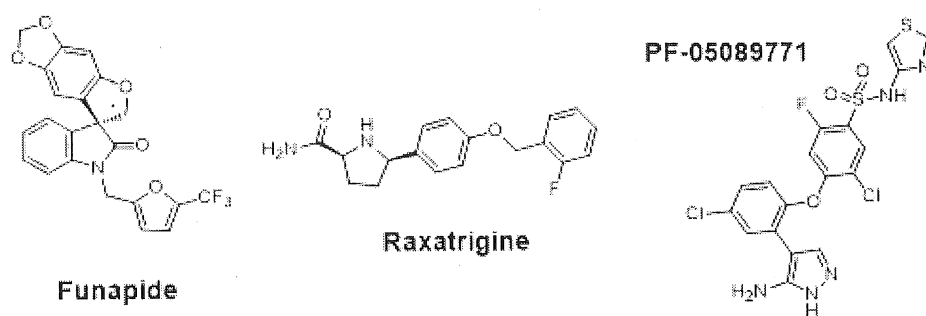


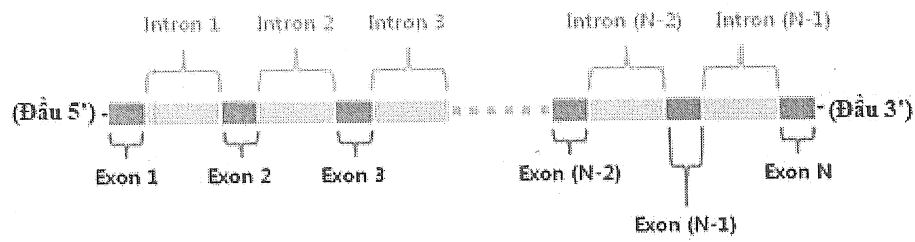
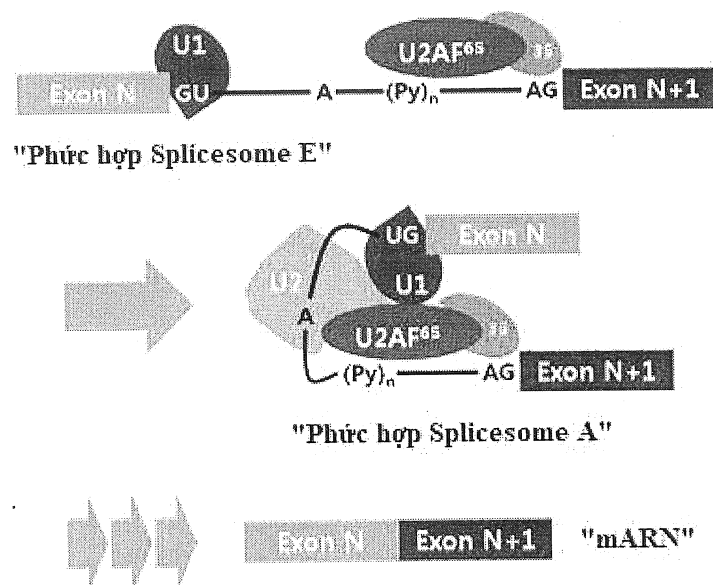
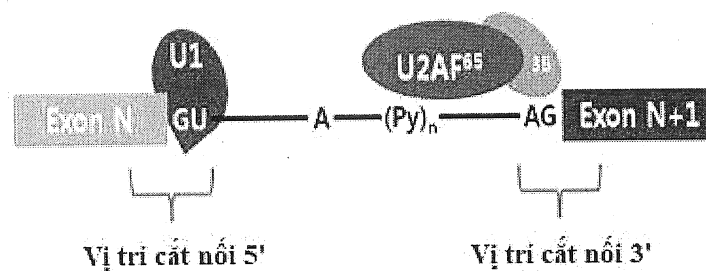
Công thức X

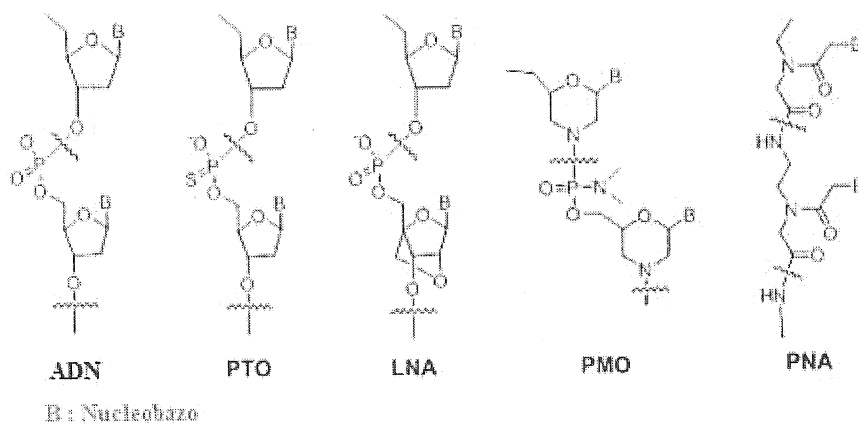
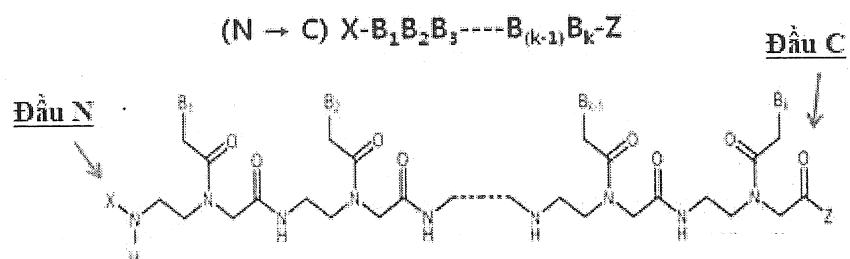
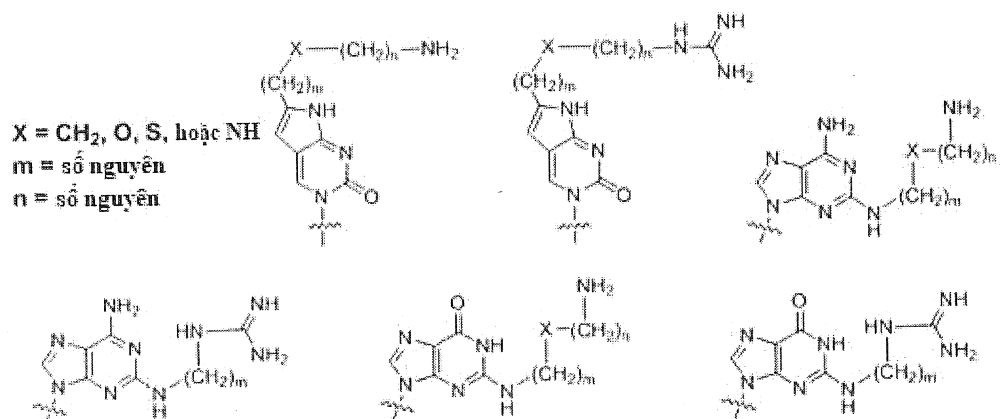
trong đó,

p và q là các số nguyên; và,

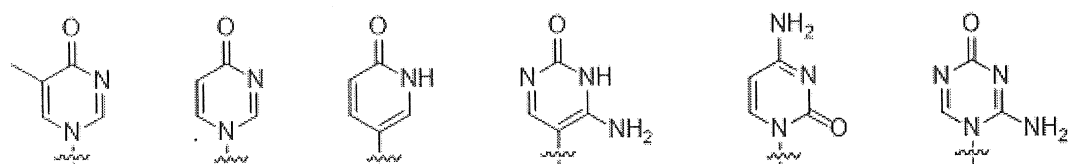
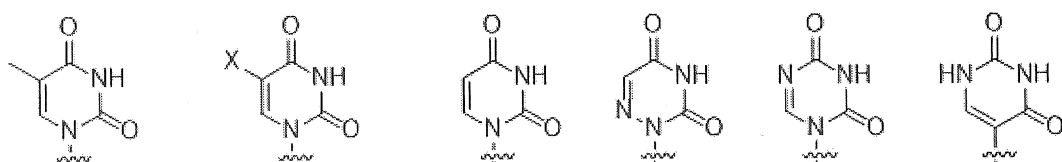
các chữ viết tắt cho các nhóm thế đầu N- và C- được định nghĩa cụ thể như sau: "Fmoc-" là tên viết tắt của "[(9-fluorenyl) metyloxy] cacbonyl-"; "Fethoc-" cho "[2- (9-fluorenyl) etyl-1-oxy] cacbonyl-"; "Ac-" cho "axetyl-"; "n-Hexanoyl-" cho "1- (n-hexanoyl) -"; "Benzoyl-" cho "benzencabonyl-"; "Piv-" cho "pivalyl-"; "n-Propyl-" cho "1- (n-propyl) -"; "n-Hexyl-" cho "1- (n-hexyl) "; "H-" cho "hydrido-"; "p-Toluenesulfonyl" cho "(4-metylbenzen) -1-sulfonyl-"; "Benzensulfonyl" cho "benzen-1-sulfonyl-"; "Metylsulfonyl" cho "metyl-1-sulfonyl-"; "-Lys-" cho gốc axit amin "lysin"; "-Val-" cho gốc axit amin "valin"; "-Leu-" cho gốc axit amin "leuxin"; "-Arg-" cho gốc axit amin "arginin"; "-Gly-" cho gốc axit amin "glyxin"; "[N- (2-Phenyletyl) amin] cacbonyl-" cho "[N-1- (2-phenyletyl) -amin] cacbonyl-"; "Benzyl-" cho "1- (phenyl) metyl-"; "Phenyl-" cho "phenyl-"; "Me-" cho "metyl-"; "-HEX-" cho "6-amin-1-hexanoyl-", "FAM-" cho "5, hoặc 6-fluorescein-cacbonyl-" (hỗn hợp đồng phân) và "-NH₂" cho nhóm amino không được thế".

Hình 1A**Hình 1B****Hình 1C**

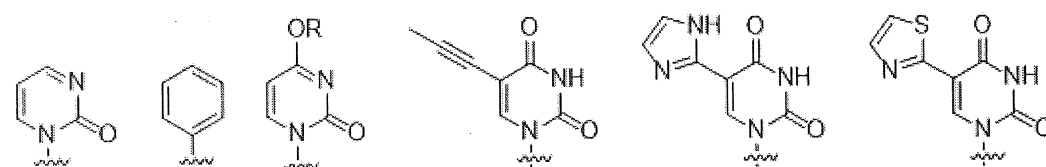
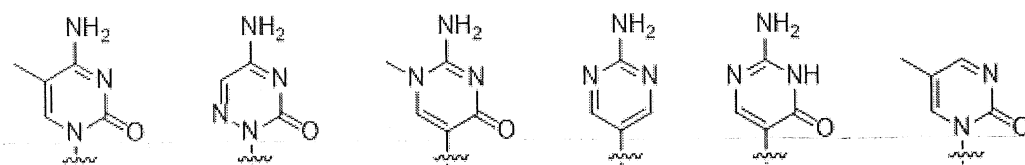
Hình 2A**Hình 2B****Hình 2C****"Phức hợp Spliceosome E"**

Hình 3A**Hình 3B****Hình 3C**

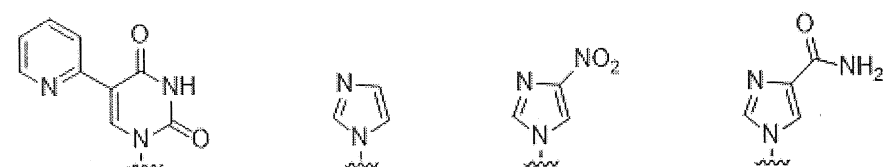
Hình 4



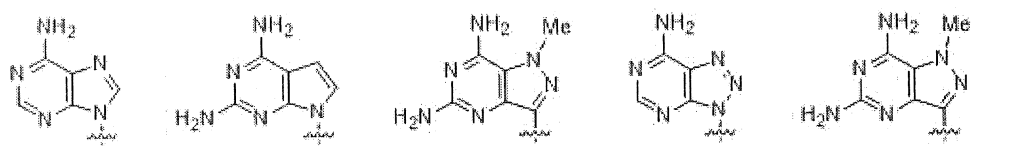
Xytosine



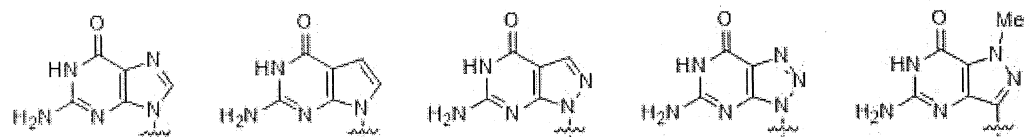
R = alkyl



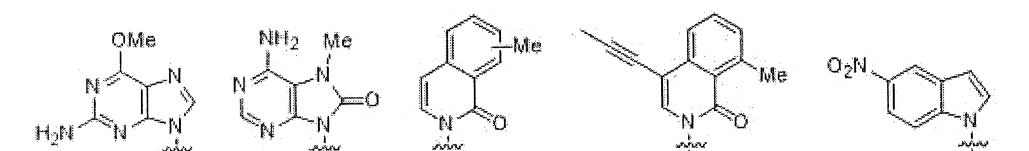
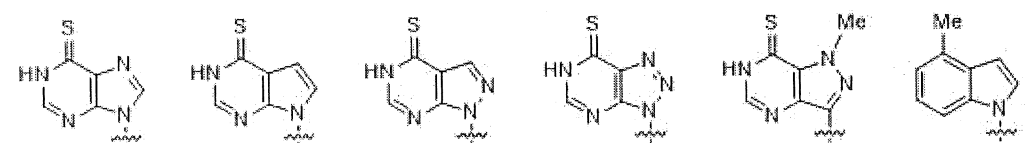
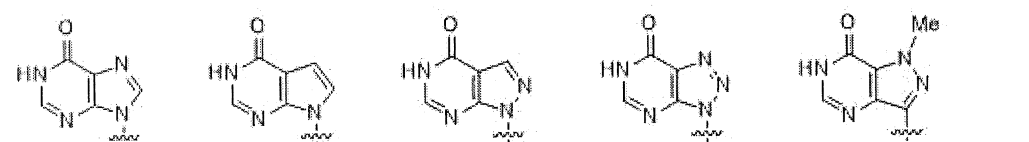
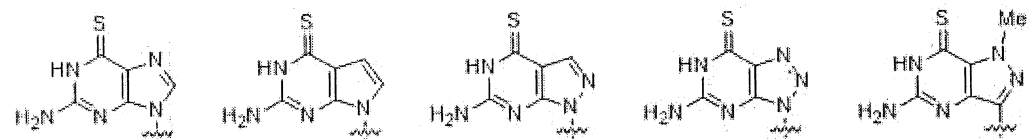
Hình 4 (Tiếp theo trang trước)



Adenin

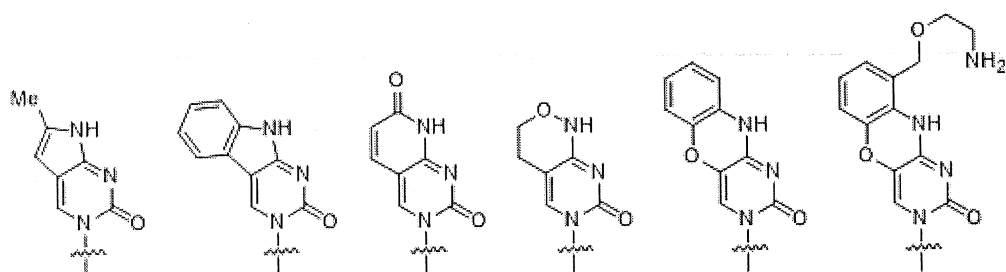
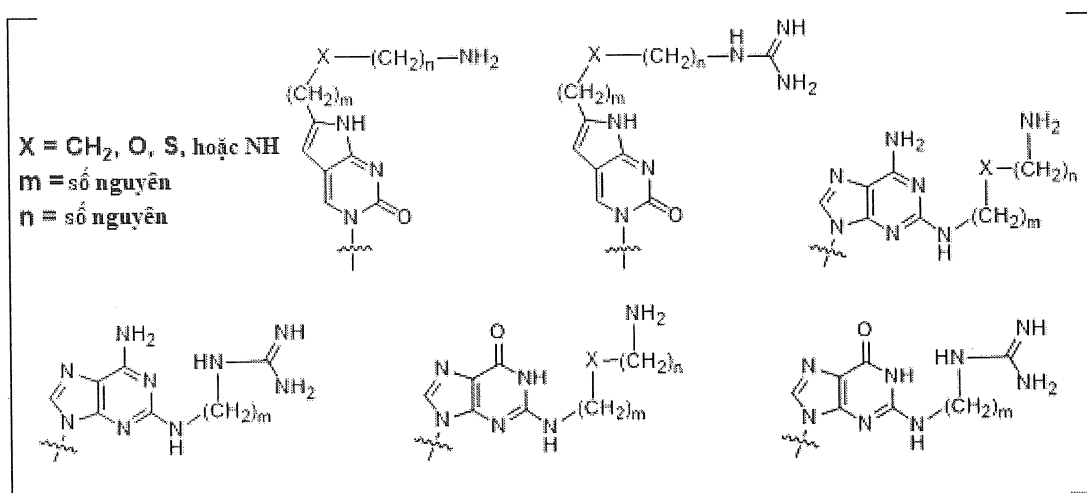


Guanin



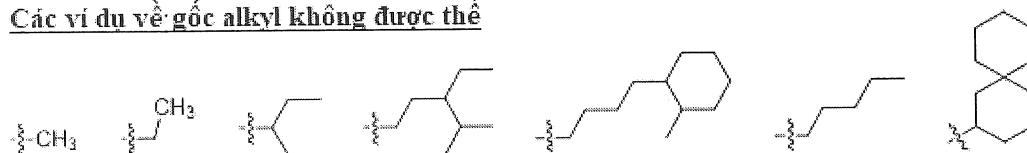
6-O-metylguanin

Hình 4 (Tiếp theo trang trước)

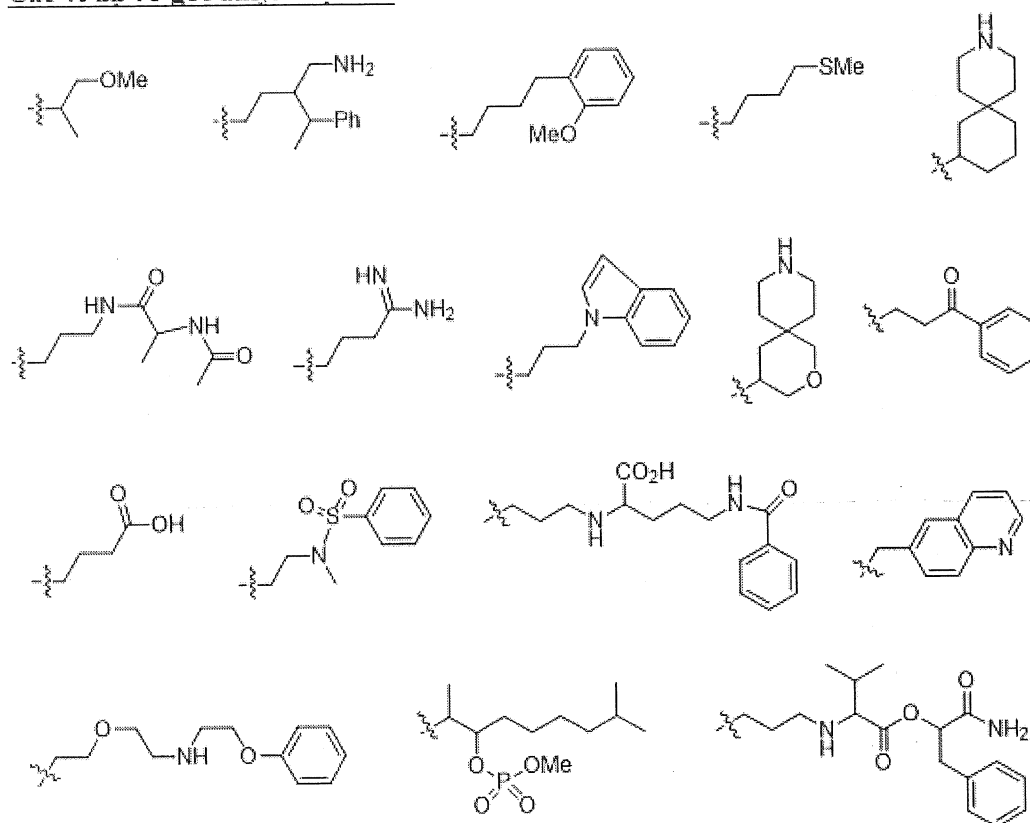


Hình 5A

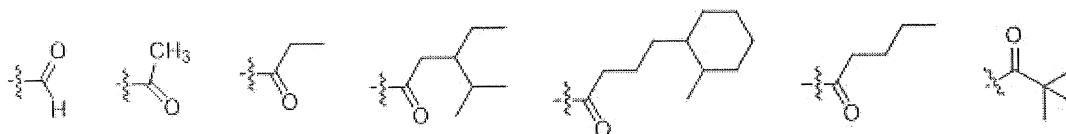
Các ví dụ về gốc alkyl không được thể



Các ví dụ về gốc alkyl được thể



Các ví dụ về gốc alkylacyl không được thể



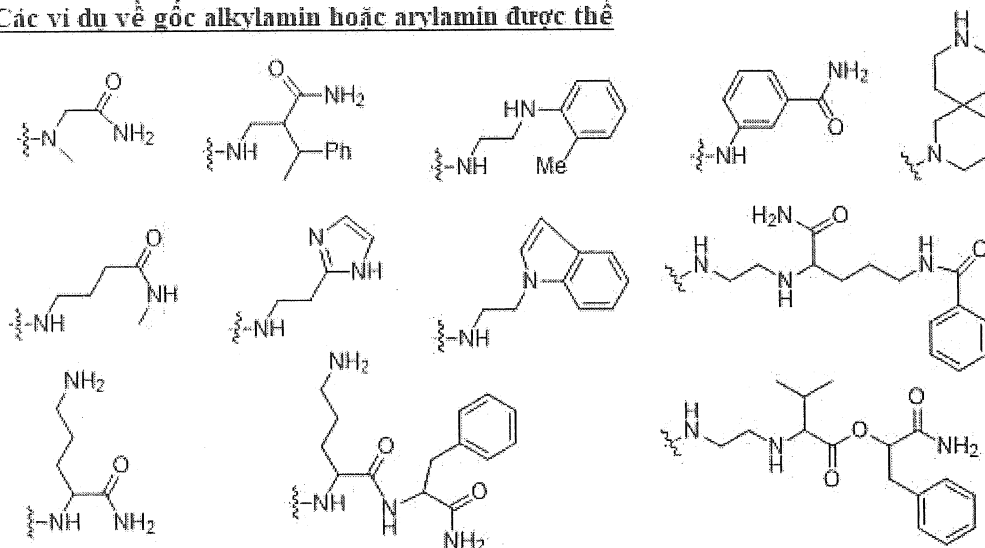
Chemical structures of 15 monomers for polymer synthesis:

- 4-methoxybutyric acid derivative
- 2-amino-3-phenylpropanamide derivative
- 2-methoxy-1-phenylethylamine derivative
- 2-(2-methoxyethyl)tetrahydro-2H-pyran derivative
- 2-phenylacetamide derivative
- 2-((2S,3S)-2-methyl-3-oxobutylamino)propanamide derivative
- 2-amino-3-oxopropanamide derivative
- 2-(1H-indol-3-yl)ethanamide derivative
- 2-((2S,3S)-2-methyl-3-oxobutylamino)-N-phenylacetamide derivative
- 2-acetamidopropanamide derivative
- 2-((dimethylamino)sulfonyl)propanamide derivative
- 2-((2S,3S)-2-amino-3-methylbutylamino)propanamide derivative
- 2-((2S,3S)-2-methyl-3-oxobutylamino)-N-methylacetamide derivative
- 2-((2S,3S)-2-methyl-3-oxobutylamino)-N-methylacetamide derivative
- 2-((2S,3S)-2-methyl-3-oxobutylamino)-N-methylacetamide derivative

Chemical structures of various aromatic ketones used in the synthesis of 1,2,3,4-tetrahydronaphthalene derivatives:

- 1-quinolinecarboxaldehyde
- 4-(dimethylamino)benzaldehyde
- benzaldehyde
- 2-furaldehyde
- 3-methoxybenzaldehyde
- 6-methoxy-1-quinolinecarboxaldehyde
- 2-isopropyl-5-furaldehyde
- 3-pyridinecarboxaldehyde
- 1-(2-isopropyl-1H-indol-3-yl)ethan-1-one

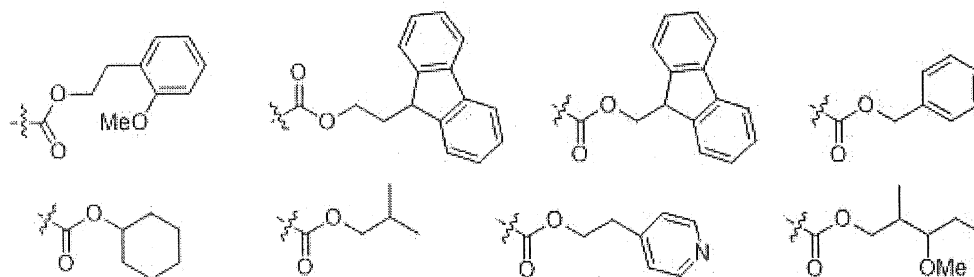
Các ví dụ về gốc alkylamin hoặc arylamin được thể



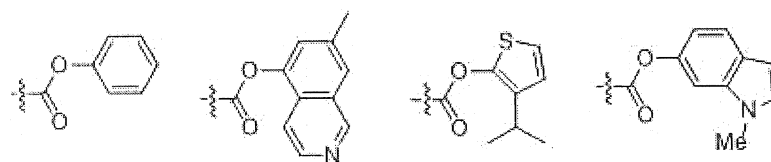
Chemical structures of various heterocyclic compounds, including benzene, pyridine, furan, thiophene, imidazole, quinoline, and substituted derivatives.

Hình 5D

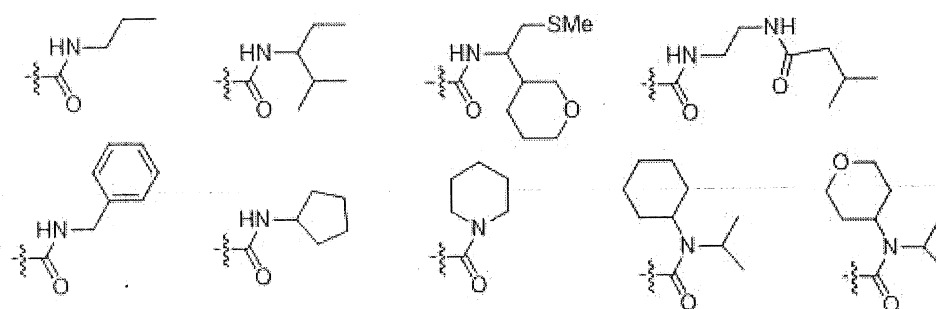
Các ví dụ về gốc alkyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể



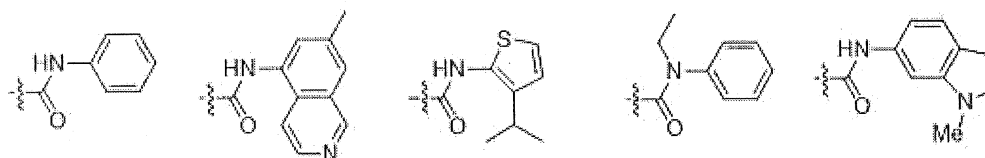
Các ví dụ về gốc aryloxycarbonyl được thể hoặc không được thể



Các ví dụ về gốc alkylaminocarbonyl được thể hoặc không được thể

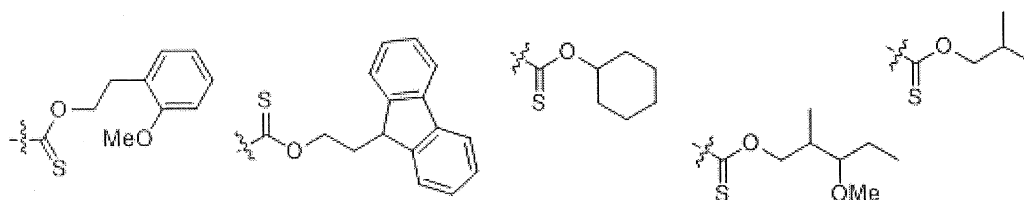


Các ví dụ về gốc arylaminocarbonyl được thể hoặc không được thể

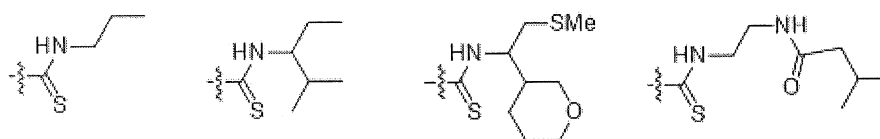


Hình 5E

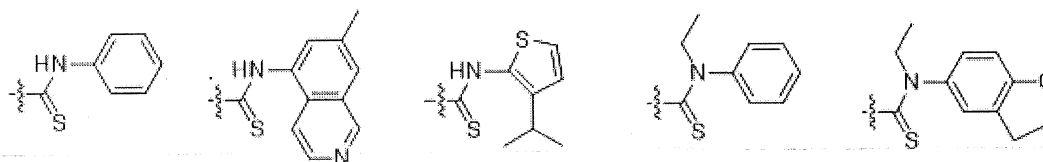
Các ví dụ về gốc alkyloxythiocacbonyl được thể hoặc không được thể



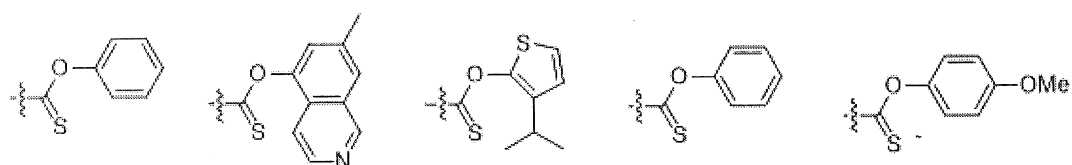
Các ví dụ về gốc alkylaminothiocacbonyl được thể hoặc không được thể



Các ví dụ về gốc arylaminothiocacbonyl được thể hoặc không được thể

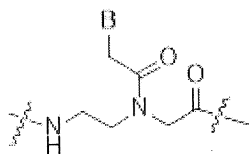


Các ví dụ về gốc aryloxythiocacbonyl được thể hoặc không được thể



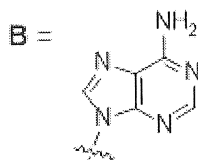
Hình 6

PNA Monomer

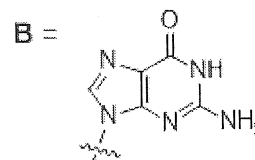


B : Nucleobazo
 X : O (nguyên tử oxy)
 p : Số nguyên
 q : Số nguyên

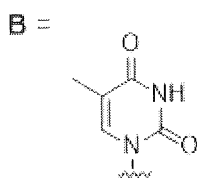
Adenin



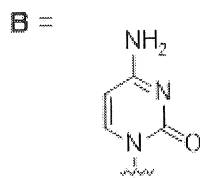
Guanin



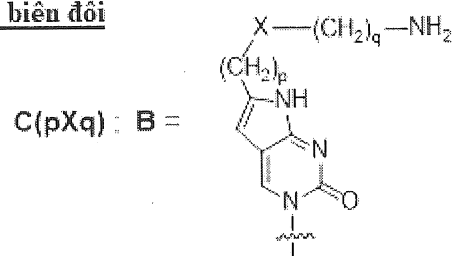
Timin



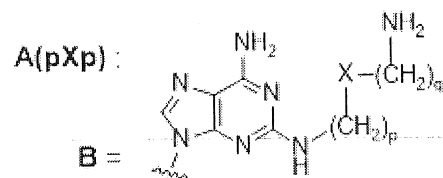
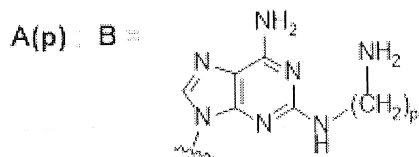
Xytosin



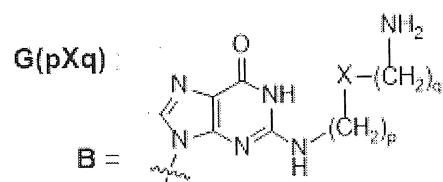
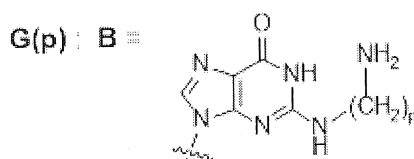
Xytosin biến đổi



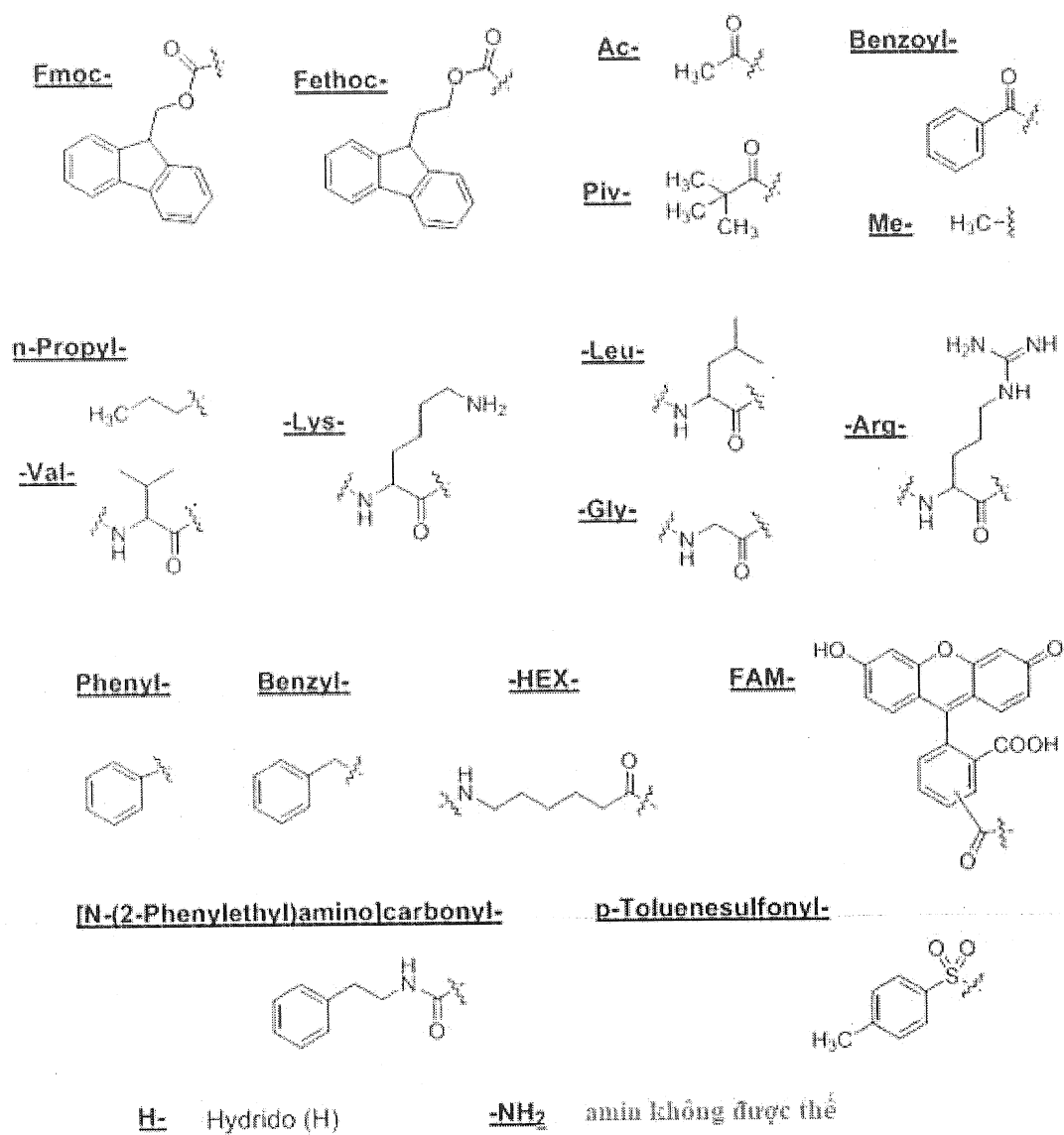
Adenin biến đổi



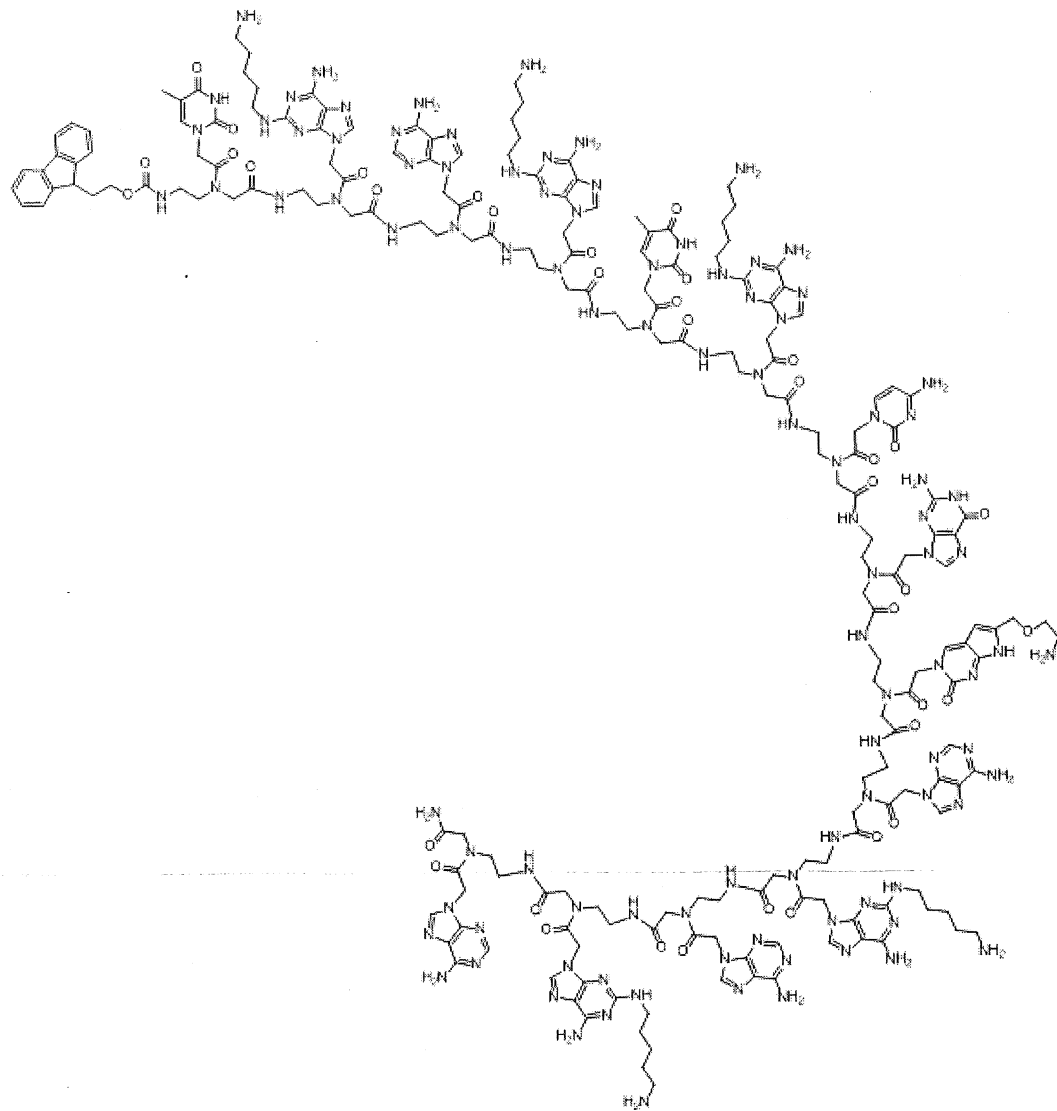
Guanin biến đổi

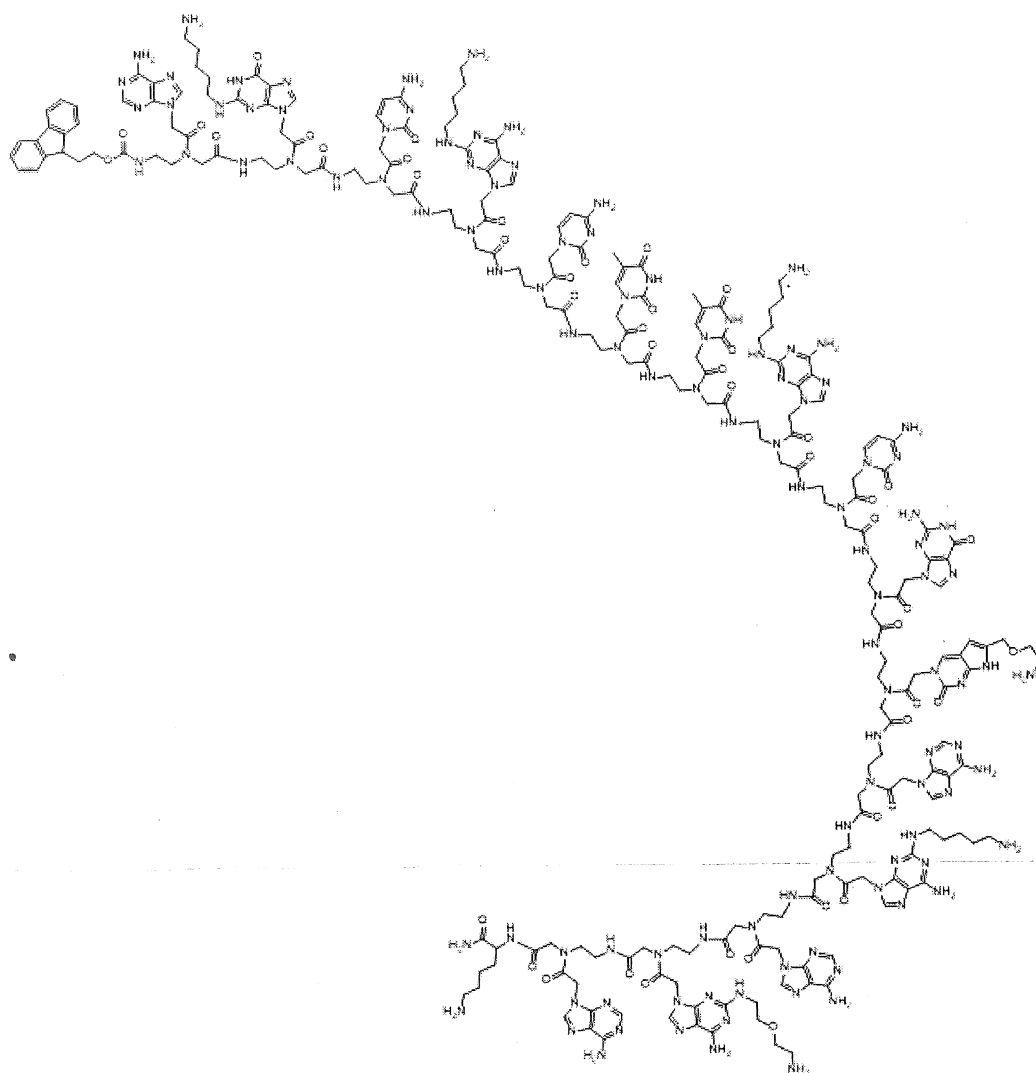


Hình 7



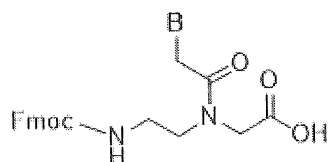
Hình 8



Hình 9

Hình 10

Fmoc-PNA Monomer

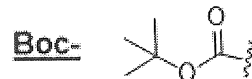


B : Nucleobazo với (các) nhóm bảo vệ

X : metylen, oxy, lưu huỳnh, hoặc Boc- amin được bảo vệ

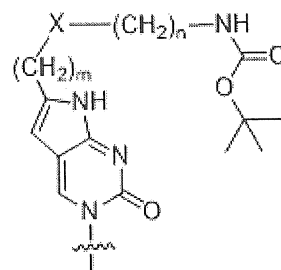
m : Số nguyên

n : Số nguyên



Xytosin biến đổi

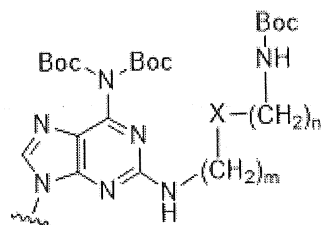
C(mXn) : B =



Adenin biến đổi

A(mXn) :

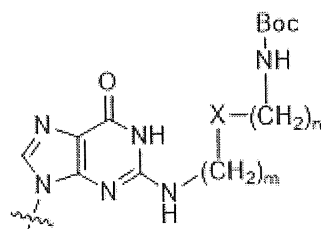
B =



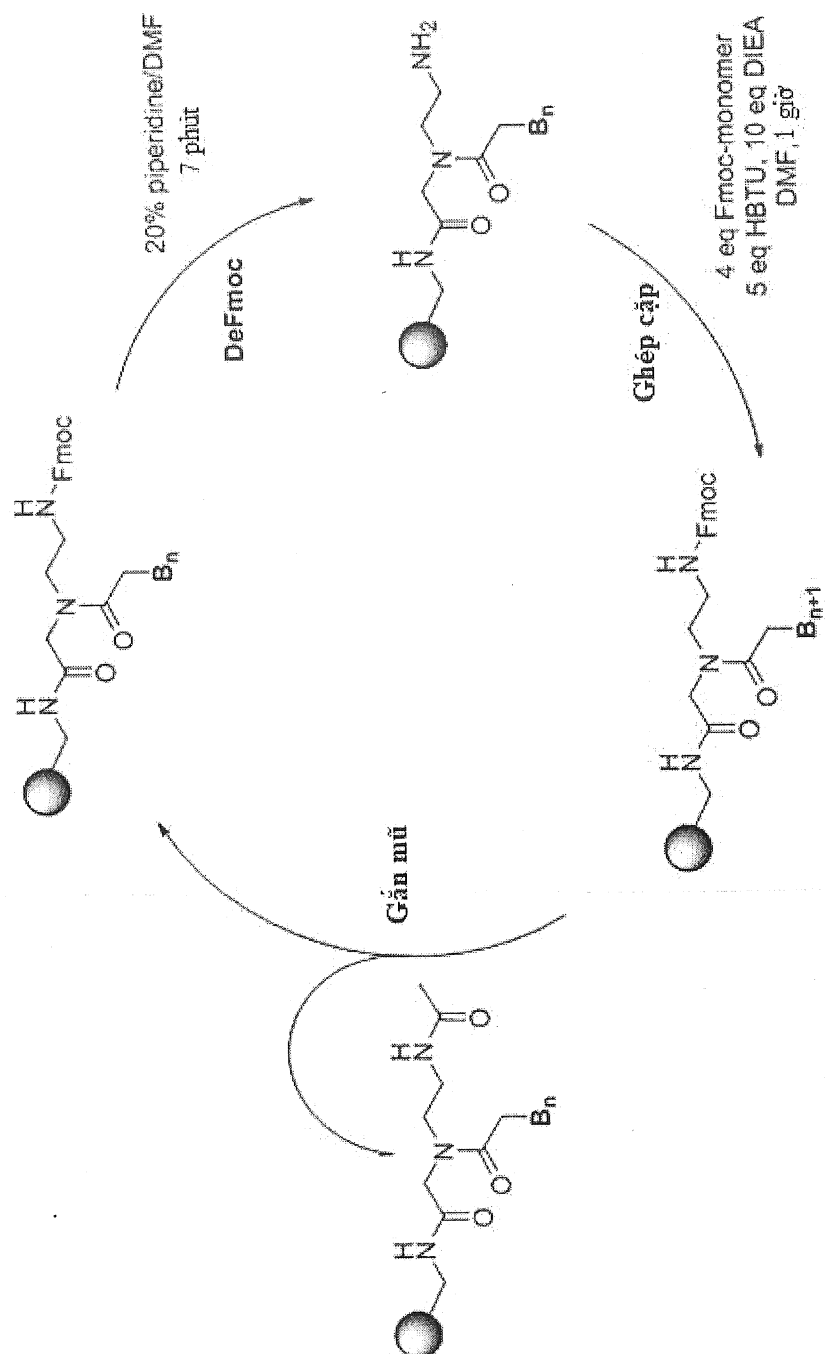
Guanin biến đổi

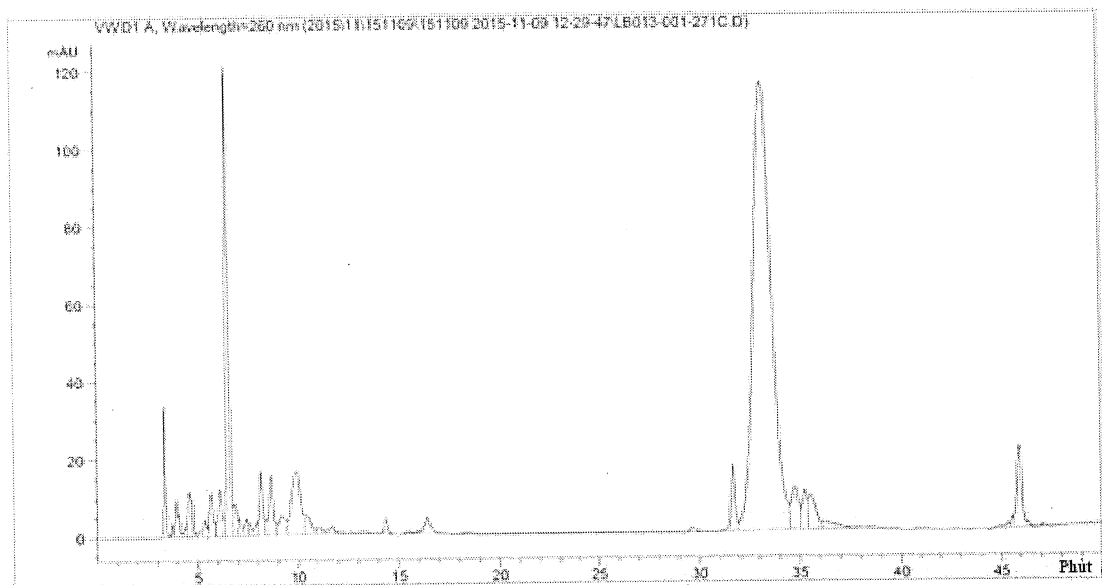
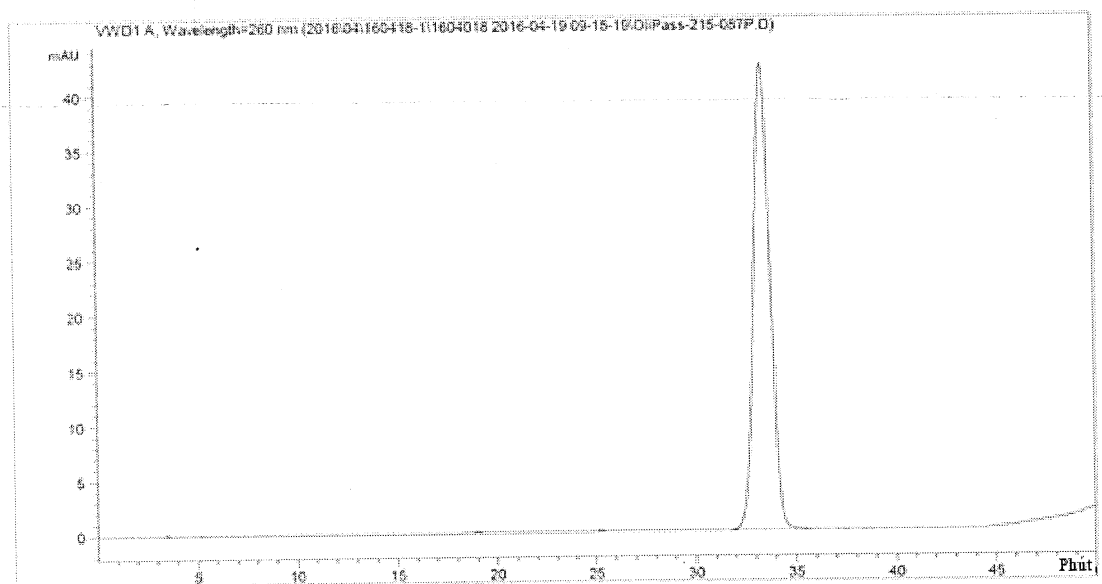
G(mXn) :

B =

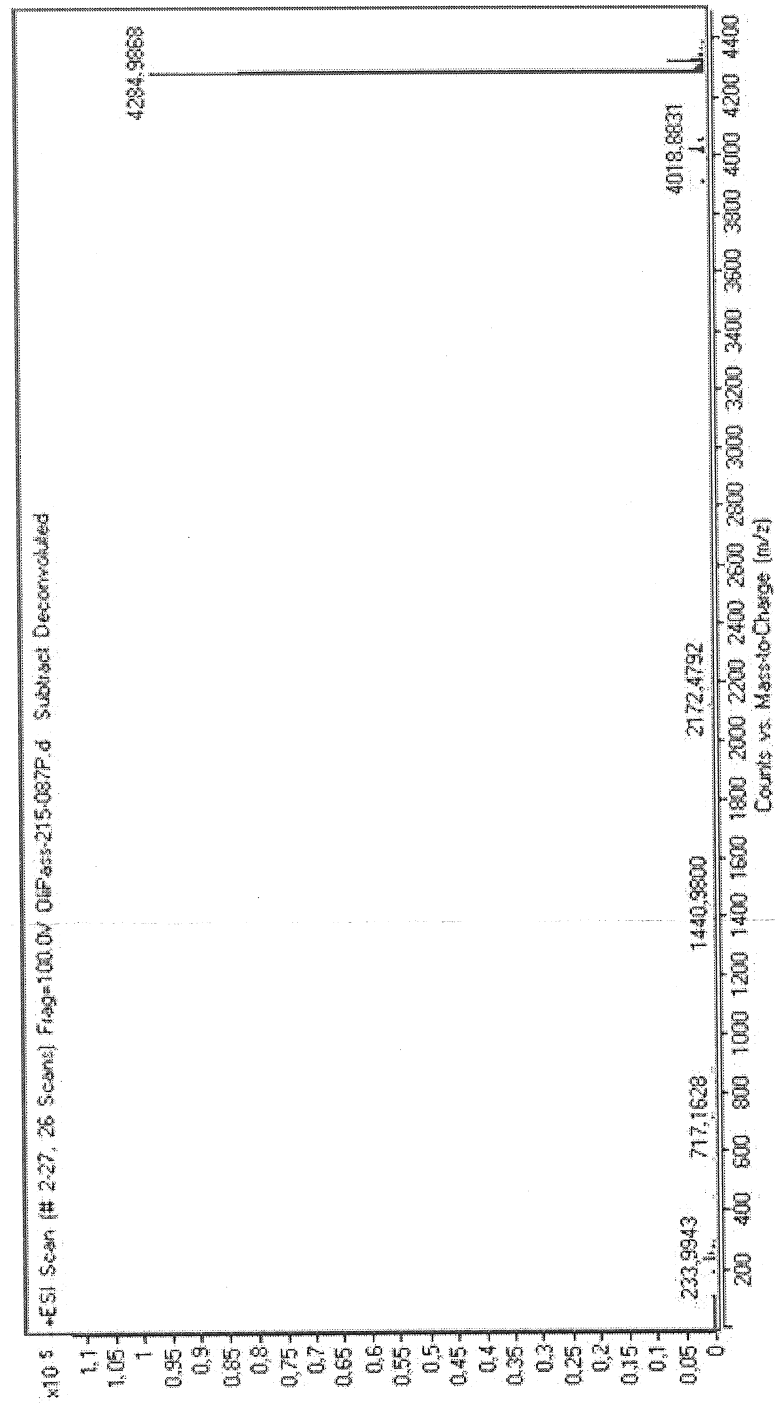


Hình 11

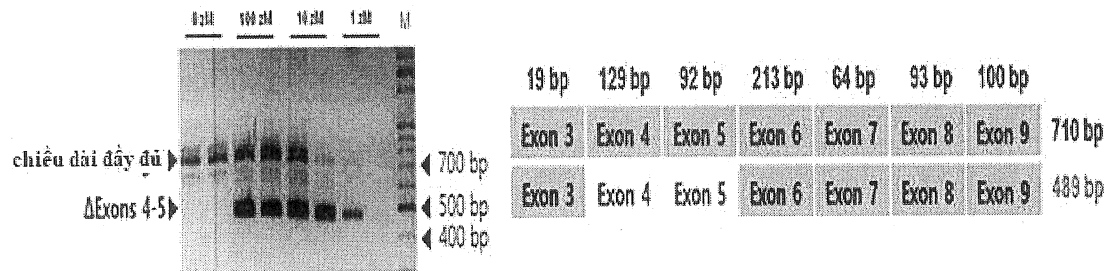


Hình 12A**Hình 12B**

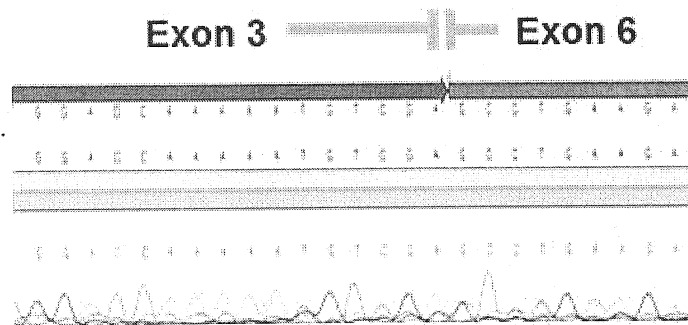
Hình 13



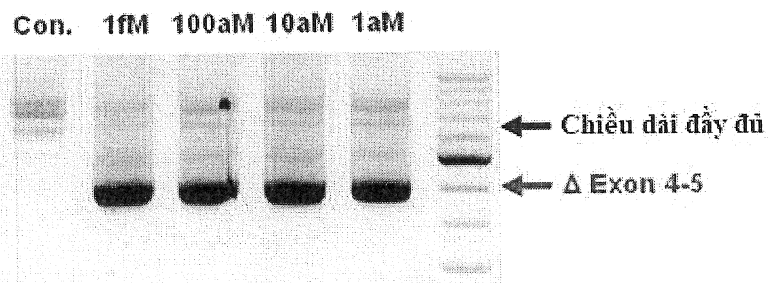
Hình 14A



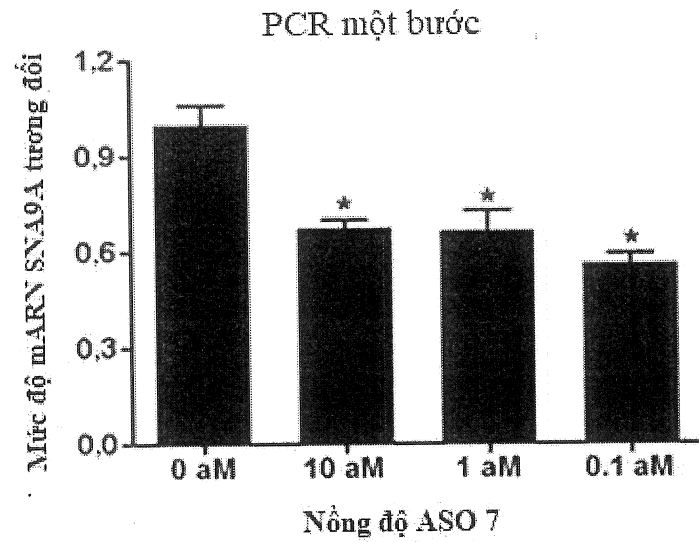
Hình 14B



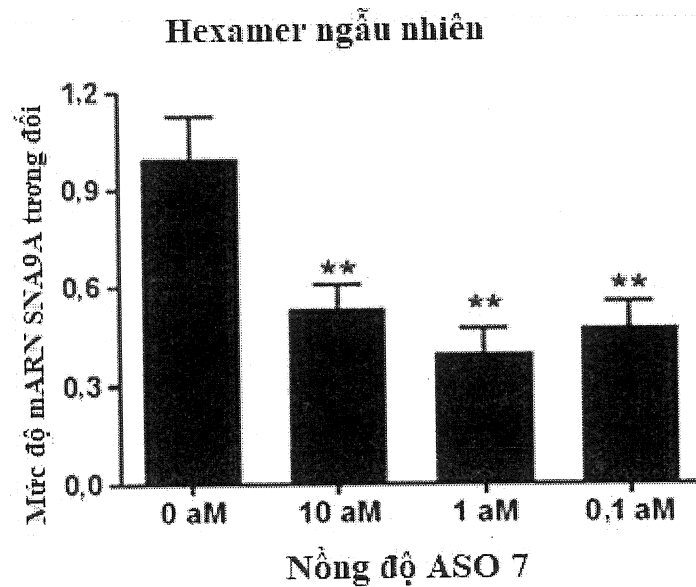
Hình 14C

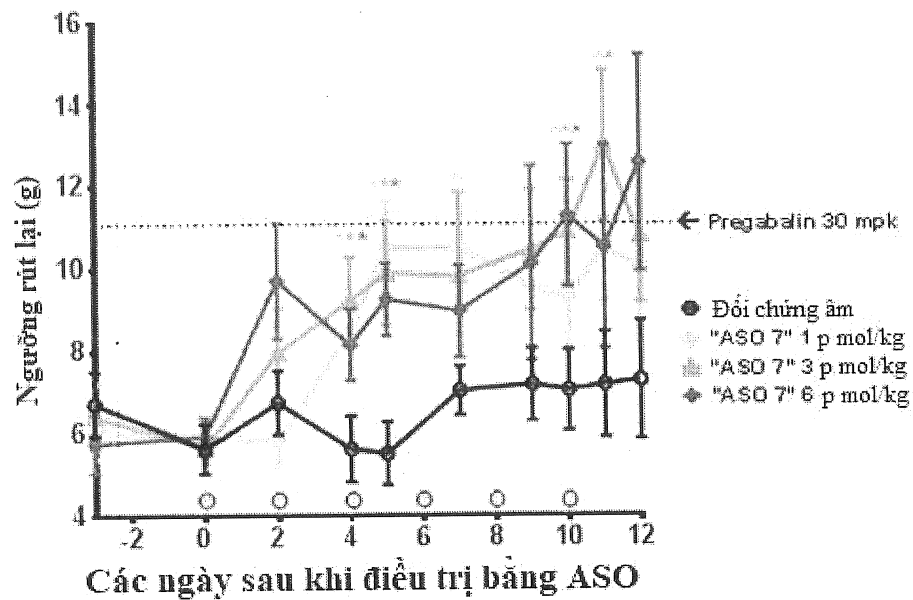
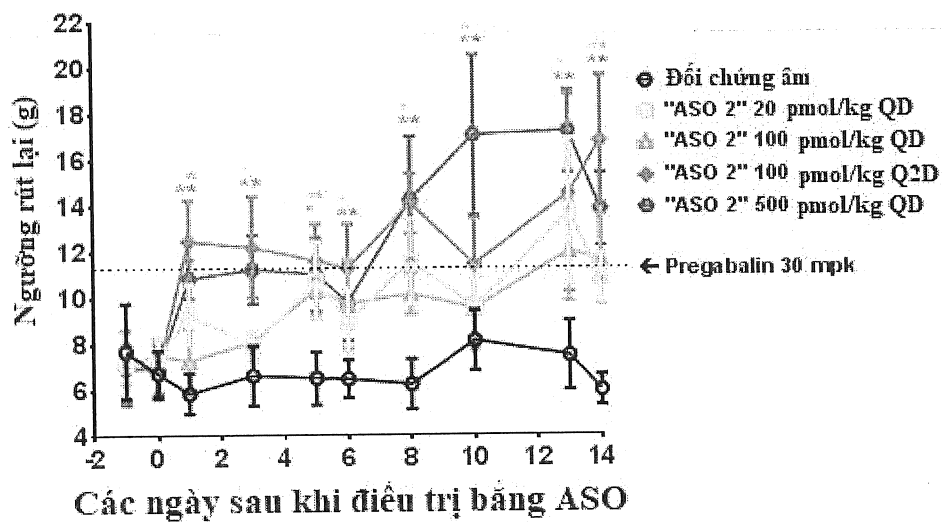


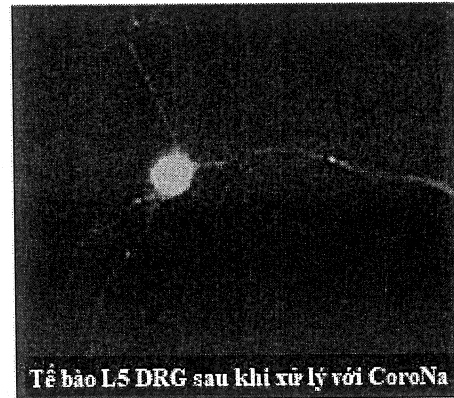
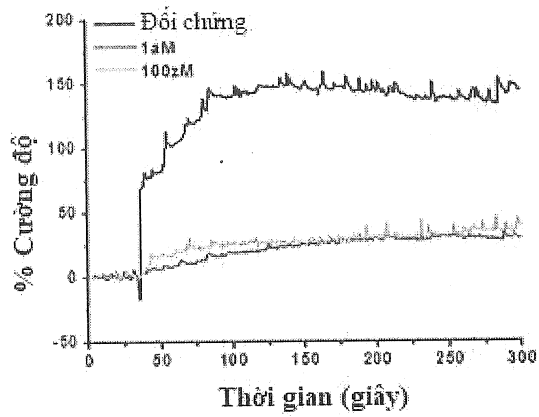
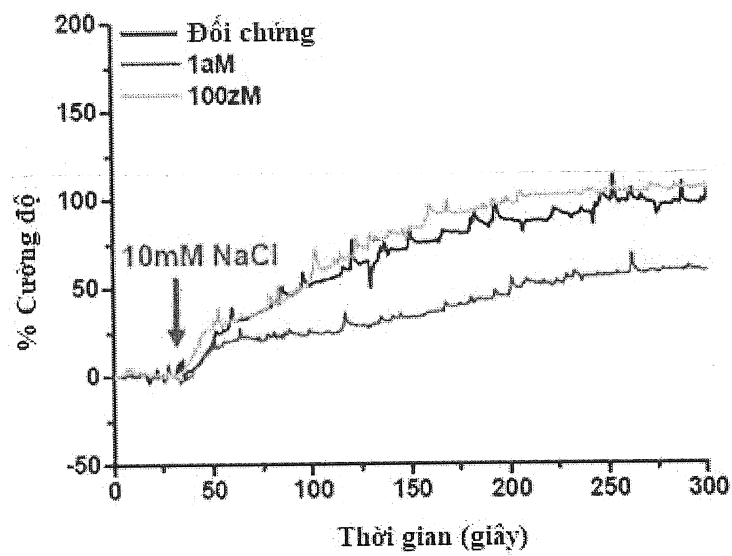
Hình 15A

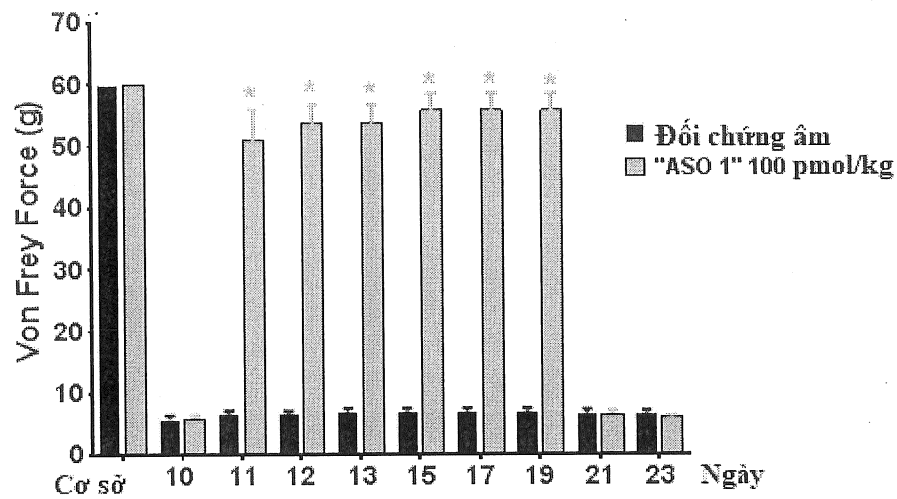
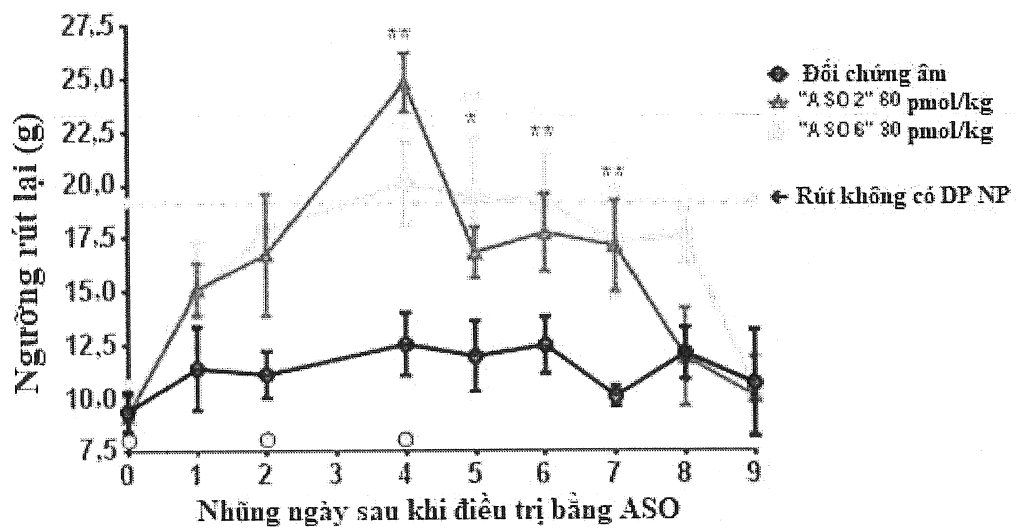


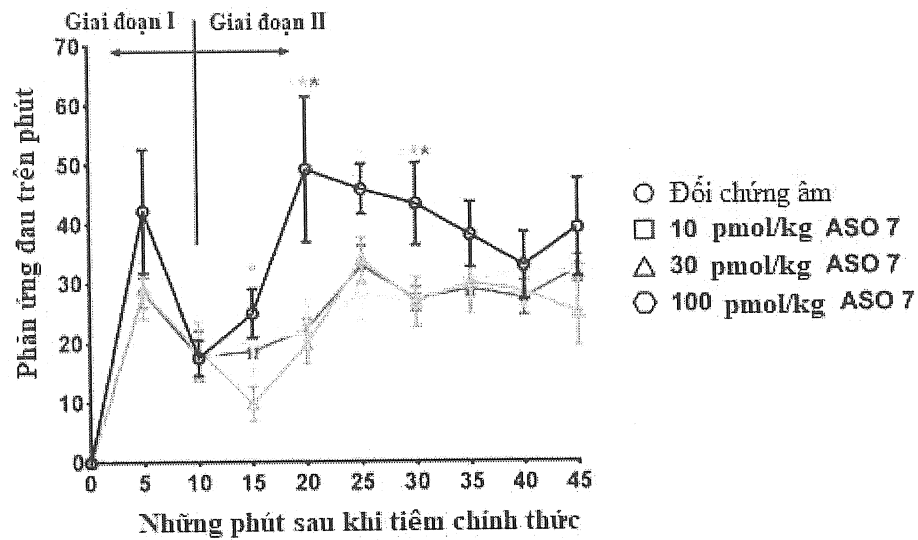
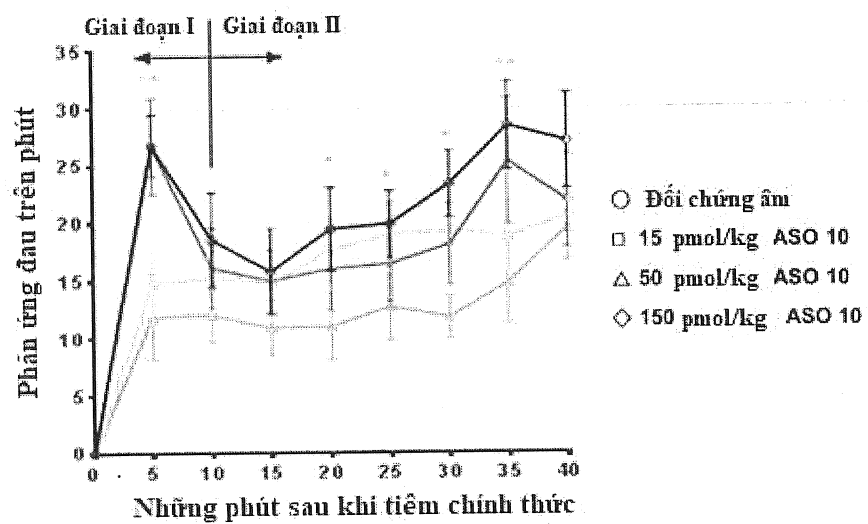
Hình 15B

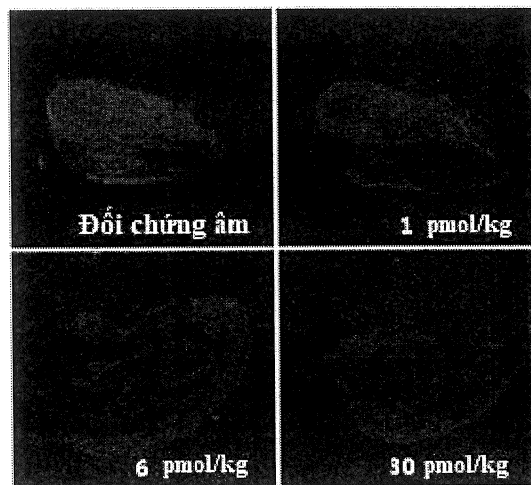
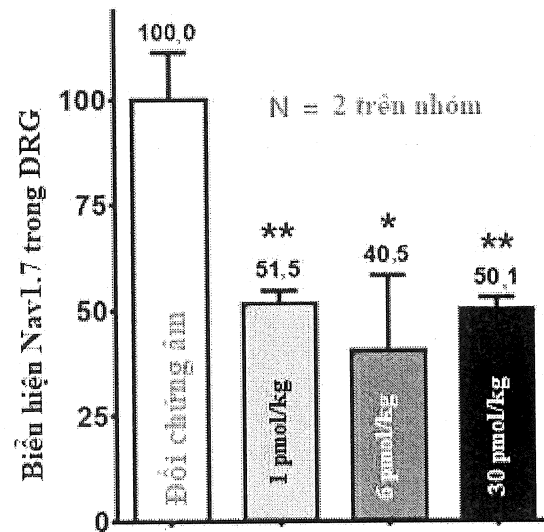


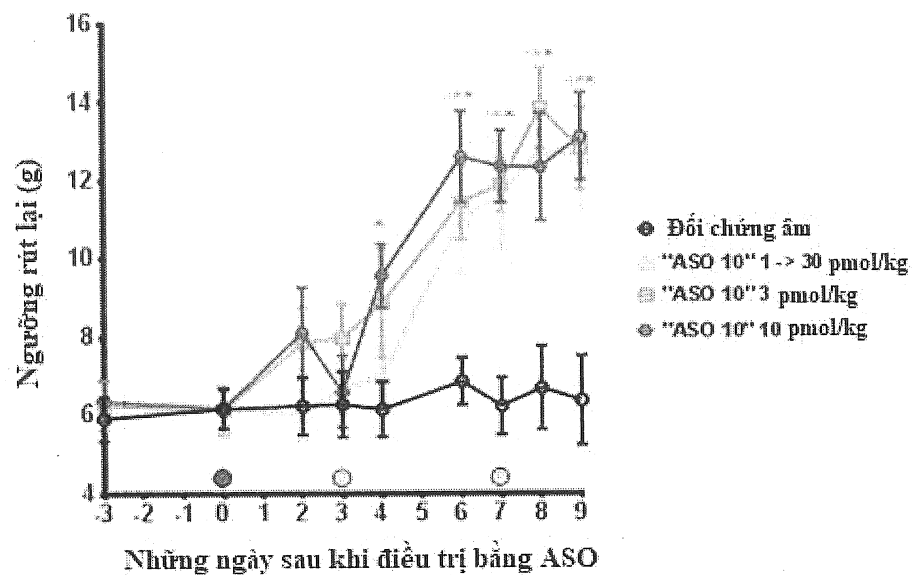
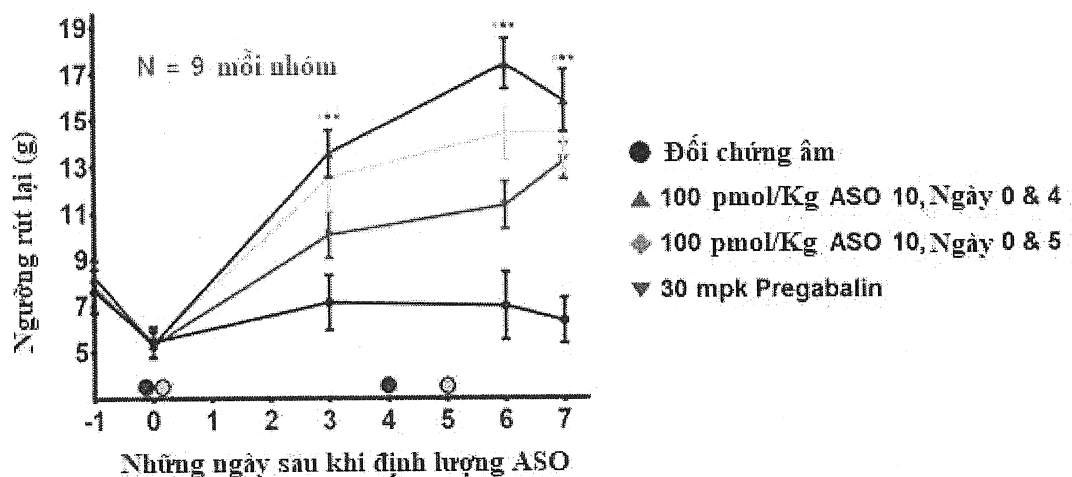
Hình 16A**Hình 16B**

Hình 17A**Hình 17B**

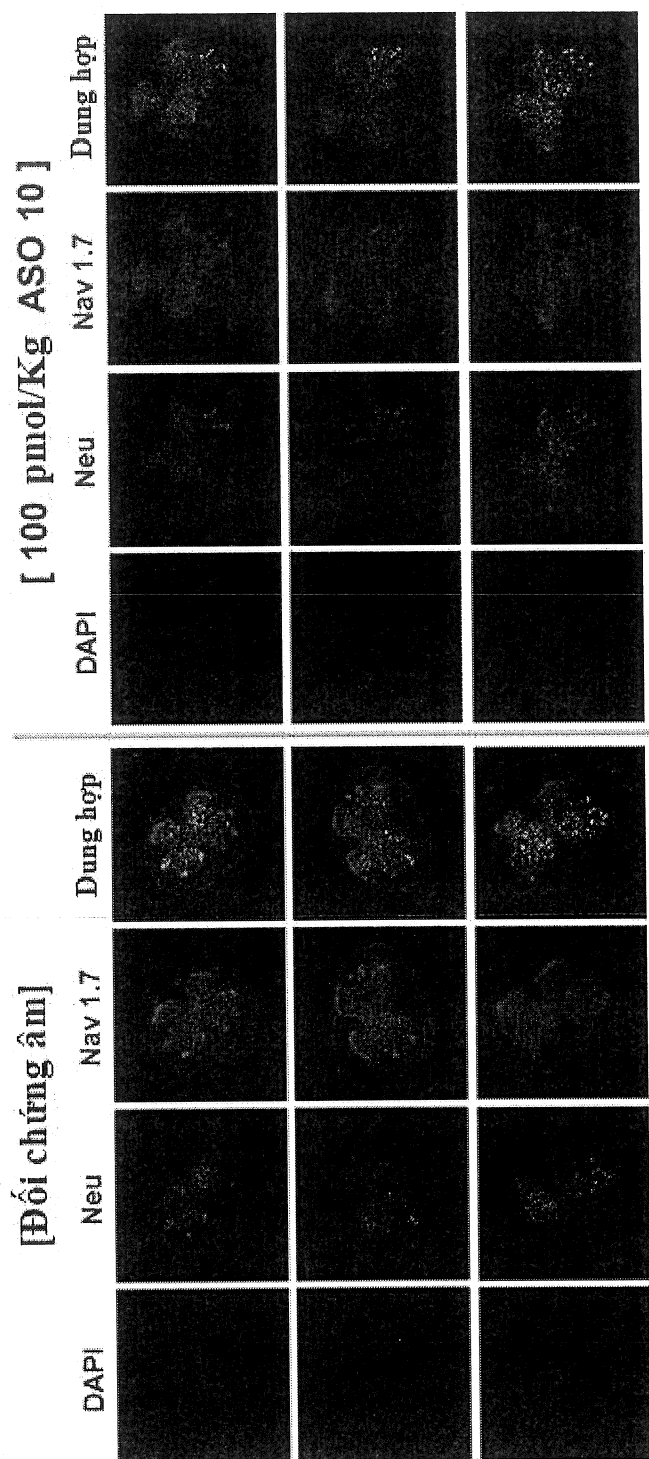
Hình 18A**Hình 18B**

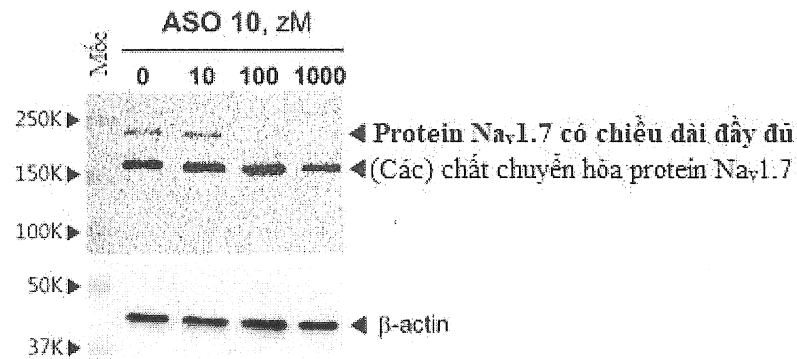
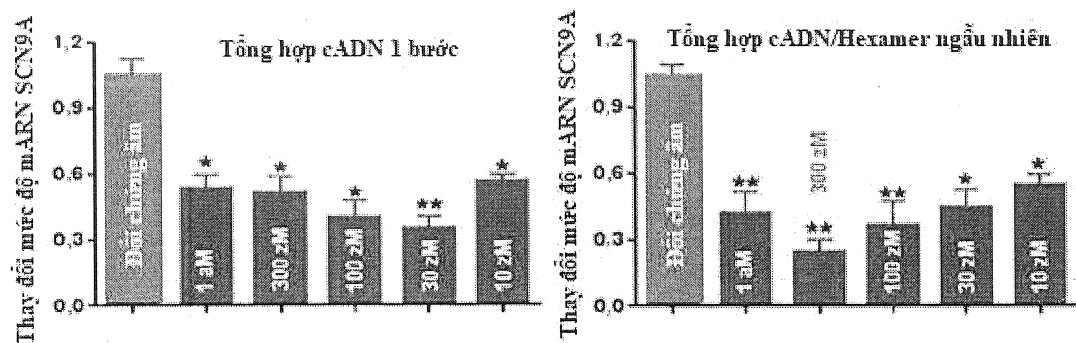
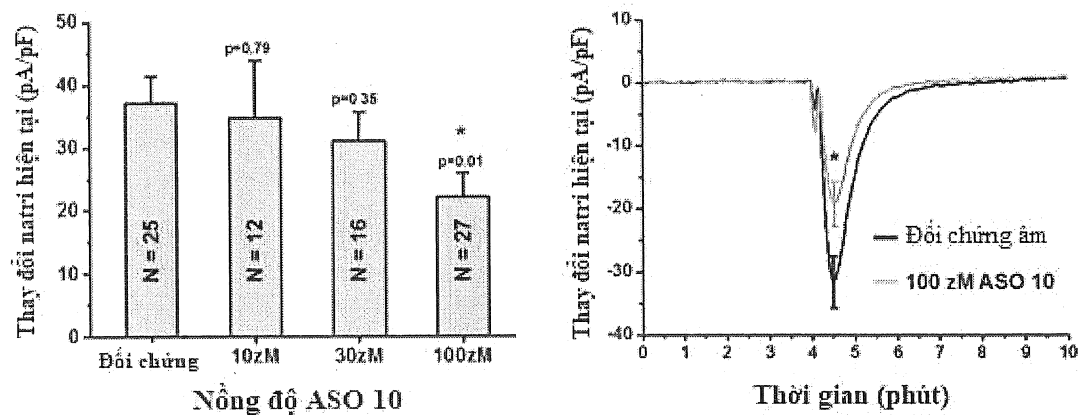
Hình 19A**Hình 19B**

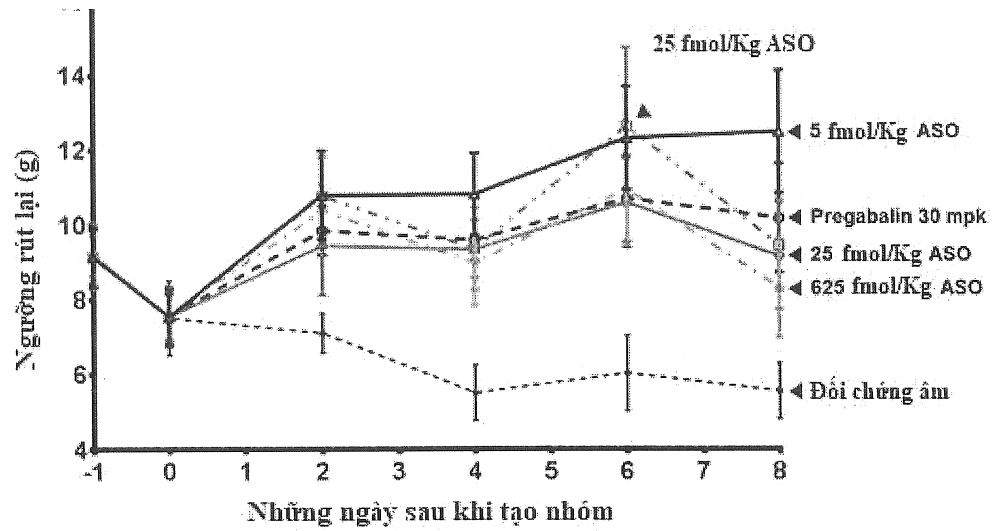
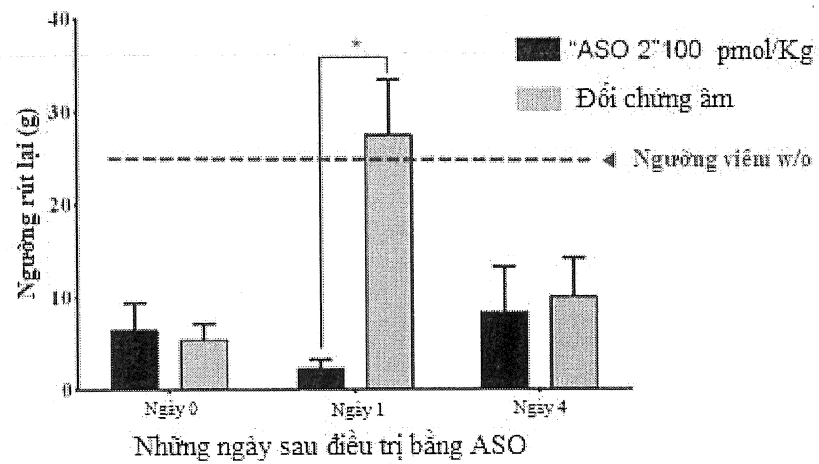
Hình 20A**Hình 20B**

Hình 21A**Hình 21B**

Hình 22



Hình 23A**Hình 23B****Hình 23C**

Hình 24A**Hình 24B**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> OLIPASS CORPORATION

<120> DẪN XUẤT AXIT NUCLEIC PEPTIT NHẮM ĐẾN TIỀN
mARN SCN9A Ở NGƯỜI

<130> OSH-00730 (32567-00730)

<140>

<141>

<150> PCT/IB2018/000160

<151> 2018-01-23

<150> 62/449,738

<151> 2017-01-24

<160> 23

<170> Sáng chế phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> ARN

<213> Người hiện đại

<400> 1

gauuauggcu acacgagcu
19

<210> 2

<211> 14

<212> ARN

<213> Người hiện đại

<400> 2

uguuuaggua cacu
14

<210> 3

<211> 30

<212> ARN

<213> Người hiện đại

<400> 3

gaauucuugug uuuagguaca cuuuuacugg
30

<210> 4

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

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
oligonucleotit

<400> 4
aagtgtacct aaac
14

<210> 5
<211> 20
<212> ARN
<213> Người hiện đại

<400> 5
uuguguuuag guacacuuuu
20

<210> 6
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
oligonucleotit

<400> 6
aagtgtacct aaacacaa
18

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
oligonucleotit

<400> 7
aagtctacct aaacacta
18

<210> 8
<211> 14
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
oligonucleotit

<400> 8

aagtgtacct aaag

14

<210> 9

<211> 10

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
oligonucleotit

<400> 9

aggtacactt

10

<210> 10

<211> 10

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
oligonucleotit

<400> 10

gttttaggtac

10

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
primer

<400> 11

ctttctcctt tcagtcctct

20

<210> 12

<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
primer

<400> 12
cgtctgttgg taaaggtttt
20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
primer

<400> 13
ccaccggact ggaccaaaaa
20

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
primer

<400> 14
gctaagaagg cccagctgaa
20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
primer

<400> 15
ggaccaaaaa tgtcgagcct
20

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

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
primer

<400> 16
tgaccatgaa taaccac
18

<210> 17
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
primer

<400> 17
gcaaggattt ttacaagt
18

<210> 18
<211> 13
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
thí nghiệm

<400> 18
atgtcgagta cac
13

<210> 19
<211> 20
<212> ARN
<213> Rattus sp.

<400> 19
uuuccuuuag guacacuuu
20

<210> 20

<211> 25
<212> ARN
<213> Người hiện đại

<400> 20
uuguguuuag guacacuuuu acugg
25

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
primer

<400> 21
caatcttccg tttcaacgcc
20

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
primer

<400> 22
accacagcca ggatcaagtt
20

<210> 23
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
oligonucleotit

<400> 23
ggaccaaaaa tgtcgagcct gaaga
25