



(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)



1-0048399

(51)⁷ C07K 14/00; A61K 38/004

(13) B

(21) 1-2019-01130

(22) 24/05/2017

(86) PCT/IB2017/000697 24/05/2017

(87) WO2018/029517 A1 15/02/2018

(30) 62/372,035 08/08/2016 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/10/2019 379A

(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); YOON Heungsik (KR).

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

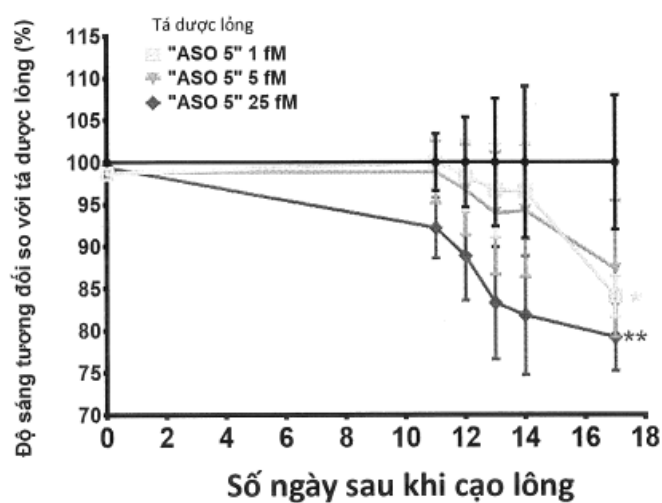
(54) DẪN XUẤT AXIT NUCLEIC PEPTIT

(21) 1-2019-01130

(57) Được cung cấp là các dẫn xuất axit nucleic peptit nhắm vào vị trí nối 5' của "exon 5" trong tiền mARN của thụ thể androgen ở người. Các dẫn xuất axit nucleic peptit có khả năng tạo ra các sản phẩm cắt nối của mARN thụ thể androgen trong các tế bào, và rất hữu ích để điều trị một cách an toàn các triệu chứng hoặc tình trạng da liễu liên quan đến hoạt tính androgen khi sử dụng tại chỗ.

Hình 13

Điểm sáng tương đối của các nhóm xử lý "ASO 5" so với nhóm đối chứng âm (tá dược lỏng). (phân tích bằng t-test)



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này liên quan đến các dẫn xuất axit nucleic peptit nhắm đích tiền mARN của thụ thể androgen để điều trị các triệu chứng ngoài da hoặc tình trạng da liễu qua trung gian hoạt tính androgen, và yêu cầu hưởng quyền ưu tiên căn cứ Đơn tạm thời Hoa Kỳ số 62/372035 nộp vào ngày 8 tháng 8 năm 2016, được dẫn chiếu và tích hợp trong tài liệu này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tình trạng hói là một chứng rối loạn đặc trưng bởi việc ban đầu tóc rụng và thưa ở da đầu. Chứng rụng tóc androgen, còn được gọi là "chứng hói đầu điển hình ở nam giới", gây ra do hoạt tính androgen quá mức trong nang tóc và mô xung quanh.

Trong khi chứng rụng tóc androgen gây ảnh hưởng đến cả nam và nữ, thì các triệu chứng thường xuất hiện lại khác nhau ở nam so với nữ. Nam giới có thể bị hói đầu theo vùng, và phụ nữ có nhiều khả năng hơn mắc chứng rụng tóc trên toàn thể da đầu. Tỷ lệ mắc bệnh rụng tóc androgen ở nam giới trong độ tuổi 30 đến 50 là khoảng 58% [*J. Invest. Dermatol.* vol 9, 296-300 (1997)]. Rụng tóc androgen gây ra do sự thay đổi của các hormon steroid ở nam giới, được gọi là androgen [*New Engl. J. Med.* vol 341, 491-7 (1999); *Mol. Cell Endocrinol.* vol 198, 89-95 (2002)].

Androgen điều chỉnh sự giải phóng bã nhờn trong các tuyến bã nhờn, sự phát triển của tóc trong nang tóc, sinh lực một cách có hệ thống, v.v. Androgen kích thích sự biến đổi dần dần của các nang lông nhỏ, các nang này làm cho các sợi lông không có sắc tố, mịn và ngắn ở một số khu vực, thành các nang sau lớn hơn (ví dụ như khuôn mặt). Tuy nhiên, trái ngược với hoạt động của androgen này trên các nang sau, sự quay ngược dần dần của các nang tóc sau trở lại thành các nang lông xảy ra ở thái dương và đỉnh da đầu, thường được gọi là "nghịch lý androgen". [*Expert Opin. Drug Discov.* vol 10, 269-292 (2015)]

Rụng tóc Androgen và DHT: 5α -reductaza khử testosterone thành 5α -dihydrotestosterone (DHT), một androgen mạnh hơn và hiệu quả hơn so với testosterone. Sự gia tăng đáng kể trong sản sinh DHT ở nang lông anagen trên trán đã được quan sát thấy ở nam giới trẻ hói đầu so với không bị hói. [(*Ind. J. Dermatol. Vene. Leprol.* vol 79, 613-625 (2013)] Nam giới mắc chứng rụng tóc androgen có xu hướng cho thấy mức độ của "tổng lượng testosterone" thấp hơn so với những người không bị rụng tóc androgen. Thay vào đó, mức độ DHT cao hơn ở nam giới mắc chứng rụng tóc androgen so với những người không mắc chứng rụng tóc androgen. DHT được sản sinh từ testosterone bởi 5α -reductaza. Nam giới bị rụng tóc androgen biểu hiện mức độ 5α -reductaza cao hơn trong nang tóc so với những người không bị rụng tóc androgen. DHT có vai trò lớn trong việc thu nhỏ các nang tóc, và do đó gây ra chứng rụng tóc androgen. [*Endocrinology*, vol 151, 2373-2380 (2010)]

Finasteride và dutasteride ức chế 5α -reductaza, và do đó làm giảm mức độ DHT có sẵn cho các thụ thể androgen trong nang lông và mô xung quanh. Hai chất ức chế phân tử nhỏ này đã được sử dụng để điều trị chứng hói đầu ở nam giới, mặc dù các tác dụng phụ có nguồn gốc từ sự điều chỉnh giảm hoạt tính androgen hệ thống. Các tác dụng phụ bao gồm rối loạn chức năng tình dục, chóng mặt, yếu, đau đầu, chảy nước mũi, phát ban da, v.v. [*New Engl. J. Med.* vol 362, 1237-8 (2010)].

Chất đối kháng AR tại chỗ: Androgen thể hiện các hoạt tính dược lý của chúng bằng cách liên kết với thụ thể androgen (AR). Chất đối kháng AR liên kết với AR và ức chế chức năng sinh lý của androgen, và do đó có thể được sử dụng để điều trị chứng rụng tóc androgen nếu được đưa vào nang tóc và mô xung quanh. Để tránh các tác dụng phụ phát sinh do sự ức chế hoạt tính androgen hệ thống, chất đối kháng AR được tiêm trực tiếp lên mô da đầu.

Ketoconazole sở hữu hoạt tính đối kháng AR yếu bên cạnh hoạt tính kháng nấm nổi tiếng của nó. Một loại dầu gội có chứa 2% ketoconazole (mang nhãn hiệu Nizoral®) đã được sử dụng để điều trị chứng rụng tóc androgen cục bộ. [*J. Dermatol. Sci.* vol 45(1), 66-68 (2007)]

Topilutamide là một chất đối kháng AR được gọi là fludiril. Topilutamide được bán trên thị trường dưới dạng thuốc bôi 2% để điều trị rụng tóc androgen ở một số nước châu Âu với nhãn hiệu "Eucapil". [*Dermatol. Surg.* vol 28(8), 678-685 (2002)]

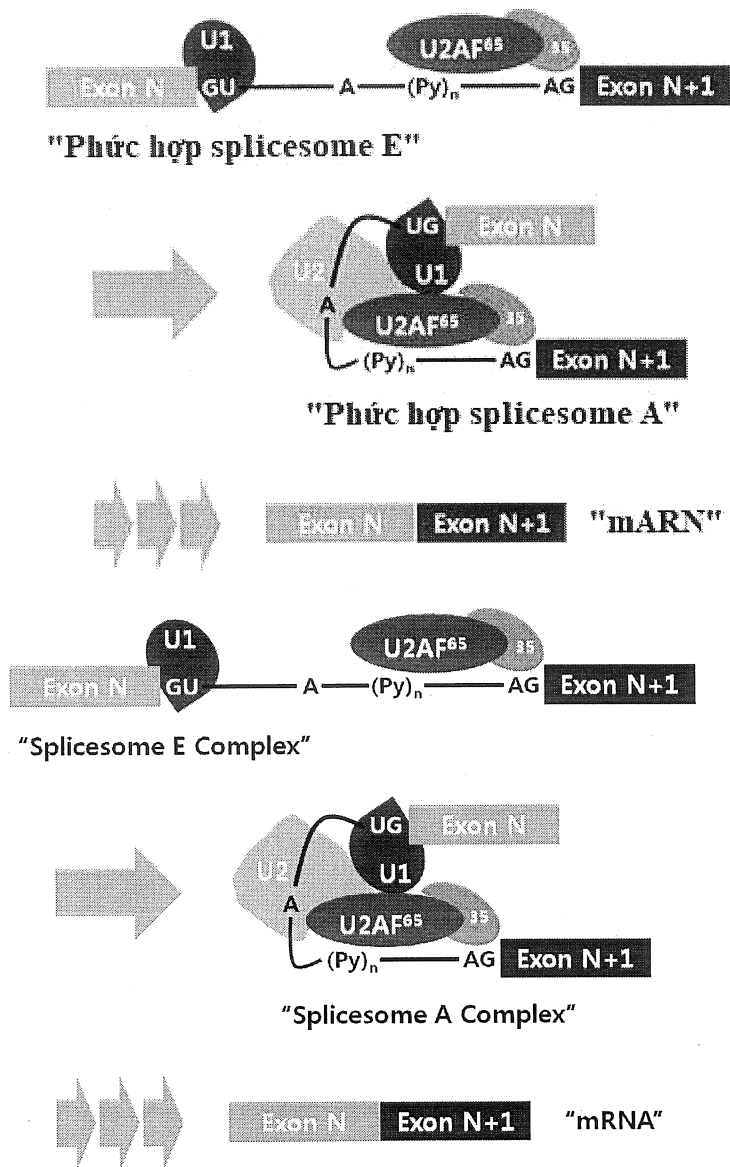
Protein AR hoặc mARN trong nang tóc: Ở các đối tượng nam và nữ mắc chứng rụng tóc androgen, biểu hiện của AR được thấy rằng cao hơn ở nang tóc phía trước trán so với trong nang tóc vùng chẩm. [*J. Investig. Dermatol.* vol 109, 296-300 (1997)] Nếu biểu hiện AR bị điều chỉnh giảm đi một cách có chọn lọc bởi một chất ở nang lông và mô xung quanh, thì chất đó có thể điều trị chứng rụng tóc androgen một cách an toàn mà không gây ra các tác dụng phụ do sự điều chỉnh giảm của hoạt tính androgen hệ thống. Trong một tài liệu khác, những phụ nữ mắc chứng rụng tóc androgen được thấy là có mức độ mARN AR cao hơn ở nang tóc phía trước trán và vùng đỉnh so với nang tóc vùng chẩm. [*Genetics Mol.Res.* vol 12 (2), 1834-1840 (2013)]

Tổng hợp protein ribosom: Protein được mã hóa bởi ADN (axit 2-deoxyribo nucleic). Để đáp ứng với kích thích tế bào, ADN được phiên mã để tạo ra tiền mARN (axit ribonucleic tiền thông tin) trong nhân. Các intron của tiền mARN được cắt bằng enzyme để tạo ra mARN (axit ribonucleic thông tin), sau đó mARN được chuyển vào tế bào chất. Trong tế bào chất, một phức hợp của bộ máy dịch mã được gọi là ribosom liên 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)]

Một oligonucleotit liên kết với ARN theo một trình tự nhất định (nghĩa là bổ sung) được gọi là oligonucleotit antisense (ASO). Một ASO có thể liên kết chặt chẽ với mARN và ức chế tổng hợp protein bởi ribosome dọc theo mARN trong tế bào chất. Một ASO cần phải có mặt trong tế bào để ức chế sự tổng hợp protein ribosom của protein đích.

Quá trình cắt nối: ADN được phiên mã để tạo ra tiền mARN (axit ribonucleic tiền thông tin) trong nhân. Tiền mARN sau đó được xử lý thành mARN sau quá trình cắt các intron bằng một loạt các phản ứng phức tạp gọi chung là "cắt nối" như được tóm tắt sơ đồ trong sơ đồ bên dưới. [*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" (nghĩa là phức hợp spliceosome ban đầu) giữa tiền mARN và các nhân tố đáp ứng cắt nối. Trong "phức hợp spliceosome E", U1 liên kết với đoạn nối của exon N và intron N và U2AF³⁵ liên kết với đoạn nối của intron N và exon (N+1). Do đó, các đoạn nối của exon/intron hoặc intron/exon rất quan trọng đối với sự hình thành phức hợp spliceosome ban đầu. "Phức hợp spliceosome E" trở thành "Phức hợp spliceosome A" sau khi tạo phức bổ sung với U2. "Phức hợp spliceosome A" trải qua một loạt các phản ứng phức tạp để xóa hoặc cắt intron để nối các exon lân cận với nhau.

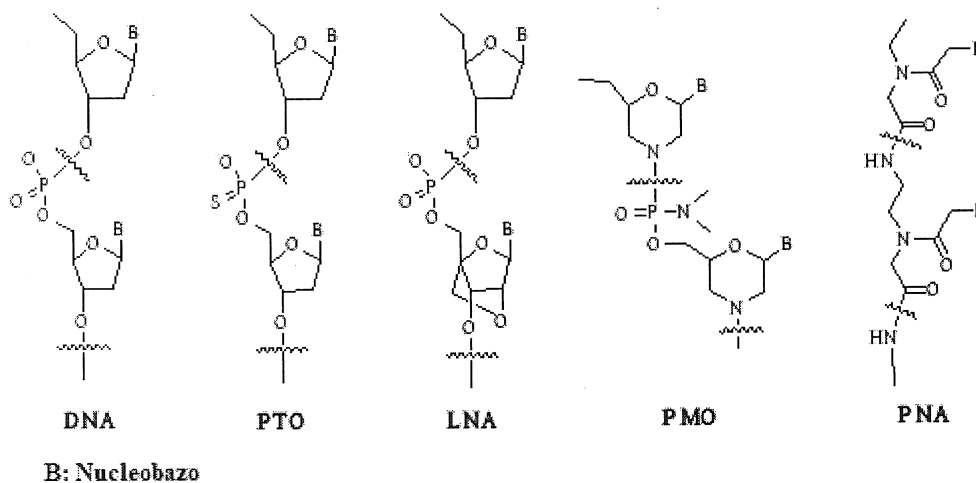


Ức chế antisense của quá trình cắt nối: Trong nhân, ASO có thể liên kết chặt chẽ với một vị trí nhất định trong tiền mRNA, và có thể can thiệp vào quá trình cắt nối của tiền mRNA để trở thành mRNA, tạo ra các sản phẩm là mRNA với chiều dài đầy đủ hoặc mRNA thiếu exon đích. Các mRNA như vậy được gọi là "sản phẩm cắt nối", mã hóa (các) protein nhỏ hơn protein được mã hóa bởi mRNA có chiều dài đầy đủ.

Về nguyên tắc, việc cắt nối có thể bị gián đoạn bởi ức chế sự hình thành "phức hợp spliceosome E". Nếu một ASO liên kết chặt chẽ với một đoạn nối (5' → 3') exon-

intron, tức là "vị trí cắt 5'", ASO sẽ ngăn chặn sự hình thành phức hợp giữa tiền mARN và nhân tố U1, và do đó ngăn chặn sự hình thành "phức hợp spliceosome E". Tương tự, "phức hợp spliceosome E" không thể được hình thành nếu một ASO liên kết chặt chẽ với một đoạn nối của (5' → 3') intron-exon, tức là "vị trí cắt 3'".

Oligonucleotit không tự nhiên: oligonucleotit ADN hoặc ARN dễ bị thoái hóa bởi các hạt nhân nội sinh, khiến hạn chế khả năng sử dụng để trị liệu của chúng. Cho đến nay, một số lượng lớn các oligonucleotit không tự nhiên đã được phát triển và nghiên cứu chuyên sâu. [*Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* vol 33, 533-540 (2006)]. Một số trong số chúng đã được thấy rằng có sự ổn định trao đổi chất mở rộng so với ADN và ARN. Được cung cấp dưới đây là các cấu trúc hóa học của một số đại diện cho oligonucleotit không tự nhiên. Các oligonucleotit này dự đoán sẽ liên kết với axit nucleic bổ sung của nó như ADN hoặc ARN.



Oligonucleotit photphorotioat: Oligonucleotit photphorotioat (PTO) là một chất tương tự ADN với một trong những nguyên tử oxy photphat khung được thay thế bằng 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 của các nucleaza một cách tương đối. [*Ann. Rev. Biochem.* vol 54, 367-402 (1985)]

Phản ánh sự tương đồng trong cấu trúc của khung giữa PTO và ADN, cả hai đều có khả năng thâm nhập kém vào màng tế bào trong hầu hết các loại tế bào ở động

vật có vú. Tuy nhiên, đối với một số loại tế bào biểu hiện dồi dào chất vận chuyển cho ADN, ADN và PTO cho thấy đều có khả năng hấp thu của tế bào là tốt. PTO được sử dụng hệ thống được biết là dễ dàng phân phối đến gan và thận. [*Nucleic Acids Res.* vol 25, 3290-3296 (1997)]

Để tăng tính thấm màng tế bào in vitro của PTO, kỹ thuật lipofection đã được áp dụng rộng rãi. Tuy nhiên, lipofection làm thay đổi màng tế bào, gây ra độc tính tế bào, và do đó sẽ không an toàn cho việc sử dụng để điều trị lâu dài.

Trong 30 năm qua, các PTO antisense 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 cho thuốc antisense này đã không được phát triển thành công, một phần do tính thấm màng tế bào kém của PTO. Để khắc phục tình trạng thấm màng kém, PTO cần phải được sử dụng ở liều cao để mang lại hoạt tính điều trị. Tuy nhiên, 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. Exp. Pharmacol. Physiol.* vol 33, 533-540 (2006)]

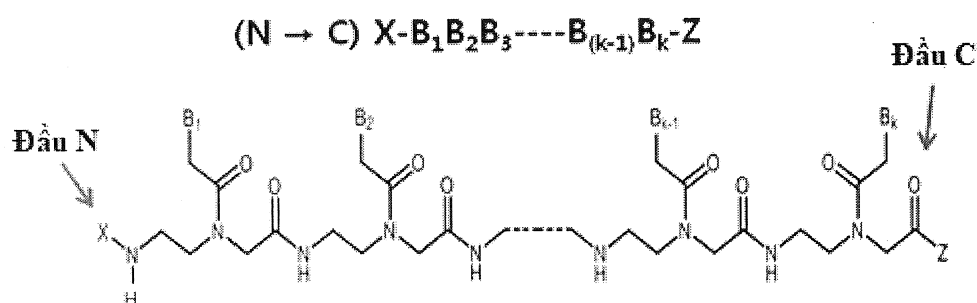
Nhiều antisense PTO đã được thấy là biểu hiện hoạt tính lâm sàng đối với các bệnh với sự đóng góp đáng kể từ gan hoặc thận. Mipomersen là một chất tương tự PTO ức chế sự tổng hợp apoB-100, một loại protein liên quan đến vận chuyển cholesterol LDL. Mipomersen biểu hiện do hoạt tính lâm sàng trong một 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-113.715 là một chất tương tự antisense PTO ức chế quá trình tổng hợp photphatase protein tyrosin 1B (PTP1B), và đã được thấy là thể hiện hoạt tính điều trị ở những bệnh nhân đái tháo đường loại II. [*Curr. Opin. Mol. Ther.* vol 6, 331-336 (2004)]

Axit nucleic bị khóa: Trong axit nucleic bị khóa (LNA), vòng ribose khung của ARN bị hạn chế về mặt cấu trúc để tăng ái lực liên kết 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)]. Giống như PTO, LNA cũng cho thấy tính thấm màng tế bào kém.

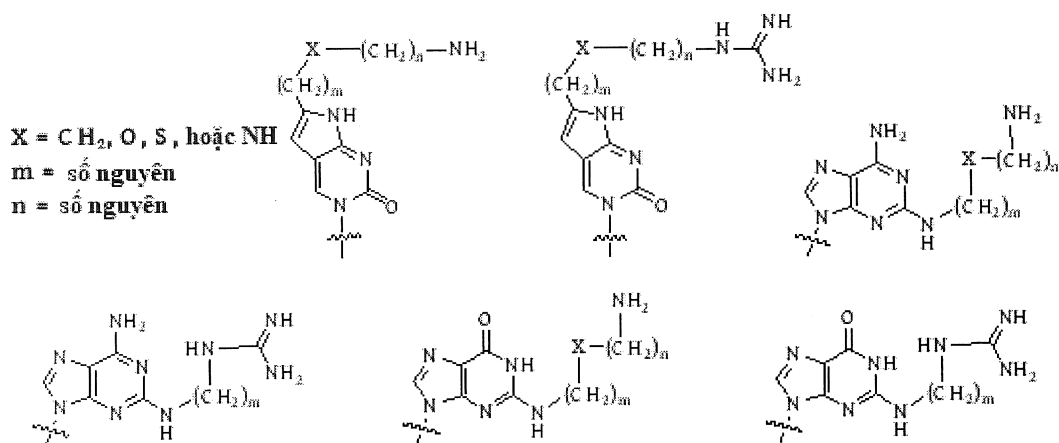
Oligonucleotit Photphorodiamidat Morpholino: Trong oligonucleotit photphorodiamidat morpholino (PMO), photphat và 2-deoxyribo khung của ADN được thay thế bằng photphoamidit và morpholin, tương ứng. [*Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol 71, 575-586 (2006)] Trong khi khung ADN bị tích điện âm, khung PMO không bị tích điện. Do đó, liên kết giữa PMO và mARN không có lực đẩy tĩnh điện giữa các khung và có xu hướng mạnh hơn so với giữa ADN và mARN. Vì PMO có cấu trúc rất khác so với ADN, PMO sẽ không được nhận biết bởi chất vận chuyển thuộc gan, các chất này nhận biết ADN hoặc ARN. Tuy nhiên, PMO cũng không dễ dàng xâm nhập màng tế bào.

Axit Nucleic Peptit: Axit Nucleic Peptit (PNA) là một polypeptit với N-(2-aminoethyl)glyxin là khung đơn vị, và được phát hiện bởi Tiến sĩ Nielsen và đồng nghiệp. [*Science* vol 254, 1497-1500 (1991)] Cấu trúc hóa học và danh pháp viết tắt của PNA nguyên mẫu được minh họa bằng hình vẽ cung cấp dưới đây. Giống như ADN và ARN, PNA cũng liên kết chọn lọc với axit nucleic bổ sung. [*Nature (London)* vol 365, 566-568 (1992)]. Trong liên 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 được tích điện. Do đó, liên kết giữa PNA và ARN có xu hướng mạnh hơn so với giữa ADN và ARN. Do PNA khác biệt rõ rệt với ADN trong cấu trúc hóa học, PNA sẽ không được nhận biết bởi chất vận chuyển thuộc gan mà nhận biết ADN, và sẽ biểu hiện dạng phân phối mô khác với ADN hoặc PTO. Tuy nhiên, PNA cũng thâm nhập kém vào màng tế bào động vật có vú. (*Adv. Drug Delivery Rev.* vol 55, 267-280, 2003)

Nucleobazơ biến tính nhằm cải thiện tính thấm màng của PNA: PNA được làm cho có tính thấm cao qua màng tế bào động vật có vú bằng cách đưa các nucleobazơ biến tính với lipid cation hoặc chất tương đương được liên kết cộng hóa trị. Các cấu trúc hóa học của các nucleobazơ biến tính này được cung cấp ở trên. Các nucleobazơ biến tính như vậy của xytoxin, adenin và guanin đã được thấy là có thể dự đoán lai bổ sung với guanin, timin và xytoxin. [PCT Appl. No. PCT/KR2009/001256; EP2268607; US8680253]



Việc kết hợp các nucleobazơ biến tính như vậy vào PNA giống như các trường hợp của lipofection. Bằng kỹ thuật lipofection, các phân tử oligonucleotit được bọc bằng các phân tử lipid cation như lipofectamin, và các phức hợp lipofectamin/oligonucleotit này có xu hướng xâm nhập màng tế bào khá dễ dàng so với các phân tử oligonucleotit trần.

Ngoài khả năng thấm màng tốt, các dẫn xuất PNA này được thấy là có ái lực cực mạnh đối với axit nucleic bổ sung. Ví dụ, việc đưa 4 đến 5 nucleobazơ biến tính

vào các dẫn xuất PNA từ 11 đến 13 mer dễ dàng mang lại mức tăng T_m từ 20°C hoặc cao hơn trong quá trình hình thành sợi kép với ADN bổ sung. Các dẫn xuất PNA như vậy rất nhạy cảm với một sự bắt cặp sai với bazo đơn. Một sự bắt cặp sai với bazo đơn dẫn đến sự mất T_m từ 11 đến 22°C tùy thuộc vào loại bazo biến tính cũng như trình tự PNA.

Oligonucleotit Antisense AR (ASO AR): Về nguyên tắc, một ASO nhắm vào mARN AR có thể ức chế sự tổng hợp protein ribosom của thụ thể androgen. Có những trường hợp được báo cáo về ASO AR ức chế biểu hiện AR trong các tế bào. Ví dụ, EZN-4176, một gapmer LNA/ADN bổ sung nhắm đích mARN AR, đã giảm sự biểu hiện của AR trong các tế bào khối u cũng như trong các khối u của mẫu động vật cho bệnh ung thư tuyến tiền liệt. [*Mol. Cancer. Ther.* vol 10(12), 2309-2319 (2011)].

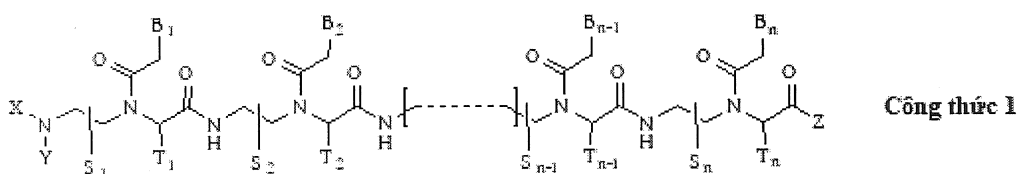
Các ASO nhắm đích exon 1 hoặc exon 8 của mARN AR đã ức chế sự biểu hiện AR trong các tế bào ung thư tuyến tiền liệt cũng như trong các khối u của mẫu động vật đối với ung thư tuyến tiền liệt kháng hóa trị với Enzalutamit, một chất đối kháng AR. [*Clin. Cancer Res.* vol 21(7), 1675-1687 (2015)]

Điều chỉnh giảm AR trong nang tóc bằng ứng dụng tại chỗ ASO AR: Sự giảm hoạt tính androgen trong nang tóc và mô xung quanh có thể đạt được bằng cách ức chế biểu hiện AR ở nang tóc và mô xung quanh. Biểu hiện AR trong nang tóc có thể được giảm đi nhờ ASO AR, nếu ASO được đưa vào nang tóc và mô xung quanh.

Để tránh các tác dụng phụ từ việc giảm hoạt tính androgen hệ thống, người ta mong muốn giảm sự biểu hiện AR cục bộ trong nang tóc và mô xung quanh để điều trị chứng rụng tóc androgen. Áp dụng tại chỗ ASO AR cho da đầu sẽ là chế độ an toàn nhất để ức chế sự biểu hiện AR tại chỗ trong nang tóc và mô xung quanh, nếu ASO được tạo ra hoặc được điều chế để dễ dàng đưa vào nang tóc. Cho đến nay, ASO AR hầu như không được sử dụng để điều trị tại chỗ chứng rụng tóc androgen. Các ASO AR đã được đánh giá chủ yếu cho việc sử dụng một cách hệ thống để điều trị ung thư tuyến tiền liệt kháng phương pháp trị liệu loại bỏ androgen.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế này cung cấp một dẫn xuất axit nucleic peptit được biểu diễn bởi Công thức I, hoặc một loại muối được dụng của nó:



trong đó:

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 10 đến 21;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn bổ sung 9 monome với trình tự ARN 17 monome [(5' $\rightarrow$ 3') CCUUGCCUGGUAAGGAA] trong tiền mARN của thụ thể androgen ở người;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n độc lập đại diện cho gốc deuterido, hydrido, ankylo được thế hoặc không được thế, hoặc aryl được thế hoặc không được thế;

X và Y đại diện độc lập cho gốc hydrido [H], formyl [H-C(=O)-], aminocacbonyl [NH₂-C(=O)-], ankylo được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, ankylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, ankyloxycacbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxycacbonyl được thế hoặc không được thế, ankylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế, ankylsunphonyl được thế hoặc không được thế, hoặc arylsunphonyl được thế hoặc không được thế;

Z đại diện cho gốc hydrido, hydroxy, ankyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, amino được thế hoặc không được thế, ankylo được thế hoặc không được thế, hoặc aryl được thế hoặc không được thế;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ tự nhiên bao gồm adenin, timin, guanin, xytoxin 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 độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên với một gốc amino được thế hoặc không được thế liên kết cộng hóa trị với gốc nucleobazơ.

Hợp chất của công thức I gây ra sự cắt nối thay thế của tiền mARN AR ở người, tạo ra (các) sản phẩm cắt nối mARN AR thiếu "exon 5", và do đó rất hữu ích để điều trị một cách an toàn các chỉ định hoặc tình trạng da liễu liên quan đến hoạt tính androgen.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1(A) -(C). Ví dụ về các nucleobazơ (biến tính) tự nhiên hoặc không tự nhiên có thể được chọn làm dẫn xuất axit nucleic peptit của công thức I.

Hình 2(A)-(E). Ví dụ về các nhóm thế có thể được chọn làm axit nucleic peptit của công thức I.

Hình 3. Cấu trúc hóa học của các monome PNA với nucleobazơ tự nhiên hoặc biến tính.

Hình 4. Cấu trúc hóa học cho chữ viết tắt của các nhóm thế đầu N hoặc C.

Hình 5(A). Cấu trúc hóa học cho dẫn xuất PNA của "(N $\rightarrow$ C) Fethoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂".

Hình 5(B). Cấu trúc hóa học cho dẫn xuất PNA của "(N $\rightarrow$ C) Benzoyl-Lys-Val-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂".

Hình 6. Cấu trúc hóa học cho các monome Fmoc-PNA được sử dụng để tổng hợp các dẫn xuất PNA của sáng chế.

Hình 7(A)-(B). Sắc ký đồ HPLC pha đảo C₁₈ của "ASO 1" trước và sau khi tinh chế HPLC, tương ứng.

Hình 8(A). Phân tích điện di của các sản phẩm PCR dạng lỏng của các tế bào MCF7 được xử lý với "ASO 5" tại 0 aM (đối chứng âm), 3 aM, 30 aM, 300 aM hoặc 3 fM.

Hình 8(B). Sơ đồ biểu diễn của dải PCR cho sự bỏ qua exon 4-5 cùng với dữ liệu giải trình tự.

Hình 9(A). Sự thay đổi mức độ tương đối của exon 4-6 trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "ASO 5" ở 0 zM (đối chứng âm), hoặc 1 zM đến 1 aM trong 5 giờ. (phân tích thống kê bằng t-test)

Hình 9(B). Sự thay đổi mức độ tương đối của exon 4-6 trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "ASO 1" ở 0 zM (đối chứng âm), hoặc 1 zM đến 1 aM trong 5 giờ. (phân tích thống kê bằng t-test)

Hình 9(C). Sự thay đổi mức độ tương đối của exon 4-6 trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "ASO 10" ở 0 zM (đối chứng âm), hoặc 1 zM đến 1 aM trong 5 giờ. (phân tích thống kê bằng t-test)

Hình 10(A). Dữ liệu Western blot cho các tế bào MCF7 được xử lý bằng "ASO 1" ở 0 zM (đối chứng âm), hoặc 100 zM đến 300 aM.

Hình 10(B). Dữ liệu Western blot cho các tế bào MCF7 được xử lý bằng "ASO 5" ở 0 zM (đối chứng âm), hoặc 10 zM đến 30 aM.

Hình 11(A). Hình ảnh cho sự tăng trưởng của lông theo nhóm trong vùng da đã được cạo lông theo số ngày sau khi cạo lông.

Hình 11(B). Điểm sáng tương đối của các nhóm xử lý với "ASO 1" so với nhóm đối chứng âm (tá được lông). (phân tích thống kê bằng t-test)

Hình 12. Bộ đại diện của hình ảnh huỳnh quang AR IHC (màu đỏ) và DAPI (màu xanh) cho các mẫu da thu được từ con vật được xử lý bằng "ASO 1" ở 0 fM (đối chứng âm, tá được lông), 0,2 fM hoặc 1 fM.

Hình 13. Điểm sáng tương đối của các nhóm xử lý "ASO 5" so với nhóm đối chứng âm (tá được lông). (phân tích thống kê bằng t-test)

Hình 14(A). Điểm sáng tương đối của các nhóm xử lý "ASO 10" so với nhóm đối chứng âm (tá dược lỏng). (phân tích thống kê bằng t-test)

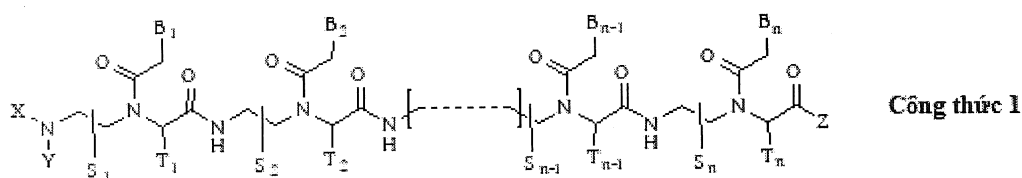
Hình 14(B). Bộ đại diện của hình ảnh huỳnh quang AR IHC (màu đỏ) và DAPI (màu xanh) cho các mẫu da thu được từ động vật được xử lý bằng "ASO 10" ở 0 (đối chứng âm, tá dược lỏng), 1, 5 hoặc 25 fM.

Hình 15. Dữ liệu qPCR cho mức độ mRNA AR tương đối bằng xét nghiệm TaqMan trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "ASO 10" ở 0 (đối chứng âm), 1, 10, 100 hoặc 1.000 zM trong 24 giờ so với đối chứng âm. (phân tích thống kê bằng t-test)

Hình 16. Bộ đại diện của hình ảnh huỳnh quang AR IHC (màu đỏ) và DAPI (màu xanh) cho các mẫu mô thu được từ chuột được tiêm dưới da với "ASO 10" ở 0 (đối chứng âm), 0,01 hoặc 0,1 pmol/Kg, 2X mỗi tuần trong thời gian 4 tuần.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế này cung cấp một dẫn xuất axit nucleic peptit được biểu thị bởi Công thức I, hoặc một loại muối được dụng của nó:



trong đó:

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 10 đến 21;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn bổ sung gồm 9 monome với trình tự ARN gồm 17 mer [(5' → 3') CCUUGCCUGGUAAGGAA] trong tiền mRNA của thụ thể androgen ở người;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n độc lập đại diện cho gốc deuterido, hydrido, ankyl được thế hoặc không được thế, hoặc aryl được thế hoặc không được thế;

X và Y đại diện độc lập cho gốc hydrido [H], formyl [H-C(=O)-], aminocacbonyl [NH₂-C(=O)-], ankyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, ankylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, ankyloxycacbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxycacbonyl được thế hoặc không được thế, ankylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế, ankylsunphonyl được thế hoặc không được thế, hoặc arylsunphonyl được thế hoặc không được thế;

Z đại diện cho gốc hydrido, hydroxy, ankyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, amino được thế hoặc không được thế, ankyl được thế hoặc không được thế, hoặc aryl được thế hoặc không được thế;

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

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

Hợp chất của công thức I gây ra sự cắt nối thay thế của tiền mARN AR ở người, tạo ra (các) sản phẩm cắt nối mARN AR thiếu "exon 5", và do đó rất hữu ích để điều trị một cách an toàn các triệu chứng hoặc tình trạng da liễu liên quan đến hoạt tính androgen.

Điều kiện "n là số nguyên nằm trong khoảng từ 10 đến 21" theo nghĩa đen là n là số nguyên có thể chọn từ một nhóm các số nguyên 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 và 20.

Hợp chất của Công thức I liên kết chặt chẽ với vị trí nối 5' của "exon 5" của tiền mARN AR ở người được phiên mã từ gen AR ở người. [Trình tự tham chiếu NCBI: NC_000023.11] Trình tự tiền mARN AR gồm 40 mer, bao gồm 20 mer từ

"exon 5" và 20 mer từ "intron 5" đọc rõ ràng là [(5' → 3') GUGGGCCAAGGCCUUGCCUG-GUAAGGAAAAGGGAAGUGGG], mặc dù số exon và số intron có thể thay đổi tùy thuộc vào bản sao mARN AR. Trình tự tiền mARN gồm 40 mer có thể được ký hiệu cách khác là [(5' → 3') GUGGGCCAAGGCCUUGCCUG | guaaggaaaagggaaguggg], trong đó trình tự exon và intron được thể hiện với các chữ cái "viết hoa" và chữ "nhỏ", tương ứng, và đoạn nối exon/intron được biểu thị bằng " | ".

Trình tự tiền mARN gồm 17 mer là [(5' → 3') CCUUGCCUGGUAAGGAA] được sử dụng để mô tả hợp chất của Công thức I trong sáng chế này bao gồm 9 mer trong "exon 5" của AR và 8 mer trong "intron 5" AR. Do đó, trình tự mARN gồm 17 mer có thể đọc cách khác là [(5' → 3') CCUUGCCUG | guaaggaa].

Hợp chất của Công thức I liên kết chặt chẽ với vị trí nối 5' của exon 5 trong tiền mARN AR ở người và cản trở sự hình thành "phức hợp spliceosome ban đầu" liên quan đến exon đích của hợp chất. Do hợp chất của sáng chế này ngăn chặn triệt để sự hình thành "phức hợp spliceosome ban đầu", "exon 5" AR được tách ra để tạo ra một sản phẩm cắt nối mARN AR hoặc các sản phẩm thiếu "exon 5". Do đó, hợp chất của sáng chế này gây ra việc bỏ qua "exon 5".

Hợp chất của Công thức I liên kết chặt chẽ với ADN bổ sung như được minh họa trong giải pháp kỹ thuật trước đây [PCT/KR2009/001256]. Sự kết hợp giữa dẫn xuất PNA của Công thức I và ADN hoặc ARN bổ sung có độ dài đầy đủ của nó cho thấy giá trị T_m quá cao để có thể được xác định một cách đáng tin cậy trong dung dịch đậm. Hợp chất PNA của Công thức I vẫn mang lại giá trị T_m cao với các ADN bổ sung có chiều dài ngắn hơn, ví dụ, 10 mer.

Do có ái lực liên kết cao, dẫn xuất PNA của sáng chế này có khả năng gây ra sự bỏ qua "exon 5" trong các tế bào ngay cả với đoạn bổ sung nhỏ như 9 mer với vị trí nối 5' của "exon 5", mặc dù một số lượng nhỏ đoạn khớp có thể làm tăng nguy cơ phản ứng chéo với các tiền mARN khác. Nếu dẫn xuất PNA của sáng chế này được

sử dụng cho mục đích điều trị cục bộ, nguy cơ phản ứng chéo được dự đoán sẽ giảm đáng kể.

Các cấu trúc hóa học của các nucleobazo tự nhiên hoặc không tự nhiên trong dẫn xuất PNA của Công thức I được minh họa trong Hình 1(A)-(C). Các nucleobazo tự nhiên (nghĩa là hình thành tự nhiên) hoặc không tự nhiên (nghĩa là hình thành không tự nhiên) của sáng chế này bao gồm nhưng không giới hạn ở các nucleobazo được cung cấp trong Hình 1(A)-(C). Việc cung cấp các nucleobazo không tự nhiên như vậy là để minh họa sự đa dạng của các nucleobazo được phép, và do đó không nên diễn giải để giới hạn phạm vi của sáng chế. Một người có kỹ năng trong lĩnh vực này có thể dễ dàng nhận ra rằng các biến thể của nucleobazo không tự nhiên có thể phù hợp với các vị trí cụ thể trong hợp chất PNA của Công thức I miễn là các biến thể đó đáp ứng sự bổ sung mong muốn với trình tự của tiền mARN đích của nó.

Các nhóm thế được thông qua để mô tả dẫn xuất PNA của Công thức I được minh họa trong Hình 2(A)-(E). Hình 2(A) cung cấp các ví dụ cho các gốc ankyl được thế hoặc không được thế. Các gốc ankylaxyl được thế hoặc không được thế và các gốc arylaxyl được thế hoặc không được thế được minh họa trong Hình 2(B). Hình 2(C) minh họa các ví dụ về các gốc ankylamino được thế hoặc không được thế, arylamino được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, arylsunphonyl được thế hoặc không được thế, ankylsunphonyl hoặc arylsunphonyl được thế hoặc không được thế, và các gốc ankylphotphonyl hoặc arylphotphonyl được thế hoặc không được thế. Hình 2(D) cung cấp các ví dụ cho các gốc ankyloxycarbonyl hoặc aryloxycarbonyl được thế hoặc không được thế, hoặc aminocarbonyl hoặc arylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế. Trong Hình 2(E) được cung cấp các ví dụ cho các gốc ankylaminotiocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminotiocarbonyl được thế hoặc không được thế, ankyloxytiocarbonyl được thế hoặc không được thế hoặc aryloxytiocarbonyl được thế hoặc không được thế. Việc cung cấp các nhóm thế mẫu như vậy là để minh họa sự đa dạng của các nhóm thế được phép, và do đó không nên được giải thích để giới

hạn phạm vi của sáng chế. Một người có kỹ năng trong lĩnh vực này có thể dễ dàng nhận ra rằng trình tự oligonucleotit là yếu tố quan trọng nhất để liên kết đặc hiệu trình tự của một oligonucleotit với trình tự tiền mARN đích trên các nhóm thế tại đầu N hoặc đầu C.

Hợp chất của Công thức I có tính thấm tế bào tốt và có thể dễ dàng được đưa vào tế bào nếu được xử lý như oligonucleotit "trần" như được minh họa trong giải pháp kỹ thuật trước [PCT/KR2009/001256]. Do đó, hợp chất của sáng chế này tạo ra việc bỏ qua "exon 5" trong tiền mARN AR ở người để tạo ra (các) sản phẩm cắt nối mARN AR thiếu "exon 5" AR trong các tế bào được xử lý bằng hợp chất của Công thức I như oligonucleotit "trần". Hợp chất của Công thức I không yêu cầu bất kỳ phương tiện hoặc chế phẩm nào để phân phối vào tế bào để tạo ra sự bỏ qua của exon đích trong các tế bào. Hợp chất của Công thức I dễ dàng tạo ra sự bỏ qua "exon 5" AR trong các tế bào được xử lý với hợp chất của sáng chế này là oligonucleotit "trần" ở nồng độ nhỏ hơn 10^{-15} mol.

Nhờ có tính thấm tế bào hoặc tính thấm màng tốt, dẫn xuất PNA của Công thức I có thể được sử dụng tại chỗ dưới dạng oligonucleotit "trần" để tạo ra việc bỏ qua "exon 5" AR trên da đích. Hợp chất của Công thức I không yêu cầu chế phẩm tăng khả năng cung cấp qua da cho một hoạt tính trị liệu cục bộ hoặc sinh học. Thông thường, hợp chất của Công thức I được hòa tan trong nước và dung môi hỗ trợ, và được sử dụng tại chỗ hoặc qua da ở nồng độ nhỏ hơn 10^{-12} mol để tạo ra hoạt tính trị liệu hoặc hoạt tính sinh học mong muốn trong da đích. Hợp chất của sáng chế này không cần được điều chế hoặc xâm lấn nhiều để tạo ra các hoạt tính trị liệu tại chỗ.

Hợp chất của Công thức I có thể được sử dụng kết hợp với axit hoặc bazo được dụng bao gồm nhưng không giới hạn trong số natri hydroxit, kali hydroxit, axit clohydric, axit metansunphonic, axit xitric, axit trifloroaxetic, v.v.

Dẫn xuất PNA của Công thức I hoặc một loại muối được dụng của nó có thể được sử dụng cho một đối tượng kết hợp với một tá dược được dụng bao gồm nhưng không giới hạn trong số axit xitric, axit clohydric, axit tartaric, axit stearic,

polyetylenglycol, polypropylenglycol, etanol, isopropanol, natri bicarbonat, nước cất, chất bảo quản, v.v.

Hợp chất của sáng chế có thể được sử dụng tại chỗ cho một đối tượng ở nồng độ có hiệu quả về mặt trị liệu hoặc sinh học, từ 1 aM đến cao hơn 1 nM, sẽ thay đổi tùy theo lịch dùng thuốc, điều kiện hoặc tình trạng của đối tượng, v.v.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 10 đến 21;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn khớp bổ sung gồm 9 mer với trình tự ARN 17 mer của [(5' → 3') CCUUGCCUGGUAAGGAA] trong tiền mARN của thụ thể androgen ở người;

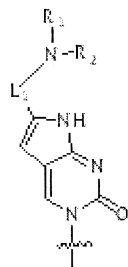
$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n độc lập đại diện cho gốc deuterido, hydrido, ankyl được thế hoặc không được thế, hoặc aryl được thế hoặc không được thế;

X và Y đại diện độc lập cho gốc hydrido [H], formyl [H-C(=O)-], aminocacbonyl [NH₂-C(=O)-], ankyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, ankylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, ankyloxycacbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxycacbonyl được thế hoặc không được thế, ankylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế, ankylsunphonyl được thế hoặc không được thế, hoặc arylsunphonyl được thế hoặc không được thế;

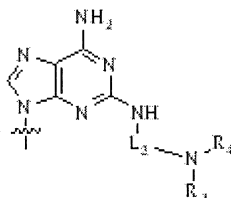
Z đại diện cho gốc hydrido, hydroxy, ankyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, amino được thế hoặc không được thế, ankyl được thế hoặc không được thế, hoặc aryl được thế hoặc không được thế;

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

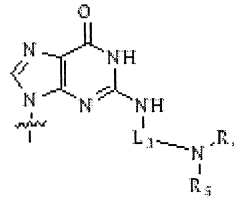
ít nhất ba trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được biểu diễn bởi Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV:



Công thức II



Công thức III

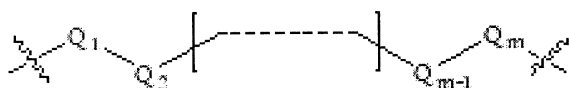


Công thức IV

trong đó:

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

L_1, L_2 và L_3 là chất liên kết cộng hóa trị được biểu diễn bởi Công thức V, liên kết cộng hóa trị nhóm amino cơ bản với nhóm nucleobazơ:



Công thức V

trong đó:

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

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

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

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

trong đó:

n là một số nguyên từ 10 đến 18;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn khớp bổ sung gồm 9 mer với trình tự ARN 17 mer $[(5' \rightarrow 3') \text{CCUUGCCUGGUAAGGAA}]$ trong tiền mARN AR 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 đại diện độc lập cho gốc hydrido, ankyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, ankylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, ankyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế, hoặc aryloxycarbonyl được thế hoặc không được thế;

Z đại diện cho gốc amino được thế hoặc không được thế;

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

ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được biểu diễn bởi 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 độc lập từ gốc hydrido, và ankyl được thế hoặc không được thế;

Q_1 và Q_m là gốc metylen được thế hoặc không được thế, và Q_m được liên kết trực tiếp với nhóm amino cơ bản;

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

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

Quan tâm đặc biệt là một dẫn xuất PNA của Công thức I, hoặc một loại muối được dụng của nó:

trong đó:

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 16;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn khớp bổ sung gồm 11 mer với trình tự tiền mARN AR 17 mer $[(5' \rightarrow 3') \text{CCUUGCCUGGUAAGGAA}]$ trong tiền mARN AR ở người;

hợp chất của Công thức I bổ sung hoàn toàn với trình tự tiền mARN trong tiền mARN AR 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 được lựa chọn độc lập từ gốc hydrido, ankylaxyl được thế hoặc không được thế, hoặc ankyloxycacbonyl được thế hoặc không được thế;

Z đại diện cho gốc amino được thế hoặc không được thế;

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

ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được biểu diễn bởi 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 độc lập từ gốc hydrido, và ankyl được thế hoặc không được thế;

Q_1 và Q_m là gốc metylen và Q_m được liên kết trực tiếp với nhóm amino cơ bản;

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

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 16;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn khớp bổ sung gồm 12 mer với trình tự ARN 17 mer của $[(5' \rightarrow 3') \text{CCUUGCCUGGUAAGGAA}]$ trong tiền mARN AR ở người;

hợp chất của Công thức I bổ sung hoàn toàn với trình tự tiền mARN trong tiền mARN AR 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 được lựa chọn độc lập từ gốc hydrido, ankylaxyl được thế hoặc không được thế, hoặc ankyloxycacbonyl được thế hoặc không được thế;

Z đại diện cho gốc amino được thế hoặc không được thế;

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

ít nhất năm trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được đại diện bởi 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 độc lập đại diện cho gốc hydrido, hoặc ankyl được thế hoặc không được thế;

Q_1 và Q_m là gốc metylen và Q_m được liên kết trực tiếp với nhóm amino cơ bản;

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

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 16;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn khớp bổ sung gồm 12 mer với trình tự ARN 17 mer của $[(5' \rightarrow 3') \text{CCUUGCCUGGUAAGGAA}]$ trong tiền mARN AR ở người;

hợp chất của Công thức I bổ sung hoàn toàn cho trình tự tiền mARN trong tiền mARN AR 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 được lựa chọn độc lập từ gốc hydrido, ankylaxyl được thế hoặc không được thế, hoặc ankyloxycacbonyl được thế hoặc không được thế;

Z đại diện cho gốc amino được thế hoặc không được thế;

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

ít nhất năm trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được biểu diễn bởi 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 cơ bản;

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

Quan tâm cao nhất là một dẫn xuất PNA của Công thức I, hoặc một loại muối được dụng của nó:

trong đó:

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 15;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn khớp bổ sung gồm 11 mer với trình tự ARN 17 mer của $[(5' \rightarrow 3') \text{CCUUGCCUGGUAAGGAA}]$ trong tiền mARN AR ở người;

hợp chất của Công thức I bổ sung hoàn toàn cho trình tự tiền mARN trong tiền mARN AR 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 đại diện cho gốc ankylaxyl được thế hoặc không được thế hoặc ankyloxycacbonyl được thế hoặc không được thế;

Z đại diện cho gốc amino được thế hoặc không được thế;

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

ít nhất năm trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được biểu diễn bởi 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 đại diện cho $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$, $-CH_2-O-(CH_2)_2-$, $-CH_2-O-(CH_2)_3-$, $-CH_2-O-(CH_2)_4-$, hoặc $-CH_2-O-(CH_2)_5-$ với đầu bên phải được liên kết trực tiếp với nhóm amino cơ bản; và,

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

Mỗi quan tâm đặc biệt là một dẫn xuất PNA của **Công thức I**, được chọn từ nhóm các hợp chất được cung cấp dưới đây, hoặc một loại muối được dụng của nó:

- (N → C) Fmoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Ac-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Benzoyl-GA(5)A-GC(1O2)C-A(2O2)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Piv-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Metyl-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) n-Propyl-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-Lys-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-Lys-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH₂
 (N → C) Fmoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH₂;
 (N → C) Fmoc-Gly-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-Lys-Gly-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH₂;
 (N → C) Fmoc-Val-Gly-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-GA(6)A-GC(1O2)C-A(6)GG-C(1O2)AA(6)-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-G(6)AA(5)-GC(1O3)C-A(7)GG(5)-CA(5)A-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-GA(5)A-GC(2O2)C-A(6)GG-C(1O5)AA(6)-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-TG(6)C(1O5)-GGA(6)-AG(6)C-CA(6)G-GC(1O2)A-A(6)GG(6)-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-Lys-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(6)CC-A(5)GG-C(1O3)AA(5)-G-Val-Lys-NH₂;

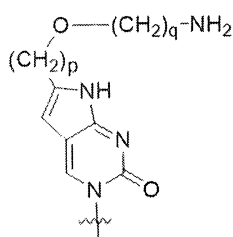
(N → C) Ac-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)TA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Piv-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) H-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) H-CTT-A(5)C(1O3)C-A(5)G(3)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) n-Propyl-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) n-Propyl-CTT-A(5)C(2O2)C-A(3)G(2O3)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) p-Toluensunphonyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(8)G(5)G-C(1O2)AA(5)-
 G-NH₂;
 (N → C) Benzoyl-Lys-Val-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-
 NH₂;
 (N → C) Benzoyl-CTT-A(5)C(1O5)C-A(5)G(2O2)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-Lys-Leu-CTT-A(5)C(1O2)C-A(2O2)GG-C(1O2)AA(5)-G-
 Lys-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O5)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GT-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)TA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)A(5)A-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-AG(5)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(7)GG-C(1O2)AA(3)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-CTT-A(5)C(1O2)C-A(5)GT-C(1O2)TA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-CTT-A(5)C(1O2)C-A(5)GT-C(1O2)TA(5)-G-Arg-NH₂;
 (N → C) Fethoc-TC(1O2)C-TTA(6)-CCA(6)-GGC(1O2)-AA(6)G-G(6)-
 NH₂;
 (N → C) Fethoc-TC(1O2)C-TTA(5)-CCA(5)-GGC(1O2)-AA(5)G-G(6)-
 NH₂;
 (N → C) Fethoc-GA(5)T-AC(1O2)C-A(5)GG(6)-CAA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-TA(5)C-CAG(6)-GC(1O2)A-A(5)GG(6)-C-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Benzyl-C(1O2)TT-A(2O2)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;
 (N → C) Phenyl-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(7)GG(5)-CA(5)A-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(6)GG(2O2)-CA(5)A-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-Val-Lys-NH₂;
 (N → C) Piv-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;
 (N → C) Fmoc-Lys-Val-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;
 (N → C) Ac-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;
 (N → C) H-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-Lys-NH₂;
 (N → C) Piv-Arg-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-Lys-NH₂;
 (N → C) N-Phenyl-N-metyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-
 Lys-NH₂;
 (N → C) [N-(2-Phenyletyl)amino]cacbonyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(4)G(5)G-
 C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Benzoyl-Leu-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-Lys-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O3)TT-A(5)CC-A(5)GG(5)-CA(5)A-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(6)CC-A(6)GG(6)-CA(6)A-NH₂;
 (N → C) Fethoc-TTT-TCC(1O2)-TTA(6)-CCA(6)-GG(6)C-A(6)A-NH₂;
 (N → C) Fethoc-TTT-TCC(1O2)-TTA(6)-CC(1O3)A(6)-G-Lys-NH₂;
 (N → C) Fethoc-TC(2O2)C-TTA(6)-CCA(6)-GG(6)C-A(6)A-NH₂;
 (N → C) Me-Gly-TC(2O2)C-TTA(6)-CCA(6)-GG(6)C-A(6)A-NH₂;
 (N → C) Fethoc-Lys-TTT-TCC(1O2)-TTA(6)-CCA(6)-GG(6)C-NH₂; và
 (N → C) Fethoc-Arg-TCC(1O2)-TTA(5)-CCA(6)-GG(5)C-Lys-NH₂:

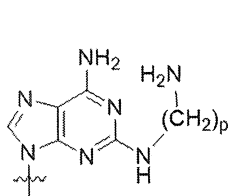
trong đó:

A, G, T và C là các monome PNA có nucleobazơ tự nhiên là adenin, guanin, timin và xytoxin tương ứng;

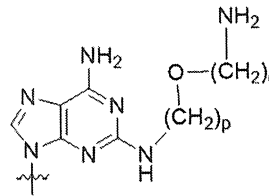
C(pOq), A(p), A(pOq), G(p) và G(pOq) là các monome PNA có nucleobazơ không tự nhiên được biểu diễn bởi Công thức VI, Công thức VII, Công thức VIII, Công thức IX và Công thức X, tương ứng;



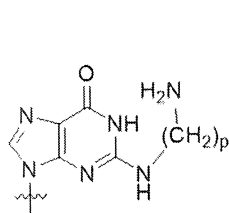
Công thức VI



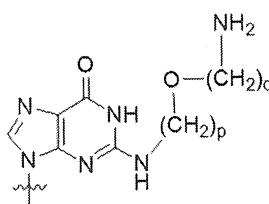
Công thức VII



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 đầu C được mô tả cụ thể như sau:
 "Fmoc-" là tên viết tắt của "[(9-florenyl)metyloxy]cacbonyl-"; "Fethoc-" cho "[2-(9-florenyl)etyl-1-oxy]cacbonyl-"; "Ac-" cho "axetyl-"; "Benzoyl-" cho "benzencabonyl-"; "Piv-" cho "pivalyl-"; "Metyl-" cho "metyl-"; "n-Propyl-" cho "1-(n-propyl)-"; "H-" cho nhóm "hydrido-"; "p-Toluensunphonyl" cho "(4-metylbenzen)-1-sunphonyl-"; "-Lys-" cho gốc amino axit "lysin"; "-Val-" cho gốc amino axit "valin"; "-Leu-" cho gốc amino axit "leuxin"; "-Arg-" cho gốc amino axit "arginin"; "-Gly-" cho gốc amino axit "glyxin"; "[N-(2-Phenyletyl)amino]cacbonyl-" cho "[N-1-(2-phenyletyl)amino]cacbonyl-"; "Benzyl-" cho "1-(phenyl)metyl-"; "Phenyl-" cho "phenyl-"; "Me-" cho "metyl-"; và "-NH₂" cho nhóm "-amino" không được thế.

Hình 3 cung cấp một cách tổng hợp và rõ ràng 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 giải pháp kỹ thuật trước đây [PCT/KR2009/001256], C(pOq) được coi là một monome PNA "xytotoxin biến tính" do quá trình lai của nó với "guanin". A(p) và A(pOq) được coi là các monome PNA "adenin biến tính" do quá trình lai của chúng với "timin". Tương tự như vậy G(p) và G(pOq) được coi là các monome PNA "guanin biến tính" do sự bắt cặp của chúng với "xytotoxin".

Hình 4 minh họa một cách rõ ràng các cấu trúc hóa học cho một loạt các chữ viết tắt cho các nhóm thế được sử dụng để đa dạng hóa đầu N hoặc đầu C của dẫn xuất PNA của Công thức I trong sáng chế.

Để minh họa các chữ viết tắt cho các dẫn xuất PNA, cấu trúc hóa học cho dẫn xuất PNA được viết tắt là "(N $\rightarrow$ C) Fethoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂" được cung cấp trong Hình 5(A). Theo một minh họa khác, cấu trúc hóa học cho dẫn xuất PNA được viết tắt là "(N $\rightarrow$ C) Benzoyl-Lys-Val-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂" được cung cấp trong Hình 5(B).

Trình tự PNA 13 mer "(N $\rightarrow$ C) Fethoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂" tương đương với trình tự ADN "(5' $\rightarrow$ 3') GAA-GCC-AGG-CAA-G" trong liên kết bổ sung của nó với tiền mARN. PNA 13 mer có đoạn khớp bổ sung gồm 9 mer với trình tự 9 mer được đánh dấu "in đậm" và "gạch chân" trong trình tự ARN 20 mer [(5' $\rightarrow$ 3') GCCUUGCCUG | g"uaag"gaaaa] trải dài qua đoạn nối của "exon 5" và "intron 5" trong tiền mARN AR ở người. Cần lưu ý rằng bốn sự bắt cặp sai đơn lẻ trong "intron 5" được đánh dấu là "uaag".

Trình tự PNA 13 mer "(N $\rightarrow$ C) Benzoyl-Lys-Val-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂" tương đương với trình tự ADN "(5' $\rightarrow$ 3') CTT-ACC-AGG-CAA-G", có đoạn khớp bổ sung gồm 13 mer với trình tự 13 mer được đánh dấu "in đậm" và "gạch chân" trong trình tự ARN 20 mer [(5' $\rightarrow$ 3')

GCCUUGCCUG | guaaggaaaa] trải dài qua đoạn nối của "exon 5" và "intron 5" trong tiền mARN AR ở người.

Trình tự PNA 13 mer "(N → C) Ac-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)TA(5)-G-NH₂" tương đương với trình tự ADN của "(5' → 3') CTT-ACC-AGG-CTA-G", có đoạn khớp bổ sung gồm 12 mer với trình tự 12 mer được đánh dấu "in đậm" và "gạch chân" trong trình tự ARN 20 mer [(5' → 3') GCCU"U"GCCUG | guaaggaaaa] trải dài qua đoạn nối của "exon 5" và "intron 5" trong tiền mARN AR ở người. Cần lưu ý rằng sự bắt cặp sai đơn lẻ trong exon 5 được đánh dấu là "U".

Trình tự PNA 17 mer "(N → C) Fethoc-TTT-TCC(1O2)-TTA(6)-CCA(6)-GG(6)C-A(6)A-NH₂" tương đương với trình tự ADN "(5' → 3') TTT-TCC-TTA-CCA-GGC-AA", có đoạn khớp bổ sung gồm 17 mer với trình tự 17 mer được đánh dấu "in đậm" và "gạch chân" trong trình tự ARN 20 mer [(5' → 3') GCCUUGCCUG | guaaggaaaa] trải dài qua đoạn nối của "exon 5" và "intron 5" trong tiền mARN AR ở người.

Sáng chế này cung cấp một dẫn xuất PNA của Công thức I, được chọn từ nhóm các hợp chất được ưu tiên đặc biệt được liệt kê dưới đây, hoặc một loại muối được dụng của nó:

- (N → C) Fmoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
- (N → C) Fethoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
- (N → C) Fmoc-GA(6)A-GC(1O2)C-A(6)GG-C(1O2)AA(6)-G-NH₂;
- (N → C) Fmoc-G(6)AA(5)-GC(1O3)C-A(7)GG(5)-CA(5)A-G-NH₂;
- (N → C) Fmoc-GA(5)A-GC(2O2)C-A(6)GG-C(1O5)AA(6)-G-NH₂;
- (N → C) Fethoc-TG(6)C(1O2)-GGA(6)-AG(6)C-CA(6)G-GC(1O2)A-A(6)GG(6)-NH₂;
- (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(6)CC-A(5)GG-C(1O3)AA(5)-G-Val-Lys-NH₂;

(N → C) Ac-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)TA(5)-G-NH₂;

(N → C) Piv-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;

(N → C) H-CTT-A(5)C(1O3)C-A(5)G(3)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;

(N → C) n-Propyl-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;

(N → C) n-Propyl-CTT-A(5)C(2O2)C-A(3)G(2O3)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;

(N → C) p-Toluensunphonyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(8)G(5)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;

(N → C) Benzoyl-CTT-A(5)C(1O5)C-A(5)G(2O2)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;

(N → C) Fethoc-Lys-Leu-CTT-A(5)C(1O2)C-A(2O2)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH₂;

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O5)AA(5)-G-NH₂;

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(7)GG-C(1O2)AA(3)-G-NH₂;

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

(N → C) Fethoc-TC(1O2)C-TTA(6)-CCA(6)-GGC(1O2)-AA(6)G-G(6)-NH₂;

(N → C) Fethoc-TC(1O2)C-TTA(5)-CCA(5)-GGC(1O2)-AA(5)G-G(6)-NH₂;

(N → C) Fethoc-GA(5)T-AC(1O2)C-A(5)GG(6)-CAA(5)-G-NH₂;

(N → C) Fethoc-TA(5)C-CAG(6)-GC(1O2)A-A(5)GG(6)-C-NH₂;

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(7)GG(5)-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(6)GG(2O2)-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Piv-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Ac-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;

(N → C) N-Phenyl-N-metyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH₂;

(N → C) [N-(2-Phenylethyl)amino]cacbonyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(4)G(5)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(6)CC-A(6)GG(6)-CA(6)A-NH₂;

(N → C) Fethoc-TTT-TCC(1O2)-TTA(6)-CCA(6)-GG(6)C-A(6)A-NH₂;

(N → C) Fethoc-TTT-TCC(1O2)-TTA(6)-CC(1O3)A(6)-G-Lys-NH₂; và

(N → C) Fethoc-TC(2O2)C-TTA(6)-CCA(6)-GG(6)C-A(6)A-NH₂.

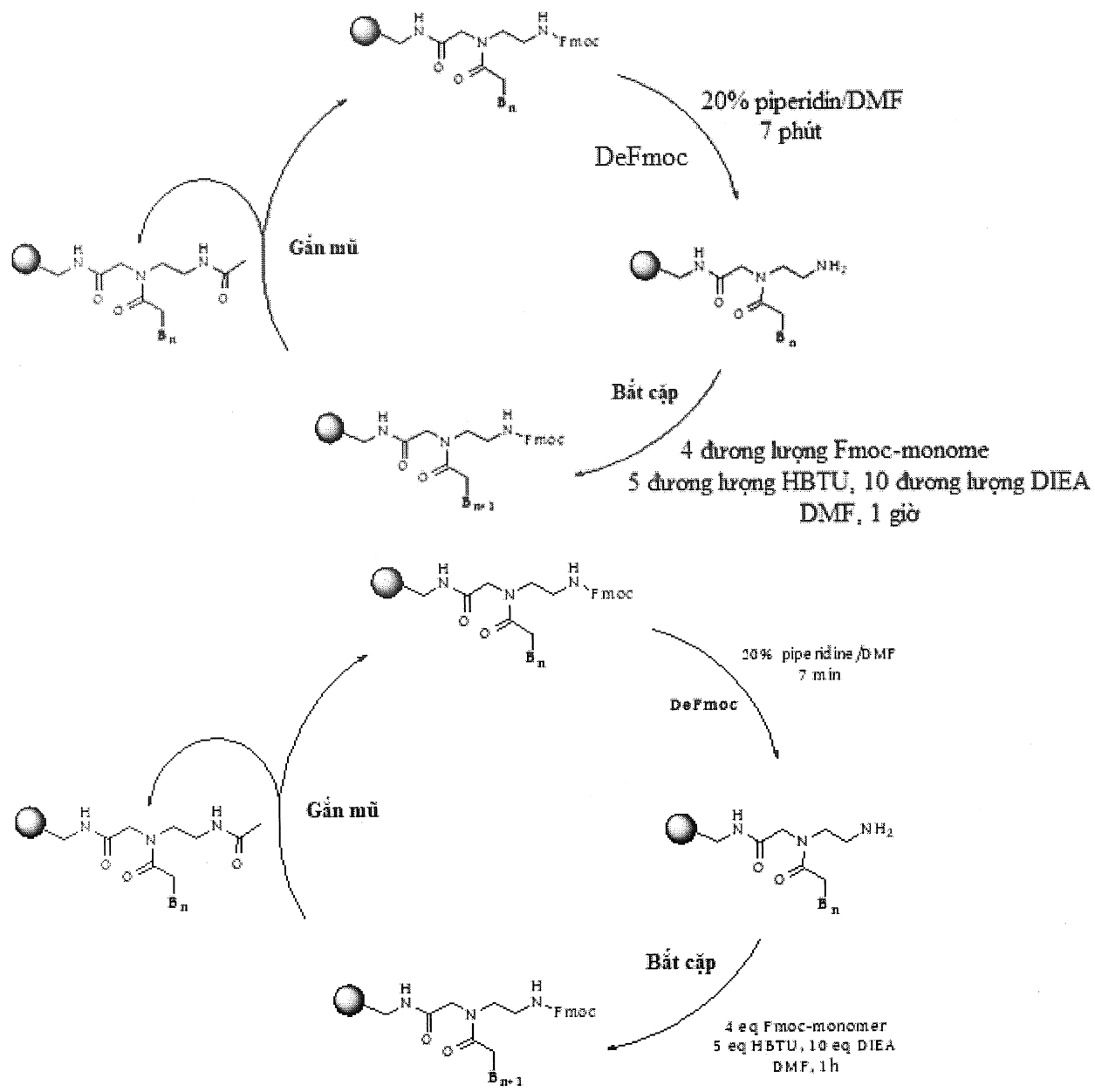
Mô tả chi tiết sáng chế

Quy trình chung để điều chế oligome PNA

Các oligome PNA được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp peptit pha rắn (SPPS) dựa trên hóa học Fmoc theo phương pháp được công bố trong giải pháp kỹ thuật trước đó [US6,133,444; WO96/40685] với các sửa đổi nhỏ nhưng hợp lý. Giá đỡ rắn được sử dụng trong nghiên cứu này là H-Rink Amide-ChemMatrix được mua từ PCAS BioMatrix Inc. (Quebec, Canada). Các monome Fmoc-PNA với nucleobazơ biến tính đã được tổng hợp như mô tả trong giải pháp kỹ thuật trước đây [PCT/KR 2009/001256] hoặc với các sửa đổi nhỏ. Các monome Fmoc-PNA này với một nucleobazơ biến tính và các monome Fmoc-PNA với nucleobazơ tự nhiên đã được sử dụng để tổng hợp các dẫn xuất PNA của sáng chế. Các oligome PNA được tinh chế bằng HPLC pha đảo C₁₈ (nước/axetonitril hoặc nước/metanol với TFA 0,1%) và được xác định bởi phương pháp khối phổ.

Sơ đồ 1 minh họa một chu kỳ kéo dài monome điển hình thông qua SPPS của sáng chế này và các chi tiết về quy trình được cung cấp dưới đây. Tuy nhiên, đối với một người có kỹ năng trong lĩnh vực này, rất nhiều biến thể nhỏ rõ ràng là có thể chạy hiệu quả các phản ứng SPPS trên bộ tổng hợp peptit tự động hoặc tổng hợp peptit thủ công. Mỗi bước phản ứng trong Sơ đồ 1 được cung cấp ngắn gọn như sau.

Sơ đồ 1



[Hoạt hóa keo H-Rink-ChemMatrix] 0,01 mmol (ca 20 mg keo) của keo ChemMatrix trong 1,5 ml piperidin/DMF 20% được trộn trong ống libra trong 20 phút và dung dịch DeFmoc được lọc. 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

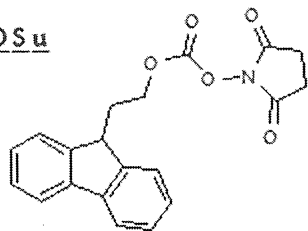
DMF và 1,5 mL MC. Các amin tự do thu được trên giá đỡ rắn đã được bắt cặp với một monome Fmoc-PNA hoặc với một dẫn xuất amino axit được bảo vệ bởi Fmoc.

[DeFmoc] Keo được trộn trong 1,5 ml piperidin/DMF 20% trong 7 phút và dung dịch DeFmoc được lọc. 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 giá đỡ rắn ngay lập tức bắt cặp với một monome Fmoc-PNA.

[Bắt cặp với monome Fmoc-PNA] Các amin tự do trên giá đỡ rắn được bắt cặp với một monome Fmoc-PNA như sau. 0,04 mmol monome PNA, 0,05 mmol HBTU và 10 mmol DIEA 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. Các cấu trúc hóa học của các monome Fmoc-PNA với một nucleobazơ biến tính được sử dụng trong sáng chế này được cung cấp trong Hình 6. Các monome Fmoc-PNA có nucleobazơ biến tính được cung cấp trong Hình 6 nên được lấy làm ví dụ, và do đó không nên được sử dụng để giới hạn phạm vi của sáng chế. Một người có tay nghề cao trong lĩnh vực này có thể dễ dàng tìm ra một số biến thể trong các monome Fmoc-PNA để tổng hợp dẫn xuất PNA có công thức I.

[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 (anhydrit 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" theo cơ chế bắt cặp cơ bản. Cấu trúc hóa học của "Fethoc-OSu" [CAS No. 179337-69-0, $C_{20}H_{17}NO_5$, MW 351.36] được cung cấp như sau.

Fethoc-OSu

[Sự phân tách từ keo] Các oligome PNA liên 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. Phần dư được xử lý 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 dẫn xuất PNA được tinh chế bằng HPLC pha đảo C₁₈ tách nước/acetonitril hoặc nước/metanol (phương pháp gradient) chứa TFA 0,1%. Hình 7(A) và 7(B) là sắc ký đồ HPLC mẫu cho "ASO 1" trước và sau khi tinh chế HPLC, tương ứng. Trình tự oligome của "ASO 1" được cung cấp trong Bảng 1.

Ví dụ tổng hợp cho các dẫn xuất PNA của công thức I

Các dẫn xuất PNA của sáng chế này được điều chế theo các quy trình tổng hợp được cung cấp ở trên hoặc với các sửa đổi nhỏ. Bảng 1 cung cấp các ví dụ về các ASO AR của sáng chế cùng với dữ liệu đặc tính cấu trúc bằng phép đo phổ khối. Cung cấp các ASO AR trong Bảng 1 là để minh họa các dẫn xuất PNA có Công thức I, và không nên diễn giải để giới hạn phạm vi của sáng chế.

Bảng 1. Các dẫn xuất PNA của Công thức I và xác định cấu trúc bằng phép đo phổ khối.

Ví dụ PNA	Trình tự PNA (N → C)	Khối lượng chính xác, m/z
-----------	----------------------	---------------------------

		lý thuyết ^a	quan sát ^b
ASO 1	Fmoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH ₂	4317,91	4317,96
ASO 2	Fethoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH ₂	4331,93	4331,97
ASO 3	Fmoc-TG(6)C(1O2)-GGA(6)-AG(6)C-CA(6)G-GC(1O2)A-A(6)GG(6)-NH ₂	6047,80	6047,76
ASO 4	Fmoc-GA(6)A-GC(1O2)C-A(6)GG-C(1O2)AA(6)-G-NH ₂	4359,96	4356,96
ASO 5	Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH ₂	4257,90	4257,92
ASO 6	Fethoc-TC(1O2)C-TTA(6)-CCA(6)-GGC(1O2)-AA(6)G-G(6)-NH ₂	5207,37	5207,42
ASO 7	Fethoc-TC(1O2)C-TTA(5)-CCA(5)-GGC(1O2)-AA(5)G-G(6)-NH ₂	5165,32	5165,31
ASO 8	Fethoc-GA(5)T-AC(1O2)C-A(5)GG(6)-CAA(5)-G-NH ₂	4308,97	4308,98
ASO 9	Fethoc-TA(5)C-CAG(6)-GC(1O2)A-A(5)GG(6)-C-NH ₂	4283,97	4283,96
ASO 10	Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH ₂	3968,85	3968,86
ASO 11	Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(6)GG(6)-CA(5)A-NH ₂	3982,86	3982,88
ASO 12	Ac-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH ₂	3774,77	3774,83
ASO 13	Fethoc-C(1O2)TT-A(6)CC-A(6)GG(6)-CA(6)A-NH ₂	4010,89	4010,93

ASO 14	H-CTT-A(5)C(1O3)C-A(5)G(3)G-C(1O2)AA(5)-G-NH ₂	4092,89	4092,90
ASO 15	Benzoyl-CTT-A(5)C(1O5)C-A(5)G(2O2)G-C(1O2)AA(5)-G-NH ₂	4254,96	4254,99
ASO 16	n-Propyl-CTT-A(5)C(2O2)C-A(3)G(2O3)G-C(1O2)AA(5)-G-NH ₂	4150,93	4150,93
ASO 17	p-Toluensunphonyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(8)G(5)G-C(1O2)AA(5)-G-NH ₂	4302,96	4302,90
ASO 18	Fethoc-Lys-Leu-CTT-A(5)C(1O2)C-A(2O2)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH ₂	4629,16	4629,16
ASO 19	Fethoc-CTT-A(5)C(1O2)C-A(5)GT-C(1O2)TA(5)-G-NH ₂	4223,88	4223,93
ASO 20	N-Phenyl-N-metyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH ₂	4239,96	4240,00
ASO 21	[N-(2-Phenyletyl)amino]cacbonyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(4)G(5)G-C(1O2)AA(5)-G-NH ₂	4239,96	4239,95

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

Ái lực liên kết của PNA với ADN bổ sung 10 mer

Các dẫn xuất PNA trong Bảng 1 đã được đánh giá về ái lực liên kết của chúng đối với các ADN 10 mer nhắm đích bổ sung vào hoặc đầu N hoặc đầu C. Ái lực liên kết được đánh giá bằng giá trị T_m cho sự bắt cặp giữa PNA và ADN bổ sung 10 mer. Sự bắt cặp giữa các dẫn xuất PNA trong Bảng 1 và ADN bổ sung hoàn toàn cho thấy giá trị T_m quá cao để được xác định một cách đáng tin cậy trong dung dịch đệm chứa 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 oligome PNA 4 μ M và ADN 10mer bổ sung 4 μ M trong 4 mL dung dịch đệm chứa nước (pH 7,16, Natri Photphat 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 trong vài phút. Sau đó, dung dịch được chuyển vào một cuvet UV thạch anh 3 mL được trang bị nắp đậy kín khí, và chịu phép đo T_m ở bước sóng 260nm trên máy đo quang phổ UV/nhìn thấy được Agilent 8453 hoặc máy tương tự như được mô tả trong giải pháp kỹ thuật trước đây [PCT/KR2009/001256] hoặc với những sửa đổi nhỏ. Các ADN bổ sung 10 mer dùng cho phép đo T_m đã được mua từ Bioneer (www.bioneer.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 rất cao đối với liên kết bổ sung với ADN 10 mer và được cung cấp trong Bảng 2. Ví dụ: "ASO 5" cho thấy giá trị T_m là 86,1°C đối với việc bắt cặp với ADN bổ sung 10 mer nhắm đích đầu N 10 mer trong PNA được đánh dấu là "in đậm" và "gạch chân" trong [(N $\rightarrow$ C) Fethoc-**C(102)TT-A (5)CC-A(5)GG-C(102)AA(5)-G-NH₂**]. Trong khi đó, "ASO 5" cho thấy T_m bằng 81,3°C đối với việc bắt cặp với ADN bổ sung 10 mer nhắm đích đầu C 10 mer trong PNA được đánh dấu là "in đậm" và "gạch chân" trong [(N $\rightarrow$ C) Fethoc-C(102)TT-**A(5)CC-A(5)GG-C(102)AA(5)-G-NH₂**].

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

PNA	Giá trị T_m , °C	
	ADN 10 mer với đầu N	ADN 10 mer với đầu C
ASO 5	86,1	81,3

ASO 8	87,4	86,0
ASO 9	84,3	84,5
ASO 10	84,4	78,4
ASO 13	83,0	87,0

Ví dụ cho hoạt tính sinh học của các dẫn xuất PNA của công thức I

Các dẫn xuất PNA của Công thức I được đánh giá về hoạt tính sinh học của chúng trong ống nghiệm (in vitro) và trong cơ thể sống (in vivo). Các ví dụ sinh học được cung cấp dưới đây được cung cấp làm ví dụ để minh họa các cấu hình sinh học của các dẫn xuất PNA này của **Công thức I**, và do đó không nên được giải thích để giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1. Bỏ qua Exon gây ra bởi "ASO 5".

"ASO 5" được chỉ định trong Bảng 1 là oligonucleotit antisense 13 mer có đoạn khớp bổ sung hoàn toàn 13 mer với trình tự 13 mer được đánh dấu là "in đậm" và "gạch chân" trong trình tự ARN 20 mer [(5' → 3') GCCUUGCCUG | guaaggaaaa] trải dài qua đoạn nối của "exon 5" và "intron 5" trong tiền mARN AR ở người.

"ASO 5" được đánh giá bằng kỹ thuật PCR dạng lồng AR về khả năng gây ra sự bỏ qua AR "exon 5" trong các tế bào MCF7 (Cat. Number: HTB-22, ATCC). Các quy trình thực hiện được mô tả chi tiết như sau.

[Nuôi cấy tế bào & xử lý ASO] Tế bào MCF7 được nuôi trong môi trường EMEM bổ sung FBS 10%, streptomycin/penicillin 1% , và insulin bò 0,01 mg/ml trong môi trường khí CO₂ 5% ở 37°C. Các tế bào đã được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm trước khi xử lý bằng "ASO 5" ở 3 aM đến 3 fM.

[Trích xuất ARN] Các tế bào MCF7 được ủ với sự có mặt hoặc không có mặt của "ASO 5" trong 3 giờ. ARN tổng số được chiết xuất từ các tế bào trong đĩa cấy

60 mm bằng kit “Universal ARN Extraction Kit” (Cat. No. 9767, Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

[Tổng hợp cADN bằng PCR một bước] 100 ng của mẫu ARN được sử dụng trong 25 μ L dung dịch phản ứng phiên mã ngược sử dụng kit Super Script® One-Step RT-PCR với polymeraza platinum® Taq (Cat. No. 10.928-042, Invitrogen) để tương tác với bộ môi đặc hiệu gen [từ exon 3 trở đi: (5' $\rightarrow$ 3') TGGGTGTCACCTATGGAGC và từ exon 9 ngược lại: (5' $\rightarrow$ 3') GGGTGT-GGAAATAGATGGG] theo các điều kiện chu kỳ sau: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, tiếp theo là 39 chu kỳ 30 giây tại 94°C, 30 giây tại 55°C và 1 phút ở 72°C.

[Khuếch đại PCR dạng lồng] Trong suốt quá trình khuếch đại, một kỹ thuật khuếch đại duy nhất đã được sử dụng (thay đổi khi tăng nhiệt độ ủ trên mỗi chu kỳ) hoạt động hiệu quả và rõ ràng trong một phạm vi nhiệt độ, thay vì ở một nhiệt độ ủ duy nhất (ví dụ phương pháp PCR thông thường). 1 μ L của cADN đã được khuếch đại trong 20 μ L dung dịch phản ứng PCR dạng lồng (Invitrogen) tương tác với một bộ môi [exon 3 trở đi: (5' $\rightarrow$ 3') TGGGTG-TCACTATGGAGC và từ exon 7 ngược lại: (5' $\rightarrow$ 3') GGGGTGATTTGGAGCCAT] theo các điều kiện chu kỳ sau: 10 chu kỳ ban đầu [94°C trong 30 giây, 47°C trong 40 giây (+0,5°C mỗi chu kỳ), 72°C trong 40 giây], sau đó là 20 chu kỳ [94°C trong 30 giây, 50°C trong 30 giây và 72°C trong 40 giây].

[Nhận diện các sản phẩm bỏ qua Exon] Các sản phẩm PCR đã được phân tách điện di trên gel agarose 2%. Các dải có kích thước mục tiêu được thu thập và phân tích bởi phương pháp giải trình tự Sanger. Trong Hình 8(A), có ba dải sản phẩm PCR liên quan đến điều trị có thể là các sản phẩm cắt nối mARN AR thiếu "exon 5". "ASO 5" đã được thấy là gây ra sự bỏ qua "exon 5", "exon 4-5" và "exon 4-6", mặc dù tỷ lệ của các sản phẩm bỏ qua dường như phụ thuộc vào nồng độ ASO. Hình 8(B) cung

cấp dữ liệu giải trình tự thực tế cho dải bỏ qua của "exons 4-5" trong Hình 8(A) làm ví dụ cho phương pháp giải trình tự Sanger.

Ví dụ 2. Đánh giá qPCR cho mức độ mARN AR trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "ASO 5".

"ASO 5" được đánh giá về khả năng làm giảm lượng mARN AR ở người bằng qPCR bằng sự nhận biết SYBR Green.

Các tế bào MCF7 được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy 5 ml trong đĩa nuôi cấy 60 mm và được xử lý hoặc với "ASO 5" ở 0 zM (đối chứng âm) đến 1 aM (2 đĩa nuôi cấy cho mỗi nồng độ). 5 giờ sau, ARN tổng số được chiết xuất bằng "MiniBEST Universal RNA Extraction Kit" theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Cat. No. 9767, Takara). 500 ng mẫu ARN đã được sử dụng để tổng hợp cADN cho 50 μ L dung dịch phản ứng phiên mã ngược bằng cách sử dụng Oligo-dT theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Cat. No. 6110A, Takara). Sau đó, cADN đã được áp dụng cho PCR lần 1 tương tác với một bộ môi từ "exon 3" đến "exon 9" [Exon 3_trở đi: (5' $\rightarrow$ 3') TGGGTGTCACTATGGAGC và Exon 9_ngược lại: (5' $\rightarrow$ 3') GGGTG-TGGAAATAGAT-GGG] theo các điều kiện chu kỳ sau: 94°C trong 2 phút, tiếp theo là 15 chu kỳ 15 giây tại 94°C, 30 giây tại 55°C, và 2 phút ở 72°C.

Các sản phẩm PCR lần 1 được pha loãng 2000 lần, và 1 μ L của mỗi sản phẩm PCR được pha loãng để thành 20 μ L dung dịch phản ứng PCR Real-Time tương tác với các bộ môi đặc hiệu exon [Exon 4_trở đi(q): (5' $\rightarrow$ 3') GACCATGTTTTGCCCATG và Exon 4_ngược lại(q): (5' $\rightarrow$ 3') GGCTCTTTTGAAGAAGACC cho exon 4; Exon 5_trở đi(q): (5' $\rightarrow$ 3') GAAACAGAAGTA-CCTGTGC và Exon 5_ngược lại(q): (5' $\rightarrow$ 3') GTCATCCCTGCTTCATAAC cho exon 5; và Exon 6_trở đi(q): (5' $\rightarrow$ 3')]

CGGAAGCTGAAGAACTTG và Exon 6 ngược lại(q): (5' → 3') CACTTGACCACGTGTACAAG cho exon 6]. Các phản ứng PCR được theo dõi bởi SYBR Green (Takara, Nhật Bản). Điều kiện chu kỳ: 95°C trong 3 phút tiếp theo là 40 chu kỳ 5 giây ở 95°C, và 30 giây tại 60°C.

Hình 9(A) cung cấp dữ liệu qPCR thu được từ đó. Mức độ biểu hiện tương đối của exon 4-6 giảm đáng kể khi nồng độ ASO được tăng từ 0 zM lên 100 zM. Ở 100 zM, mức độ biểu hiện exon giảm khoảng 50 đến 60%. Tuy nhiên, ở mức 1 aM, các mức biểu hiện exon đã tăng trở lại gần mức đối chứng âm (không xử lý ASO). Kiểu đáp ứng liều lượng của dữ liệu qPCR có thể là do sự điều hòa phiên mã bởi "ARN dạng vòng exon intron (EIciARN)" được tích lũy trong quá trình bỏ qua exon với "ASO 5". [*Nature Struc. Mol. Biol.* vol 22(3), 256-264 (2015)]

Ví dụ 3. Đánh giá qPCR về mức độ mARN AR trong các tế bào MCF được xử lý bằng "ASO 1".

Mặc dù "ASO 1" được chỉ định trong Bảng 1 là một oligonucleotit antisense 13 mer ban đầu được thiết kế để nhắm mục tiêu bổ sung vào đoạn nối của "exon 5" và "exon 6" trong mARN AR ở người. "ASO 1" có đoạn khớp bổ sung 9 mer với trình tự 9 mer như đánh dấu "in đậm" và "gạch chân" trong trình tự ARN 20 mer [(5' → 3') GCCUUGCCUG | g"uaag"ga³aa] kéo dài qua đoạn nối của "exon 5" và "intron 5" trong tiền mARN AR ở người. Cần lưu ý rằng bốn sự bắt cặp sai trong intron 5 được đánh dấu là "uaag". Do đó, "ASO 1" có thể được coi là một oligonucleotit antisense nhắm đích vào tiền mARN AR ở người, mặc dù chỉ với đoạn khớp bổ sung 9 mer trong trình tự 13 mer.

"ASO 1" được đánh giá về khả năng làm giảm mARN AR ở người bằng qPCR theo quy trình được mô tả trong "Ví dụ 2".

Hình 9(B) cung cấp dữ liệu qPCR thu được từ đó. Mức độ biểu hiện tương đối của "exon 4-6" giảm đáng kể khi nồng độ ASO được tăng từ 0 zM lên 100 zM. Ở mức 100 zM, mức độ biểu hiện của exon giảm hơn 80%. Tuy nhiên, ở mức 1 aM, mức

biểu hiện exon đã tăng trở lại khoảng 60% đối với đối chứng âm (không xử lý ASO). Kiểu đáp ứng liều lượng của dữ liệu qPCR có thể là do sự điều hòa phiên mã bởi "ARN dạng vòng exon intron (EIciARN)" được tích lũy trong quá trình bỏ qua exon với "ASO 5". [*Nature Struc. Mol. Biol.* vol 22(3), 256-264 (2015)]

Ví dụ 4. Đánh giá qPCR về mức độ mARN AR trong các tế bào MCF được xử lý bằng "ASO 10".

"ASO 10" được chỉ định trong Bảng 1 là oligonucleotit antisense 12 mer có đoạn khớp bổ sung hoàn toàn 12 mer với trình tự 12 mer như được đánh dấu "in đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền mARN 20 mer [(5'→ 3') GCCUUGCCUG | guaaggaaaa] trải dài qua đoạn nối "exon 5" và "intron 5" của tiền mARN AR ở người.

"ASO 10" được đánh giá về khả năng làm giảm mARN AR ở người (chiều dài đầy đủ) bằng qPCR theo quy trình được mô tả trong "Ví dụ 2".

Hình 9(C) cung cấp dữ liệu qPCR thu được từ đó. Mức biểu hiện tương đối của "exon 4-6" giảm đáng kể 60 ~ 80% trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "ASO 10" ở mức từ 1 zM lên 1.000 zM.

Ví dụ 5. Phân tích Western Blot về việc làm giảm AR bằng "ASO 1".

Các tế bào MCF7 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa 5 ml dung dịch nuôi cấy và được xử lý bằng "ASO 1" ở 0 zM (đối chứng âm) hoặc 100 zM đến 300 aM. 4 đĩa nuôi cấy đã được sử dụng cho 4 đối chứng âm. 48 giờ sau, các tế bào được rửa 2 lần bằng PBS lạnh, và sau đó được phân giải với 200 µL dung dịch đệm phân giải tế bào 1X (Cat. No. 9803, Cell Signaling Tech) bổ sung với chất ức chế proteaza 1X (Cat. No. P8340, Sigma). Các sản phẩm phân giải được thu thập trong ống e 1,5 ml. 200 µL của mỗi sản phẩm phân giải được trộn với 100 µL dung dịch đệm mẫu 3X và đun sôi trong 5 phút ở 100°C. 20 µL của mỗi sản phẩm phân giải (tổng cộng 12 sản phẩm phân giải). 4 mẫu đối chứng âm và 8 mẫu xử lý ASO đã được phân tách điện di trên gel SDS-PAGE 8%, và được chuyển vào màng PVDF

0,2 μm . Màng được gắn đầu dò với kháng thể kháng AR (Cat. No. 5153, Cell Signaling Tech) và kháng thể kháng β -actin (Cat. No. sc4778, Santa Cruz). Hình 10(A) cung cấp dữ liệu AR Western blot thu được từ đó. Nhiều mẫu đối chứng (âm) đã được sử dụng để khắc phục các giả lập kỹ thuật của quy trình western blot. Ngoại trừ dải AR cho "đối chứng 4" (âm), cường độ dải AR của các sản phẩm phân giải khi xử lý ASO yếu hơn đáng kể so với các sản phẩm phân giải không được xử lý ASO, điều này chỉ ra một cách dứt khoát rằng "ASO 1" ức chế sự biểu hiện của protein AR chiều dài đầy đủ trong các tế bào MCF7.

Ví dụ 6. Phân tích Western Blot về khả năng làm giảm AR bằng "ASO 5".

"ASO 5" được đánh giá về khả năng ức chế biểu hiện protein AR ở mức 10 μM đến 30 μM trong các tế bào MCF7 theo các quy trình được mô tả trong "Ví dụ 5".

Hình 10(B) cung cấp dữ liệu AR Western blot thu được với các tế bào MCF7 được xử lý bằng "ASO 5" ở 0 μM (đối chứng âm, không xử lý ASO) hoặc 10 μM đến 30 μM . Nhiều mẫu đối chứng (âm) đã được sử dụng để khắc phục các giả lập kỹ thuật của quy trình western blot. Cường độ dải AR của các sản phẩm phân giải với xử lý ASO là yếu hơn đáng kể so với các sản phẩm phân giải bên cạnh mà không xử lý ASO, điều đó rõ ràng chỉ ra rằng "ASO 1" ức chế sự biểu hiện của protein AR chiều dài đầy đủ trong các tế bào MCF7.

Ví dụ 7. Sự mọc lông được thúc đẩy bởi sự tiếp nhận tại chỗ "ASO 1" trong Chuột.

"ASO 1" được đánh giá về khả năng thúc đẩy mọc lông ở những con chuột C57BL/6 khi sử dụng tại chỗ như sau. Trình tự đích của "ASO 1" trong tiền mARN AR ở người được bảo tồn trong tiền mARN AR của chuột. Do đó, kết quả điều trị in vivo ở chuột có thể được ngoại suy cho các trường hợp ở người mà không có nhiều sự nhập nhằng.

[Cạo lông và phân nhóm] Vào ngày 0, những con chuột cái C57BL/6 7 tuần tuổi đã được gây mê bằng zoletil/rompun, và lông ở phía sau được cắt và loại bỏ lần

lượt bằng kẹp và sáp. Những con chuột với việc cạo lông hoàn hảo (tức là không tỉ vết) đã được chọn và được phân ngẫu nhiên thành ba nhóm (7 con cho mỗi nhóm).

[Sử dụng tại chỗ] Các dung dịch tại chỗ của "ASO 1" đã được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch gốc "ASO 1" thành 0,2 fM hoặc 1 fM trong dung dịch ethanol chứa nước 30% (theo thể tích) được bổ sung glyxerin 3% (theo thể tích). Khoảng 100 μ L của "ASO 1" 0 (đối chứng âm), 0,2 hoặc 1 fM được sử dụng tại chỗ ở phía lưng mỗi con vật bằng cách sử dụng một quả bóng bông trong Ngày 3, 7, 10 và 14.

[Ghi điểm ảnh kỹ thuật số cho sự phát triển của lông] Để ghi điểm cho sự phát triển của lông, các con vật được gây mê và chụp ảnh theo nhóm như trong Hình 11(A) bằng máy ảnh kỹ thuật số với giá trị cố định về thời gian phơi sáng và chiếu sáng. Hình ảnh kỹ thuật số cho khu vực cạo lông cho từng con vật đã được chọn và ghi điểm kỹ thuật số cho độ sáng trung bình trên khu vực được chọn bằng chương trình "ImageJ". Điểm sáng thấp hơn được ghi lại khi lông mọc nhanh hơn. Điểm sáng của từng con vật được nhóm lại, và được phân tích thống kê bằng t-test. Hình 11(B) tổng hợp điểm sáng tương đối của các nhóm được xử lý ASO so với nhóm đối chứng. Điểm sáng tương đối có xu hướng giảm theo ngày trong các nhóm xử lý. Trong ngày 13, nhóm 1 fM có điểm sáng thấp hơn đáng kể so với nhóm không được điều trị. Do đó, "ASO 1" đã được kết luận là có khả năng thúc đẩy sự phát triển của lông khi sử dụng tại chỗ tại 1 fM.

[Ghi điểm theo trọng lượng lông] Vào ngày 21, các con vật đã được gây mê và lông ở phía lưng được cắt bằng kẹp. Các mẫu lông từ các con vật riêng lẻ được kết hợp theo nhóm và được cân để đánh giá sự phát triển lông giữa các Ngày 0 và Ngày 21. Trọng lượng lông trung bình là 70,5 mg/con đối với nhóm đối chứng, 90,8 mg/con đối với nhóm xử lý thuốc 0,2 fM và, 94,4 mg/con đối với nhóm xử lý thuốc 1 fM. Do đó, "ASO 1" đã được kết luận là thúc đẩy sự phát triển của lông khi sử dụng tại chỗ ở mức 0,2 fM cũng như 1 fM.

[IHC AR của mẫu da] Sau khi cạo lông vào ngày 21, những con chuột đã được tiếp nhận một lần điều trị tại chỗ duy nhất của tá dược lỏng hoặc "ASO 1" theo nhóm. Vào ngày 24, da của khu vực cạo lông được lấy mẫu để phân tích hóa mô miễn dịch (IHC) chống lại thụ thể androgen. Các mẫu da được cắt lạnh và được tiêm miễn dịch hàng loạt với kháng thể kháng AR sơ cấp (Cat. No. sc-816, Santa Cruz) với tỷ lệ pha loãng 1:100, với kháng thể kháng IgG thứ cấp (Cat. No. BA-1100, Vector) ở độ pha loãng 1:200, và sau đó với Dylight 594-steptavidin (Cat No. SA-5594, Vector, CA, USA) ở độ pha loãng 1:200 để gắn nhãn huỳnh quang màu đỏ. Hình ảnh IHC được chụp trên kính hiển vi huỳnh quang Olympus về sự thay đổi trong mức độ biểu hiện AR khi điều trị tại chỗ bằng "ASO 1".

Hình 12 là một bộ ảnh đại diện IHC AR chứng minh rằng biểu hiện AR trong nang lông bị ức chế rõ rệt ở nang lông khi sử dụng thuốc "ASO 1" tại chỗ ở nồng độ 0,2 fM hoặc 1 fM. Các hình ảnh nhuộm DAPI được cung cấp để xác định vị trí các nang lông trong các hình ảnh IHC. Thật thú vị khi nhận thấy rằng biểu hiện AR đã giảm ngay cả trong lớp cơ bên dưới lớp hạ bì khi sử dụng tại chỗ "ASO 1" ở mức 0,2 fM hoặc 1 fM. Do đó, "ASO 1" dễ dàng được đưa vào lớp hạ bì cũng như lớp cơ bên dưới lớp hạ bì khi sử dụng tại chỗ, và có khả năng ức chế sự biểu hiện của AR.

Ví dụ 8. Sự tăng trưởng của lông được thúc đẩy bởi sử dụng tại chỗ "ASO 5" trong chuột.

"ASO 5" được đánh giá về khả năng thúc đẩy sự tăng trưởng của lông ở những con chuột C57BL/6 khi sử dụng tại chỗ như chi tiết dưới đây. Trình tự đích của "ASO 5" trong tiền mARN AR ở người được bảo tồn trong tiền mARN AR ở chuột. Do đó, kết quả điều trị in vivo ở chuột có thể được ngoại suy cho các trường hợp ở người mà không có nhiều sự mơ hồ.

[Cạo lông và phân nhóm] Vào ngày 0, những con chuột cái C57BL/6 7 tuần tuổi đã được gây mê bằng zoletil/rompun, và lông ở phía sau lưng được cắt và loại bỏ bằng kẹp và sáo, tương ứng. Những con chuột được cạo lông hoàn hảo (tức là

không tì vết) đã được chọn và được phân ngẫu nhiên thành ba nhóm (10 con trên mỗi nhóm).

[Sử dụng tại chỗ] Các dung dịch tại chỗ của "ASO 5" đã được điều chế bằng cách pha loãng dung dịch gốc "ASO 5" thành 1, 5 hoặc 25 fM trong dung dịch etanol trong nước 30% (theo thể tích) được bổ sung glyxerin 3% (theo thể tích). Khoảng 100 μ L của mỗi dung dịch ASO hoặc tá dược lỏng (đối chứng âm) được sử dụng tại chỗ ở phía lưng động vật bằng cách sử dụng một quả bóng bông trong các ngày 3, 7, 10, 14 và 21.

[Ghi điểm hình ảnh kỹ thuật số cho sự tăng trưởng lông] Hình 13 tổng hợp điểm sáng tương đối của các nhóm được xử lý ASO so với nhóm đối chứng âm. Điểm sáng tương đối có xu hướng giảm theo ngày trong các nhóm xử lý ASO. Vào ngày 17, các nhóm xử lý 1 fM và 25 fM có điểm sáng thấp hơn đáng kể so với nhóm không xử lý. Do đó, "ASO 5" đã được kết luận là thúc đẩy sự phát triển của lông khi sử dụng tại chỗ tại 1 đến 25 fM.

[Ghi điểm theo trọng lượng lông] Vào ngày 21, các con vật đã được gây mê và lông ở phía lưng được cắt và thu thập. Các mẫu lông từ các động vật riêng lẻ được nhóm lại và được cân để đánh giá sự phát triển của lông giữa Ngày 0 và Ngày 21. Các nhóm điều trị mang lại sự gia tăng rõ rệt về trọng lượng lông so với nhóm đối chứng. Trọng lượng lông trung bình của các nhóm 1 fM, 5 fM, và 25 fM là 293%, 306% và 278% so với nhóm đối chứng âm, tương ứng. Do đó, "ASO 5" đã được kết luận là thúc đẩy sự phát triển của lông khi sử dụng tại chỗ tại 1 đến 25 fM.

Sau khi cạo lông vào ngày 21, các con vật đã được tiếp nhận một lần điều trị tại chỗ với tá dược lỏng hoặc "ASO 5" ở mức 1 fM, 5 fM hoặc 25 fM. Vào ngày 53, lông ở phía lưng được thu thập bằng cách cạo bằng máy xén để xác định tổng lượng lông mọc giữa ngày 21 và 53. Trọng lượng lông trung bình của các nhóm 1 fM, 5 fM và 25 fM lần lượt là 1.630%, 1.450% và 771% so với nhóm không được điều trị. Do đó, "ASO 5" đã được kết luận là thúc đẩy sự phát triển của lông khi sử dụng tại chỗ ở mức 1 đến 25 fM.

Ví dụ 9. Sự tăng trưởng của lông được thúc đẩy bằng cách sử dụng tại chỗ "ASO 10" trong Chuột.

"ASO 10" được đánh giá về khả năng thúc đẩy tăng trưởng lông ở những con chuột C57BL/6 khi sử dụng tại chỗ như chi tiết dưới đây. Trình tự đích của "ASO 10" trong tiền mARN AR ở người được bảo tồn trong tiền mARN AR của chuột. Do đó, kết quả điều trị in vivo ở chuột có thể được ngoại suy cho các trường hợp ở người mà không có nhiều sự mơ hồ.

[Cạo lông và phân nhóm] Vào ngày 0, những con chuột cái C57BL/6 7 tuần tuổi đã được gây mê bằng zoletil/rompun, và lông ở phía sau được cắt và loại bỏ bằng kẹp và sấp, tương ứng. Những con chuột với việc cạo lông hoàn hảo (tức là không tỉ vết) đã được chọn và được phân ngẫu nhiên thành ba nhóm (9 động vật mỗi nhóm).

[Sử dụng tại chỗ] Các dung dịch tại chỗ của "ASO 10" đã được điều chế bằng cách pha loãng dung dịch gốc "ASO 10" thành 1, 5 hoặc 25 fM trong dung dịch etanol trong nước 30% (theo thể tích) được bổ sung glycerin 3% (theo thể tích). Khoảng 10 μ L của mỗi dung dịch ASO hoặc tá dược lỏng (đối chứng âm) được tiêm tại chỗ ở phía lưng con vật bằng cách sử dụng một quả bóng bông trong Ngày 2.

[Ghi điểm hình ảnh kỹ thuật số cho sự phát triển của lông] Hình 14(A) tổng hợp điểm sáng tương đối của các nhóm được xử lý ASO so với nhóm đối chứng. Điểm sáng tương đối có xu hướng giảm theo ngày trong các nhóm được xử lý. Trong ngày 27, các nhóm xử lý 1 fM và 5 fM có điểm sáng thấp hơn đáng kể so với nhóm không xử lý. Do đó, "ASO 10" đã được kết luận là thúc đẩy sự phát triển của lông khi sử dụng tại chỗ ở mức 1 đến 5 fM.

[Ghi điểm theo trọng lượng lông] Vào ngày 27, các con vật đã được gây mê và lông ở phía sau được cắt và thu thập. Các mẫu lông từ các con vật riêng lẻ được kết hợp theo nhóm và được cân để đánh giá sự phát triển của lông giữa Ngày 0 và Ngày 27. Các nhóm xử lý mang lại sự gia tăng khiêm tốn về trọng lượng lông so với

nhóm đối chứng p. Trọng lượng lông trung bình của các nhóm 1 fM, 5 fM và 25 fM là 115%, 114% và 119% so với nhóm không được điều trị, tương ứng. Do đó, "ASO 10" đã được kết luận là thúc đẩy sự phát triển của lông khi sử dụng tại chỗ tại 1 đến 25 fM.

[Hóa mô miễn dịch AR của các mẫu da] Sau khi cắt lông vào ngày 27, các con vật được tiếp nhận tại chỗ tá được lông hoặc "ASO 10" tại 1, 5 hoặc 25 fM trong các ngày 27 và 29. Các mẫu da của lưng được thu thập trong Ngày 30 để phân tích hóa mô miễn dịch chống lại thụ thể androgen. Các mẫu da đã được miễn dịch chống lại thụ thể androgen như được mô tả trong "Ví dụ 7". Hình ảnh IHC được chụp trên máy quét slide Zeiss. Hình 14(B) là một bộ đại diện của hình ảnh IHC AR. Thật thú vị khi nhận thấy rằng số lượng nang lông tăng rõ rệt trong các nhóm xử lý ASO so với nhóm đối chứng âm. Thật khó để nói rõ rằng biểu hiện AR ở nang lông giảm trong các nhóm xử lý do sự gia tăng rõ rệt số lượng nang lông trong các nhóm xử lý. Tuy nhiên, biểu hiện AR ở lớp cơ bên dưới lớp hạ bì giảm rõ rệt ở các nhóm xử lý so với nhóm đối chứng. Sự giảm đáng chú ý nhất được quan sát thấy với nhóm xử lý 5 fM. Kết hợp các phát hiện IHC ở con vật được xử lý bằng "ASO 10", "ASO 10" thúc đẩy sự phát triển của lông bằng cách ức chế sự biểu hiện AR để tăng số lượng nang lông ở tất cả các liều thử nghiệm, đáng chú ý nhất là ở 5 fM.

Ví dụ 10. Đánh giá qPCR về mức độ mARN AR bằng xét nghiệm TaqMan trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "ASO 10".

"ASO 10" được đánh giá về khả năng làm giảm mARN AR ở người bằng cách qPCR sử dụng đầu dò TaqMan.

Các tế bào MCF7 được nuôi cấy trong 5 ml môi trường nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm và được xử lý hoặc với "ASO 10" ở 0 zM (đối chứng âm) đến 1 aM (2 đĩa nuôi cấy cho mỗi nồng độ). 24 giờ sau, ARN tổng số được trích xuất bằng "MiniBEST Universal RNA Extraction Kit" theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Cat. No. 9767, Takara).

400 ng mẫu ARN đã được sử dụng để tổng hợp cADN cho 20 μ L dung dịch phản ứng phiên mã ngược bằng cách sử dụng bộ kit RT-PCR một bước (Invitrogen) tương tác với một tập hợp các đoạn mồi đặc hiệu exon của [exon 3_trở đi: (5' $\rightarrow$ 3') TGGGTGTCACCTATGGAGC; và exon 9_ngược lại: (5' $\rightarrow$ 3') GGGTGTGGAAATAGATGGG] theo các điều kiện chu kỳ sau: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, tiếp theo là 15 chu kỳ 30 giây tại 94°C, 30 giây tại 50°C, và 1 phút ở 72°C.

Các dung dịch cADN đã được pha loãng 50 lần và 1 μ L mỗi sản phẩm PCR được pha loãng được cho vào 20 μ L dung dịch phản ứng PCR Real-Time để tương tác với một bộ mồi đặc hiệu exon của [exon 4_trở đi: (5' $\rightarrow$ 3')TTGTCCATCTTGTCGTCCTT và exon 5_ngược lại: (5' $\rightarrow$ 3') CCTCTCCTTCCTCCTGTA] theo các điều kiện chu kỳ sau: 95°C trong 3 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ 15 giây tại 95°C, và 30 giây tại 60°C. Phản ứng qPCR được theo dõi bằng đầu dò TaqMan của [(5' $\rightarrow$ 3') TTTCTTCAG-ZEN-CTTCCGGGCTC-3IABkFQ].

Hình 15 cung cấp dữ liệu qPCR thu được từ đó. Mức độ biểu hiện tương đối của exon 4-6 giảm đáng kể khoảng 50 đến 70% trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "ASO 10" ở mức 1 zM đến 1 aM.

Ví dụ 11. Sự làm giảm mức biểu hiện AR bằng IHC trong Chuột được tiêm dưới da với "ASO 10".

"ASO 10" được đánh giá về khả năng ức chế biểu hiện AR ở chuột như sau.

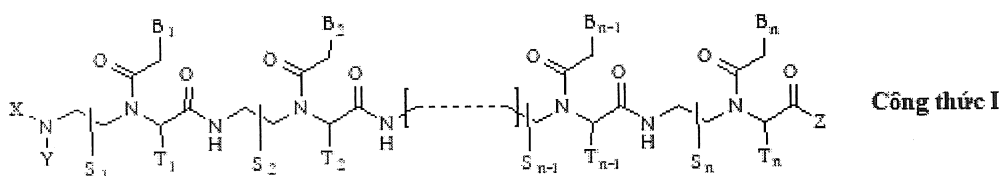
Những con chuột đực C57BL/6 12 tuần tuổi được phân ngẫu nhiên vào 3 nhóm đối chứng âm (không xử lý ASO), "ASO 10" 0,01 pmol/Kg và ASO 10" 0,1 pmol/Kg". (3 con trên mỗi nhóm) Những con chuột được tiêm dưới da hoặc tá được lỏng hoặc ASO hòa tan trong tá được lỏng (PBS) 2X mỗi tuần trong 4 tuần theo nhóm dùng thuốc. Ba ngày sau khi dùng liều cuối cùng, các con vật đã được gây mê bằng zoletil/rompun và được lấy mẫu mô hoặc nội tạng để lấy IHC AR bởi khối parafin.

Protein AR đã được gắn đầu dò hàng loạt với một kháng thể sơ cấp (Cat. No. sc-816, Santa Cruz) với tỷ lệ pha loãng 1:100, kháng thể IgG kháng thử thứ cấp (Cat. No. BA-1100, VECTOR) với tỷ lệ pha loãng 1:200 và Dylight 594-Streptavidin (Cat. No. SA-5594, VECTOR) với tỷ lệ 1:200. Nhân được nhuộm bằng DAPI. Hình ảnh huỳnh quang IHC được chụp trên máy quét slide Zeiss.

Hình 16 cung cấp hình ảnh IHC AR (màu đỏ) thu được với các mô được biết là biểu hiện protein AR dồi dào. Cần lưu ý rằng hình ảnh IHC được cung cấp dưới dạng đồng xuất hiện với DAPI (màu xanh). Khi tiếp xúc dưới da mãn tính với "ASO 10", biểu hiện AR giảm rõ rệt ở lớp biểu bì ở vị trí tiêm, gan, tinh hoàn và tuyến tiền liệt khi liều ASO tăng từ 0,01 pmol/Kg lên 0,1 pmol/Kg. Do đó, "ASO 10" ức chế một cách rõ ràng sự biểu hiện protein AR ở chuột khi tiếp xúc hệ thống.

Yêu cầu bảo hộ

1. Dẫn xuất axit nucleic peptit được đại diện bởi Công thức I, hoặc muối được dụng của nó:



trong đó:

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 10 đến 21;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn khớp bổ sung 9 mer với trình tự ARN 17 mer của $[(5' \rightarrow 3') \text{CCUUGCCUGGUAAGGAA}]$ trong tiền mARN của thụ thể androgen ở người;

hợp chất của Công thức I bổ sung hoàn toàn cho tiền mARN của thụ thể androgen ở người hoặc bổ sung một phần cho tiền mARN của thụ thể androgen ở người với một hoặc hai sự bất cặp sai;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n độc lập đại diện cho gốc deuterido, hydrido, ankyl được thế hoặc không được thế, hoặc aryl được thế hoặc không được thế;

X và Y đại diện độc lập cho gốc hydrido $[H]$, formyl $[H-C(=O)-]$, aminocarbonyl $[NH_2-C(=O)-]$, ankyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, ankylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, ankyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxycarbonyl được thế hoặc không được thế, ankylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, ankylsunphonyl được thế hoặc không được thế, hoặc arylsunphonyl được thế hoặc không được thế;

Z đại diện cho gốc hydrido, hydroxy, ankyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, amino được thế hoặc không được thế, ankyl được thế hoặc không được thế, hoặc aryl được thế hoặc không được thế;

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

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

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 21;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn khớp bổ sung 9 mer với trình tự ARN 17 mer của $[(5' \rightarrow 3') \text{CCUUGCCUGGUAAGGAA}]$ trong tiền mARN của thụ thể androgen ở người;

hợp chất của Công thức I bổ sung hoàn toàn cho tiền mARN của thụ thể androgen ở người hoặc bổ sung một phần cho tiền mARN của thụ thể androgen ở người với một hoặc hai sự bất cặp sai;

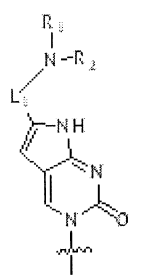
$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n độc lập đại diện cho gốc deuterido, hydrido, ankyl được thế hoặc không được thế, hoặc aryl được thế hoặc không được thế ;

X và Y đại diện độc lập cho gốc hydrido $[H]$, formyl $[H-C(=O)-]$, aminocacbonyl $[NH_2-C(=O)-]$, ankyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, ankylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, ankyloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, ankylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, ankylsunphonyl được thế hoặc không được thế, hoặc arylsunphonyl được thế hoặc không được thế;

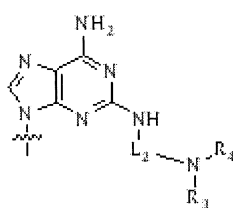
Z đại diện cho gốc hydrido, hydroxy, ankyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, amino được thế hoặc không được thế, ankyl được thế hoặc không được thế, hoặc aryl được thế hoặc không được thế;

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

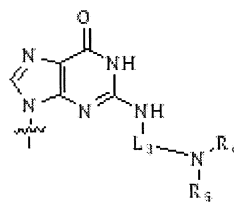
ít nhất ba trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được biểu diễn bởi Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV :



Công thức II



Công thức III

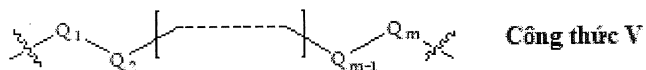


Công thức IV

trong đó:

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

L_1, L_2 và L_3 là liên kết cộng hóa trị được biểu diễn bởi Công thức V tạo liên kết cộng hóa trị giữa nhóm amin cơ bản với gốc nucleobazơ:



Công thức V

trong đó:

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

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

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

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

trong đó:

n là một số nguyên từ 10 đến 18;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn khớp bổ sung 9 mer với trình tự ARN 17 mer của [(5' $\rightarrow$ 3') CCUUGCCUGGUAAGGAA] trong tiền mARN AR ở người;

hợp chất có công thức I bổ sung hoàn toàn cho tiền mARN của thụ thể androgen ở người, hoặc bổ sung một phần cho tiền mARN của thụ thể androgen ở người với một hoặc hai sự 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 đại diện độc lập cho gốc hydrido, ankyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, ankylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, ankyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế, hoặc aryloxycarbonyl được thế hoặc không được thế;

Z đại diện cho gốc amino được thế hoặc không được thế;

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

ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được biểu diễn bởi 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 độc lập từ gốc hydrido, và ankyl được thế hoặc không được thế;

Q_1 và Q_m là gốc metylen được thế hoặc không được thế, và Q_m được liên kết trực tiếp với nhóm amino cơ bản;

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

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

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 16;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn khớp bổ sung 11 mer với trình tự tiền mARN AR 17 mer của $[(5' \rightarrow 3') \text{CCUUGCCUGGUAAGGAA}]$ trong tiền mARN AR người;

hợp chất của Công thức I bổ sung hoàn toàn với trình tự tiền mARN trong tiền mARN AR 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 được lựa chọn độc lập từ gốc hydrido, ankylaxyl được thế hoặc không được thế, hoặc ankyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế;

Z đại diện cho gốc amino được thế hoặc không được thế;

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

ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được đại diện bởi 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 độc lập từ gốc hydrido, và ankyl được thế hoặc không được thế;

Q_1 và Q_m là gốc metylen và Q_m được liên kết trực tiếp với nhóm amino cơ bản;

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

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 16;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn khớp bổ sung 12 mer với trình tự ARN 17 mer của $[(5' \rightarrow 3') \text{CCUUGCCUGGUAAGGAA}]$ trong tiền mARN AR ở người;

hợp chất của Công thức I bổ sung hoàn toàn với trình tự tiền mARN trong tiền mARN AR 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 được lựa chọn độc lập từ gốc hydrido, ankylaxyl được thế hoặc không được thế, hoặc ankyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế;

Z đại diện cho gốc amino được thế hoặc không được thế;

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

ít nhất năm trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được đại diện bởi 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 đại diện độc lập cho gốc hydrido, hoặc ankyl được thế hoặc không được thế;

Q_1 và Q_m là gốc metylen và Q_m được liên kết trực tiếp với nhóm amino cơ bản;

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

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 16;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn khớp bổ sung 12 mer với trình tự ARN 17 mer của $[(5' \rightarrow 3') \text{CCUUGCCUGGUAAGGAA}]$ trong tiền mARN AR người;

hợp chất của Công thức I bổ sung hoàn toàn với trình tự tiền mARN trong tiền mARN AR 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 được lựa chọn độc lập từ gốc hydrido, ankylaxyl được thế hoặc không được thế, hoặc ankyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế;

Z đại diện cho gốc amino được thế hoặc không được thế;

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

ít nhất năm trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được đại diện bởi 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 cơ bản;

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

m là một số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 8.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm trong khoảng từ 11 đến 15;

hợp chất của Công thức I sở hữu ít nhất một đoạn khớp bổ sung 12 mer với trình tự ARN 17 mer của $[(5' \rightarrow 3') \text{CCUUGCCUGGUAAGGAA}]$ trong tiền mARN AR người;

hợp chất của Công thức I bổ sung hoàn toàn với trình tự tiền mARN trong tiền mARN AR 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 đại diện cho gốc ankylaxyl được thế hoặc không được thế hoặc ankyloxycacbonyl được thế hoặc không được thế;

Z đại diện cho gốc amino được thế hoặc không được thế;

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

ít nhất năm trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được đại diện bởi 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 đại diện cho $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$, $-CH_2-O-(CH_2)_2-$, $-CH_2-O-(CH_2)_3-$, $-CH_2-O-(CH_2)_4-$, hoặc $-CH_2-O-(CH_2)_5-$ với đầu bên phải được liên kết trực tiếp với nhóm amino cơ bản; và,

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

8. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó hợp chất có công thức I bổ sung hoàn toàn cho trình tự tiền mARN trong tiền mARN của thụ thể androgen ở người.

9. Dẫn xuất axit nucleic peptit được chọn từ nhóm các dẫn xuất axit nucleic peptit được cung cấp dưới đây, hoặc muối được dụng của nó:

$(N \rightarrow C) \text{ Fmoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH}_2$;

$(N \rightarrow C) \text{ Fethoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH}_2$;

$(N \rightarrow C) \text{ Ac-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH}_2$;

$(N \rightarrow C) \text{ Benzoyl-GA(5)A-GC(1O2)C-A(2O2)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH}_2$;

$(N \rightarrow C) \text{ Piv-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH}_2$;

$(N \rightarrow C) \text{ Metyl-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH}_2$;

(N → C) n-Propyl-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-Lys-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-Lys-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH₂
 (N → C) Fmoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH₂;
 (N → C) Fmoc-Gly-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-Lys-Gly-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-
 NH₂;
 (N → C) Fmoc-Val-Gly-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-
 NH₂;
 (N → C) Fmoc-GA(6)A-GC(1O2)C-A(6)GG-C(1O2)AA(6)-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-G(6)AA(5)-GC(1O3)C-A(7)GG(5)-CA(5)A-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-GA(5)A-GC(2O2)C-A(6)GG-C(1O5)AA(6)-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-TG(6)C(1O5)-GGA(6)-AG(6)C-CA(6)G-GC(1O2)A-
 A(6)GG(6)-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-Lys-
 NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(6)CC-A(5)GG-C(1O3)AA(5)-G-Val-Lys-
 NH₂;
 (N → C) Ac-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)TA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Piv-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) H-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) H-CTT-A(5)C(1O3)C-A(5)G(3)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) n-Propyl-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) n-Propyl-CTT-A(5)C(2O2)C-A(3)G(2O3)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) p-Toluensunphonyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(8)G(5)G-C(1O2)AA(5)-
 G-NH₂;

(N → C) Benzoyl-Lys-Val-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;

(N → C) Benzoyl-CTT-A(5)C(1O5)C-A(5)G(2O2)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;

(N → C) Fethoc-Lys-Leu-CTT-A(5)C(1O2)C-A(2O2)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH₂;

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O5)AA(5)-G-NH₂;

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

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

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)A(5)A-G-NH₂;

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-AG(5)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(7)GG-C(1O2)AA(3)-G-NH₂;

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

(N → C) Fethoc-CTT-A(5)C(1O2)C-A(5)GT-C(1O2)TA(5)-G-Arg-NH₂;

(N → C) Fethoc-TC(1O2)C-TTA(6)-CCA(6)-GGC(1O2)-AA(6)G-G(6)-NH₂;

(N → C) Fethoc-TC(1O2)C-TTA(5)-CCA(5)-GGC(1O2)-AA(5)G-G(6)-NH₂;

(N → C) Fethoc-GA(5)T-AC(1O2)C-A(5)GG(6)-CAA(5)-G-NH₂;

(N → C) Fethoc-TA(5)C-CAG(6)-GC(1O2)A-A(5)GG(6)-C-NH₂;

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Benzyl-C(1O2)TT-A(2O2)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Phenyl-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(7)GG(5)-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(6)GG(2O2)-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-Val-Lys-NH₂;

(N → C) Piv-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Fmoc-Lys-Val-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;

(N → C) Ac-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;

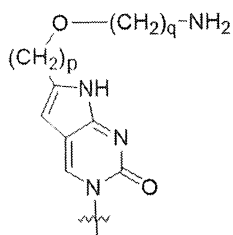
$(N \rightarrow C) \text{ H-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-Lys-NH}_2$;
 $(N \rightarrow C) \text{ Piv-Arg-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-Lys-NH}_2$;
 $(N \rightarrow C) \text{ N-Phenyl-N-metyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH}_2$;
 $(N \rightarrow C) \text{ [N-(2-Phenyletyl)amino]cacbonyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(4)G(5)G-C(1O2)AA(5)-G-NH}_2$;
 $(N \rightarrow C) \text{ Benzoyl-Leu-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-Lys-NH}_2$;
 $(N \rightarrow C) \text{ Fethoc-C(1O3)TT-A(5)CC-A(5)GG(5)-CA(5)A-NH}_2$;
 $(N \rightarrow C) \text{ Fethoc-C(1O2)TT-A(6)CC-A(6)GG(6)-CA(6)A-NH}_2$;
 $(N \rightarrow C) \text{ Fethoc-TTT-TCC(1O2)-TTA(6)-CCA(6)-GG(6)C-A(6)A-NH}_2$;
 $(N \rightarrow C) \text{ Fethoc-TTT-TCC(1O2)-TTA(6)-CC(1O3)A(6)-G-Lys-NH}_2$;
 $(N \rightarrow C) \text{ Fethoc-TC(2O2)C-TTA(6)-CCA(6)-GG(6)C-A(6)A-NH}_2$;
 $(N \rightarrow C) \text{ Me-Gly-TC(2O2)C-TTA(6)-CCA(6)-GG(6)C-A(6)A-NH}_2$;
 $(N \rightarrow C) \text{ Fethoc-Lys-TTT-TCC(1O2)-TTA(6)-CCA(6)-GG(6)C-NH}_2$;
 $(N \rightarrow C) \text{ Fethoc-TG(6)C(1O2)-GGA(6)-AG(6)C-CA(6)G-GC(1O2)A-A(6)GG(6)-NH}_2$; và

$(N \rightarrow C) \text{ Fethoc-Arg-TCC(1O2)-TTA(5)-CCA(6)-GG(5)C-Lys-NH}_2$:

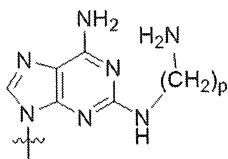
trong đó:

A, G, T và C là các monome PNA có nucleobazơ tự nhiên là adenin, guanin, timin và xytoxin tương ứng;

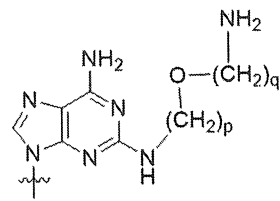
C(pOq), A(p), A(pOq), G(p), và G(pOq) là các monome PNA có nucleobazơ không tự nhiên được đại diện bởi Công thức VI, Công thức VII, Công thức VIII, Công thức IX và Công thức X, tương ứng;



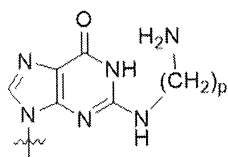
Công thức VI



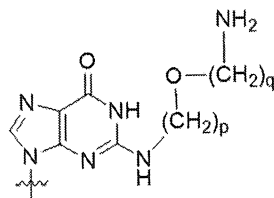
Công thức VII



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 đầu C được mô tả cụ thể như sau: "Fmoc-" là tên viết tắt của "[(9-florenyl)metyloxy]cacbonyl-"; "Fethoc-" cho "[2-(9-florenyl)etyl-1-oxy]cacbonyl-"; "Ac-" cho "axetyl-"; "Benzoyl-" cho "benzencacbonyl-"; "Piv-" cho "pivalyl-"; "Metyl-" cho "metyl-"; "n-Propyl-" cho "1-(n-propyl)-"; "H-" cho nhóm "hydrido-"; "p-Toluensunphonyl" cho "(4-metylbenzen)-1-sunphonyl-"; "-Lys-" đối với gốc amino axit "lysin"; "-Val-" cho gốc amino axit "valin"; "-Leu-" cho gốc amino axit "leuxin"; "-Arg-" đối với gốc amino axit "arginin"; "-Gly-" đối với gốc amino axit "glyxin"; "[N-(2-Phenyletyl)amino]cacbonyl-" cho "[N-1-(2-phenyletyl)amino]cacbonyl-"; "Benzyl-" cho "1-(phenyl)metyl-"; "Phenyl-" cho "phenyl-"; "Me-" cho "metyl-"; và "-NH₂" cho nhóm "-amino" không được thế.

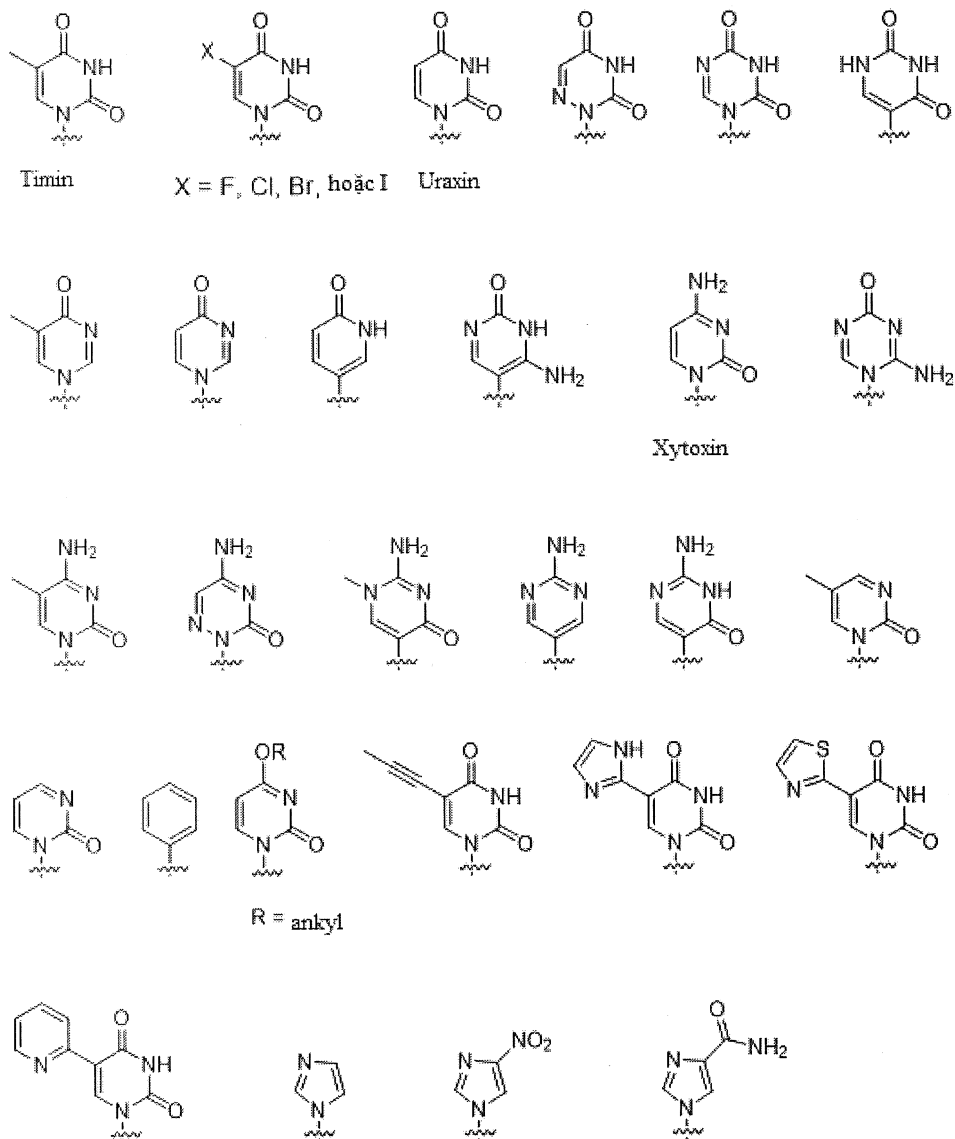
10. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm 9, được chọn từ nhóm các hợp chất được cung cấp dưới đây, hoặc một loại muối được dụng của chúng:

(N → C) Fmoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-GA(5)A-GC(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-GA(6)A-GC(1O2)C-A(6)GG-C(1O2)AA(6)-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-G(6)AA(5)-GC(1O3)C-A(7)GG(5)-CA(5)A-G-NH₂;
 (N → C) Fmoc-GA(5)A-GC(2O2)C-A(6)GG-C(1O5)AA(6)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-TG(6)C(1O2)-GGA(6)-AG(6)C-CA(6)G-GC(1O2)A-A(6)GG(6)-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(6)CC-A(5)GG-C(1O3)AA(5)-G-Val-Lys-NH₂;
 (N → C) Ac-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)TA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Piv-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) H-CTT-A(5)C(1O3)C-A(5)G(3)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) n-Propyl-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) n-Propyl-CTT-A(5)C(2O2)C-A(3)G(2O3)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) p-Toluensunphonyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(8)G(5)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Benzoyl-CTT-A(5)C(1O5)C-A(5)G(2O2)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-Lys-Leu-CTT-A(5)C(1O2)C-A(2O2)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(1O5)AA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(7)GG-C(1O2)AA(3)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-CTT-A(5)C(1O2)C-A(5)GT-C(1O2)TA(5)-G-NH₂;
 (N → C) Fethoc-TC(1O2)C-TTA(6)-CCA(6)-GGC(1O2)-AA(6)G-G(6)-NH₂;
 (N → C) Fethoc-TC(1O2)C-TTA(5)-CCA(5)-GGC(1O2)-AA(5)G-G(6)-NH₂;
 (N → C) Fethoc-GA(5)T-AC(1O2)C-A(5)GG(6)-CAA(5)-G-NH₂;

- (N → C) Fethoc-TA(5)C-CAG(6)-GC(1O2)A-A(5)GG(6)-C-NH₂;
- (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;
- (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(7)GG(5)-CA(5)A-NH₂;
- (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(6)GG(2O2)-CA(5)A-NH₂;
- (N → C) Piv-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;;
- (N → C) Ac-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A-NH₂;
- (N → C) N-Phenyl-N-metyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH₂;
- (N → C) [N-(2-Phenyletyl)amino]cacbonyl-CTT-A(5)C(1O2)C-A(4)G(5)G-C(1O2)AA(5)-G-NH₂;
- (N → C) Fethoc-C(1O2)TT-A(6)CC-A(6)GG(6)-CA(6)A-NH₂;
- (N → C) Fethoc-TTT-TCC(1O2)-TTA(6)-CCA(6)-GG(6)C-A(6)A-NH₂;
- (N → C) Fethoc-TTT-TCC(1O2)-TTA(6)-CC(1O3)A(6)-G-Lys-NH₂; và
- (N → C) Fethoc-TC(2O2)C-TTA(6)-CCA(6)-GG(6)C-A(6)A-NH₂.

Hình 1

(A) Ví dụ về các nucleobazo (biến tính) tự nhiên hoặc không tự nhiên có thể được chọn làm dẫn xuất axit nucleic peptit của **Công thức I**.



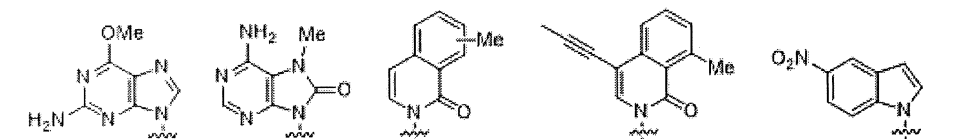
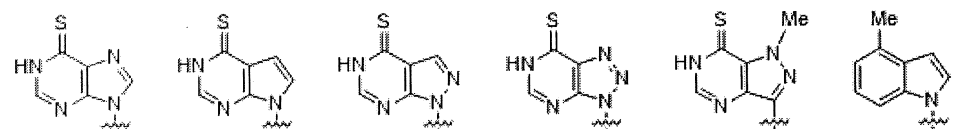
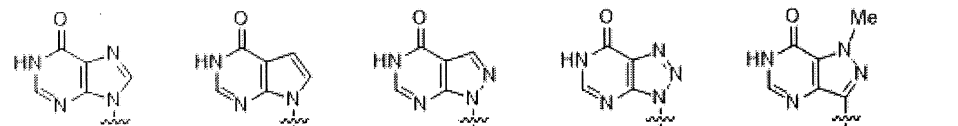
(tiếp tục từ trang trước)

Chemical structures of nucleoside derivatives:

- 2-aminoadenosine
- 2-aminoguanosine
- 2-amino-2-methylguanosine
- 2-aminoadenine
- 2-amino-2-methyladenine

The figure displays five chemical structures of nucleoside analogs, each consisting of a pyrimidine ring fused to a five-membered heterocyclic ring. The pyrimidine ring has an amino group (H₂N) at position 2 and a carbonyl group (C=O) at position 4. The five-membered ring is fused at positions 6 and 7 of the pyrimidine ring. The structures are:

- 2-aminobenzimidazole (leftmost): The five-membered ring is an imidazole ring with a nitrogen atom at position 9.
- 2-aminobenzoxazole: The five-membered ring is an oxazole ring with an oxygen atom at position 9.
- 2-aminobenzothiazole: The five-membered ring is a thiazole ring with a sulfur atom at position 9.
- 2-aminobenzotriazole: The five-membered ring is a triazole ring with a nitrogen atom at position 9.
- 2-aminobenzimidazole with a methyl group at position 4 (rightmost): The five-membered ring is an imidazole ring with a methyl group (Me) at position 4 and a nitrogen atom at position 9.

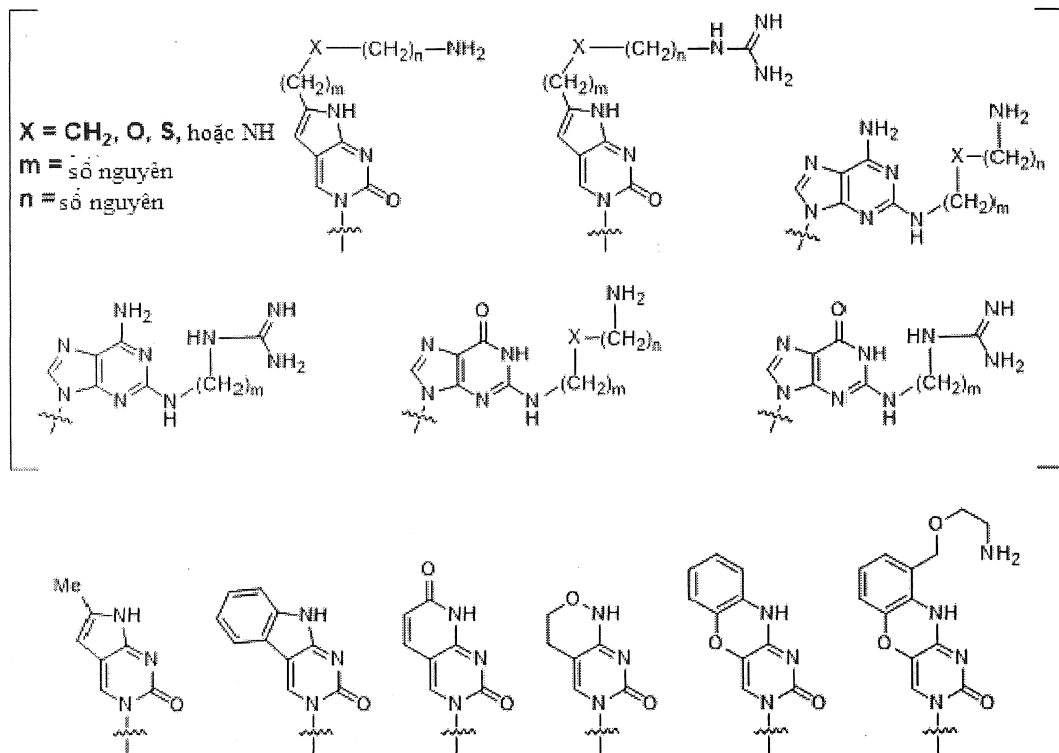


6-O-metylguanin

Hình 1

(tiếp tục từ trang trước)

(C) Ví dụ về các nucleobazo (biến tính) tự nhiên hoặc không tự nhiên có thể được chọn làm dẫn xuất axit nucleic peptit của **Công thức I**.



(A) Ví dụ về các chất thể có thể được chọn làm dẫn xuất axit nucleotit peptit cho **Công thức I**.

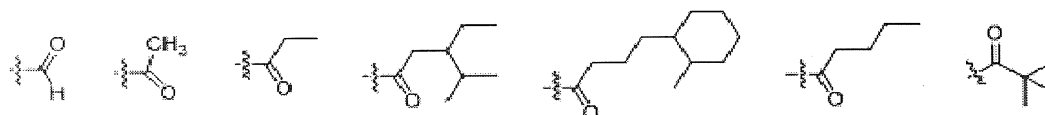
Ví dụ về gốc ankyl không được thể

Figure 1 displays the chemical structures of 15 monomers (1-15) used for the synthesis of poly(arylether)s. The monomers are:

- 1. 2-methoxyethyl methacrylate
- 2. 2-amino-2-phenylpropan-1-ol
- 3. 2-methoxy-2-phenylpropan-1-ol
- 4. 2-methoxyethyl methacrylate
- 5. 2-methoxyethyl methacrylate
- 6. 2-methoxyethyl methacrylate
- 7. 2-methoxyethyl methacrylate
- 8. 2-methoxyethyl methacrylate
- 9. 2-methoxyethyl methacrylate
- 10. 2-methoxyethyl methacrylate
- 11. 2-methoxyethyl methacrylate
- 12. 2-methoxyethyl methacrylate
- 13. 2-methoxyethyl methacrylate
- 14. 2-methoxyethyl methacrylate
- 15. 2-methoxyethyl methacrylate

(tiếp tục từ trang trước)

Ví dụ về gốc Ankyloxyl không được thể



Chemical structures of 12 monomers for polymer synthesis:

1. COCC(=O)C(=O)O (Methyl acrylate)
2. NC(Cc1ccccc1)C(=O)O (N-benzylacrylamide)
3. COc1ccccc1CC(C)C(=O)O (4-methoxybenzyl acrylate)
4. CSCC(C(=O)O)C1CCOCC1 (4-(methylthio)tetrahydro-2H-pyran-3-yl acrylate)
5. c1ccccc1CC(=O)O (Phenylacetic acid)
6. CC(C)C(=O)NC1CCCCC1C(=O)O (N-isobutyryl-4-aminocyclohexanecarboxylic acid)
7. NC(=N)CC(=O)O (Glyoxylic acid)
8. c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)CC(C)C(=O)O (1-(1H-indol-3-yl)propanoic acid)
9. CC(C)C(=O)NC(C)C(=O)O (N-isobutyrylglycine)
10. CC(C)C(=O)NC(C)C(=O)O (N-isobutyrylglycine)
11. CC(C)C(=O)NC(C)C(=O)O (N-isobutyrylglycine)
12. CC(C)C(=O)NC(C)C(=O)O (N-isobutyrylglycine)

Chemical structures of various aromatic amide derivatives used in the synthesis of poly(amide-imide)s:

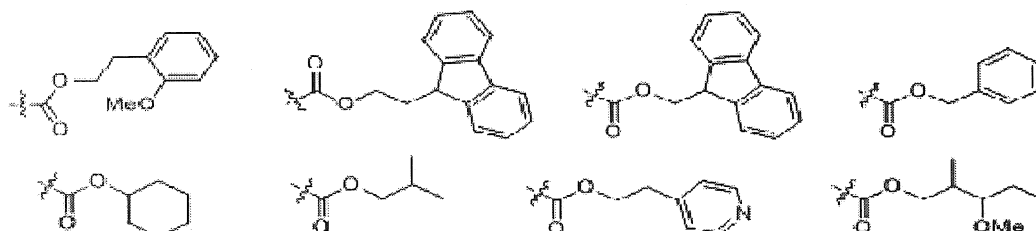
- 1,8-naphthalenedicarboxylic acid derivative (left)
- 4-(dimethylamino)benzoic acid derivative
- Benzoic acid derivative
- 2-thiophenecarboxylic acid derivative
- 2-ethoxybenzoic acid derivative
- 4-methoxy-1,8-naphthalenedicarboxylic acid derivative
- 2-isopropylfuran-3-carboxylic acid derivative
- Pyridine-2-carboxylic acid derivative
- 2-isopropyl-1H-indole-3-carboxylic acid derivative

Hình 2

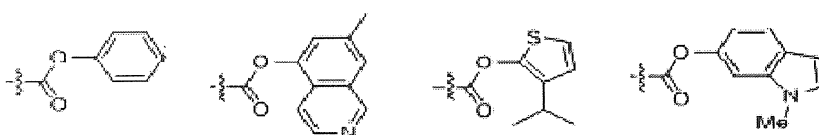
(tiếp tục từ trang trước)

(D) Ví dụ về các chất thể có thể được chọn làm dẫn xuất axit nucleic peptit của Công thức I.

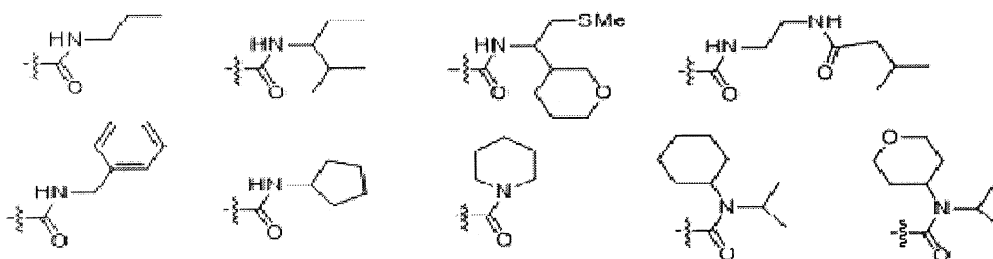
Ví dụ về gốc Ankyloxycarbonyl được thể hoặc không được thể



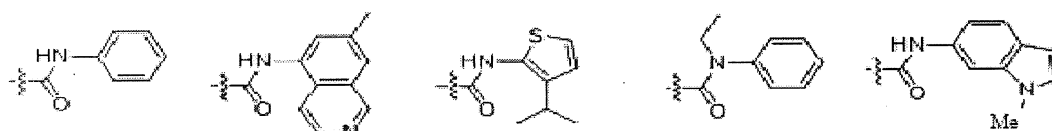
Ví dụ về gốc Aryloxycarbonyl được thể hoặc không được thể



Ví dụ về gốc Ankyloaminocarbonyl được thể hoặc không được thể



Ví dụ về gốc Aryloaminocarbonyl được thể hoặc không được thể

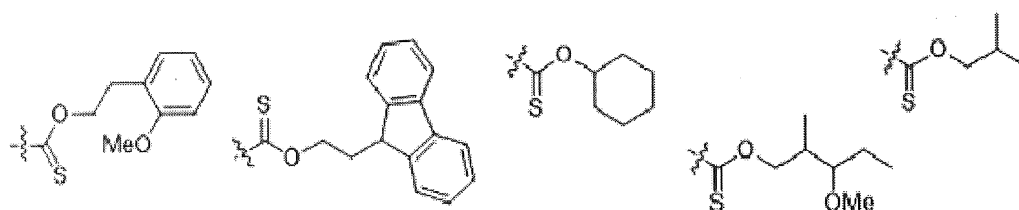


Hình 2

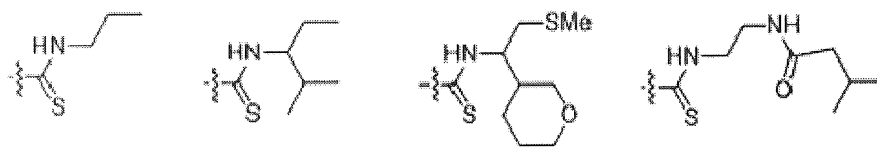
(tiếp tục từ trang trước)

(E) Ví dụ về các chất thể có thể được chọn làm dẫn xuất axit nucleic peptit của **Công thức I**.

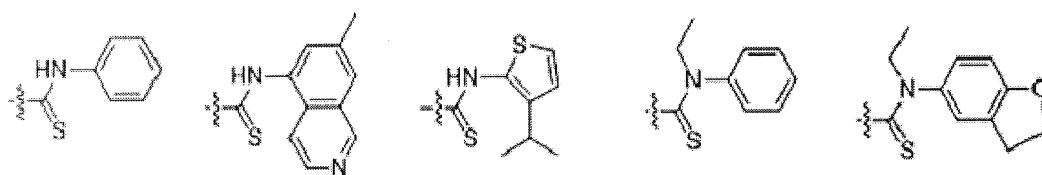
Ví dụ về gốc Ankyloxytiocacbonyl được thể hoặc không được thể



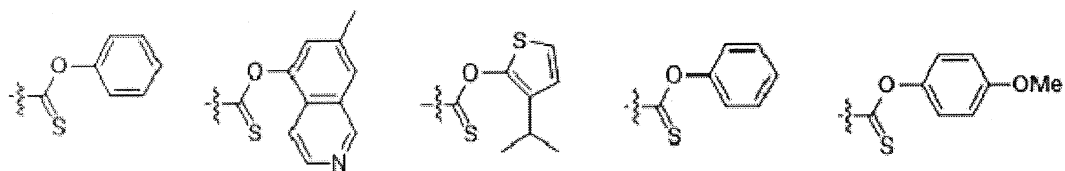
Ví dụ về gốc Ankylaminiotiocacbonyl được thể hoặc không được thể



Ví dụ về gốc Arylaminiotiocacbonyl được thể hoặc không được thể



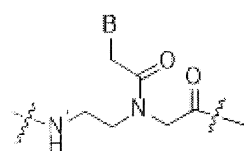
Ví dụ về gốc Aryloxytiocacbonyl được thể hoặc không được thể



Hình 3

Cấu trúc hóa học của các monome PNA với nucleobazo tự nhiên hoặc biến tính.

Monome PNA

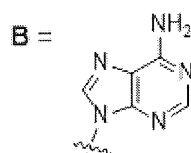


B : Nucleobazo

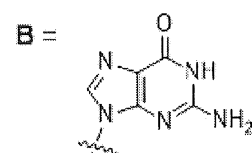
p Số nguyên

q Số nguyên

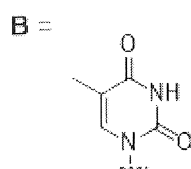
Adenin



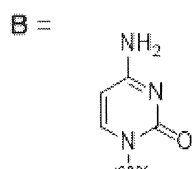
Guanin



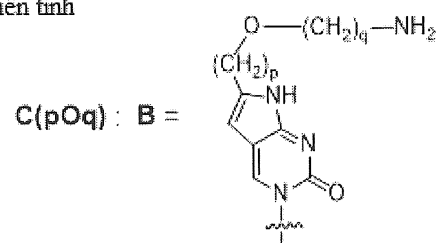
Timin



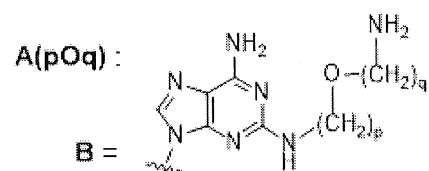
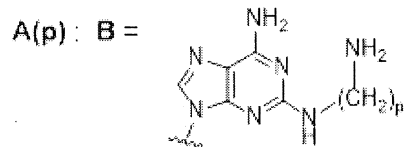
Xytoxin



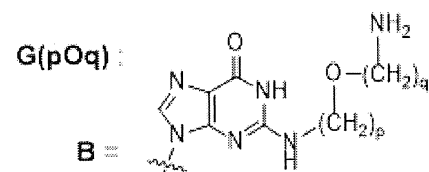
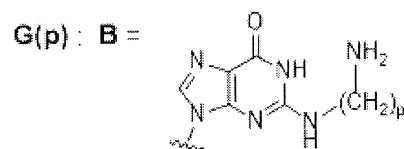
Xytoxin biến tính



Adenin biến tính

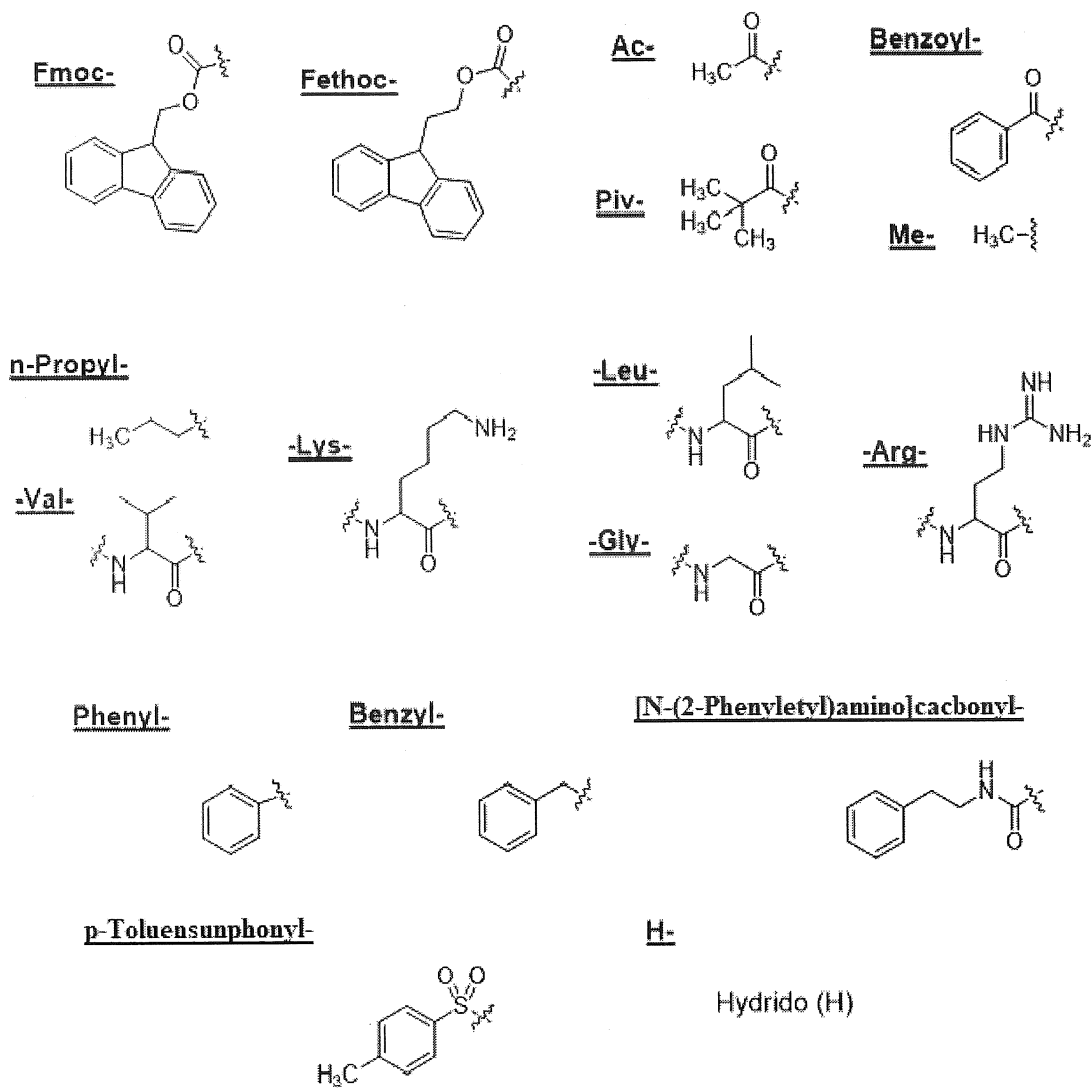


Guanin biến tính



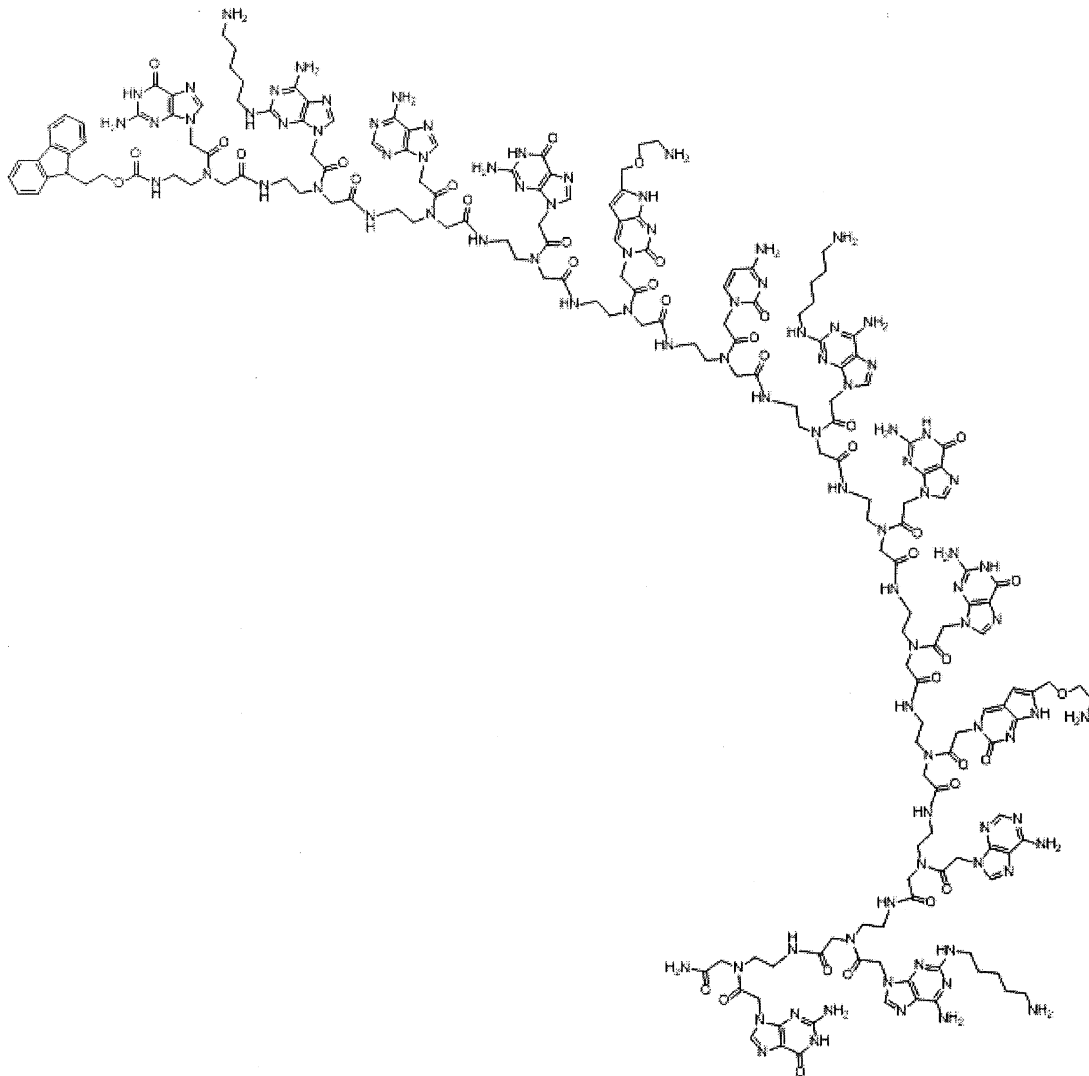
Hình 4

Công thức hóa học cho các chữ viết tắt của các chất thể đầu N hoặc đầu C



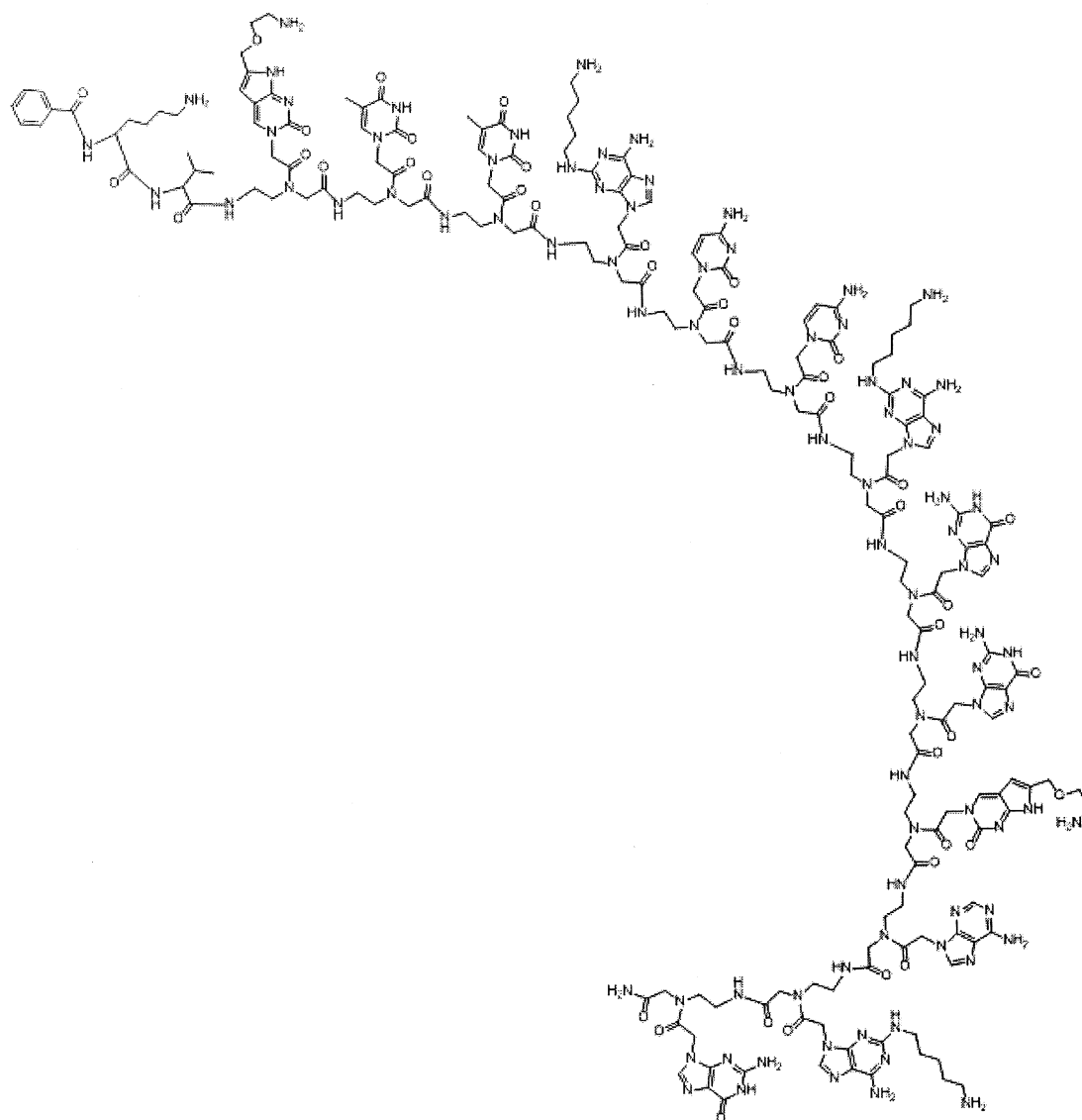
Hình 5(A)

Công thức hóa học của
Fethoc-GA(5)A-GC(102)C-A(5)GG-C(102)AA(5)G-NH₂



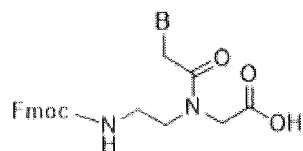
Hình 5(B)

Công thức hóa học của
Benzoyl-Lys-Val-C(102)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(102)AA(5)G-NH₂



Hình 6

Monome Fmoc-PNA



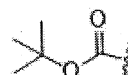
B Nucleobazo với (các) nhóm bảo vệ

X : metylen, oxi, lưu huỳnh, hoặc amino bảo vệ bởi Boc

m : Số nguyên

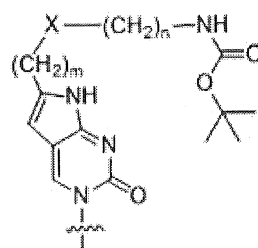
n : Số nguyên

Boc-



Xytoxin biến tính

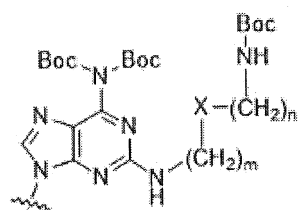
C(mXn) : B =



Adenin biến tính

A(mXn) :

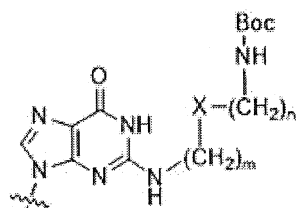
B =



Guanin biến tính

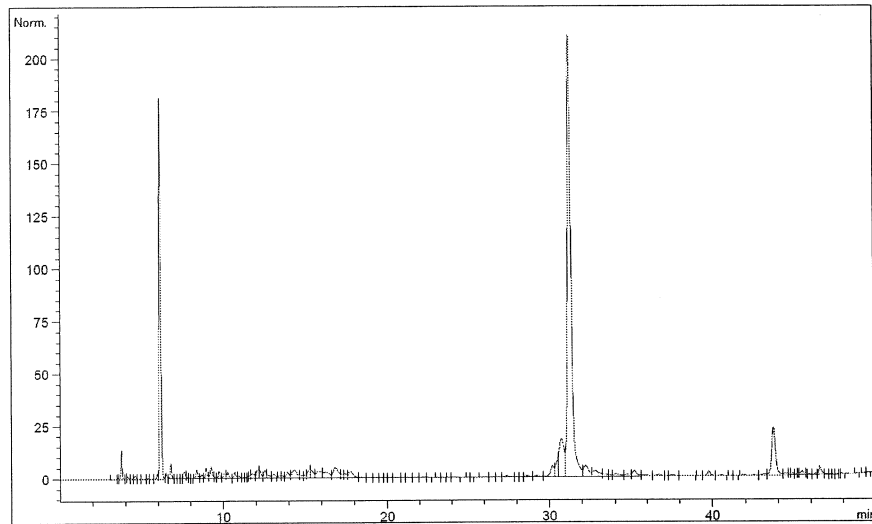
G(mXn) :

B =

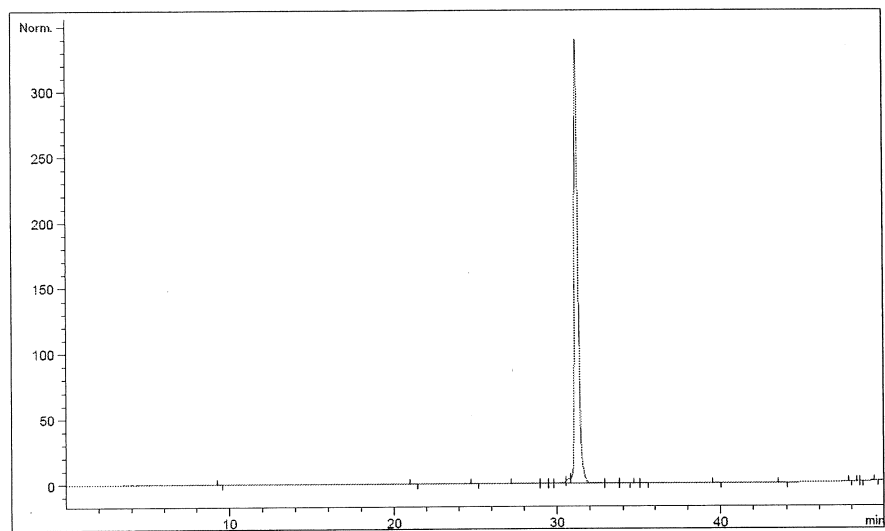


Hình 7

(A) Sắc ký đồ HPLC pha đảo C_{18} của “ASO 1” trước khi tinh chế HPLC.

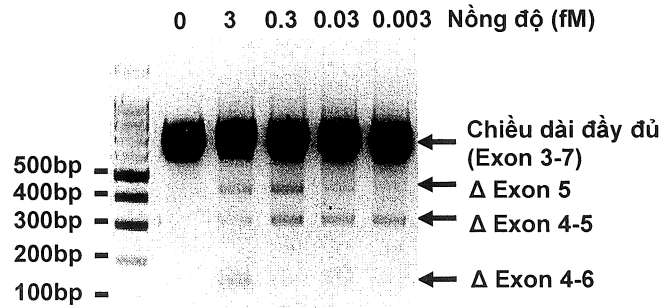


(B) Sắc ký đồ HPLC pha đảo C_{18} của “ASO 1” sau khi tinh chế HPLC

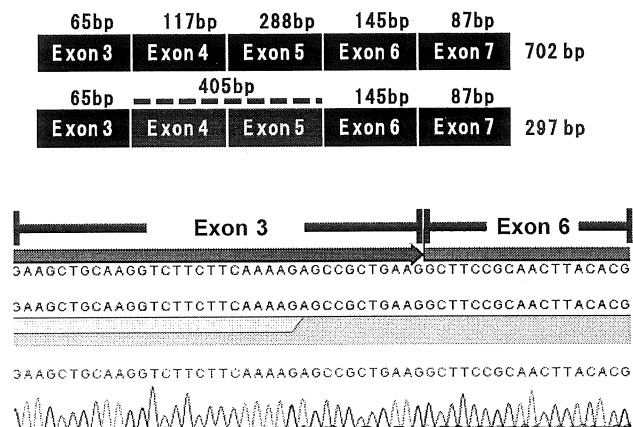


Hình 8

(A) Phân tích điện di các sản phẩm PCR dạng lỏng của các tế bào MCF7 được xử lý với "ASO 5" 0 aM (đối chứng âm), 3 aM, 30 aM, 300 aM, hoặc 3 fM.

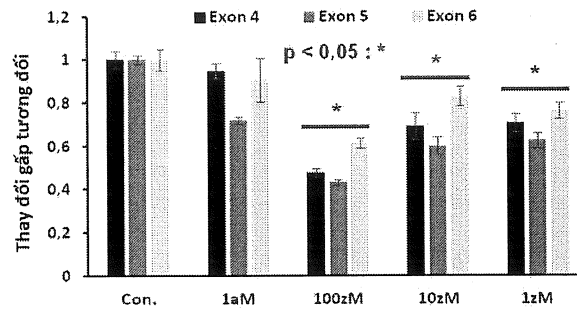


(B) Sơ đồ biểu diễn bằng PCR cho sự bỏ qua exon 4-5 cùng với dữ liệu giải trình tự.

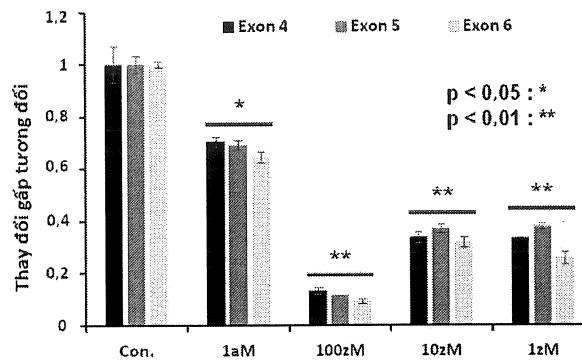


Hình 9

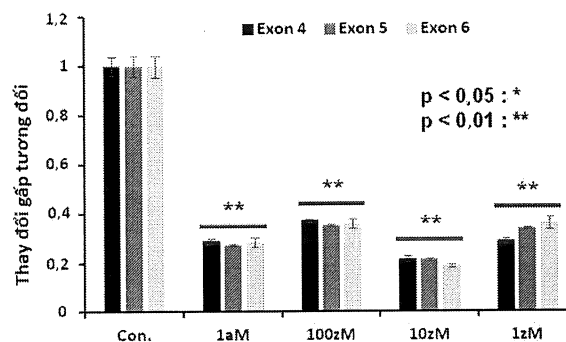
(A) Sự thay đổi trong mức độ tương đối của exon 4-6 trong các tế bào MCF7 được xử lý với “ASO 5” ở 0 zM (đối chứng âm), hoặc 1 zM đến 1 aM trong 5 giờ. (phân tích thống kê bằng t-test)



(B) Sự thay đổi trong mức độ tương đối của exon 4-6 trong các tế bào MCF7 được xử lý với “ASO 1” ở 0 zM (đối chứng âm), hoặc 1 zM đến 1 aM trong 5 giờ. (phân tích thống kê bằng t-test)

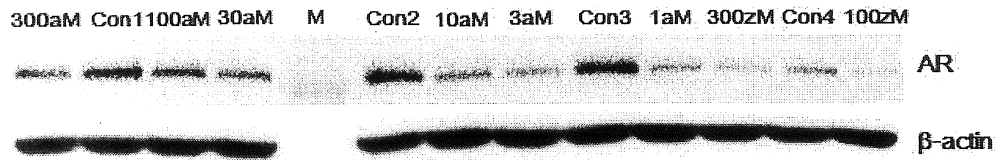


(C) Sự thay đổi trong mức độ tương đối của exon 4-6 trong các tế bào MCF7 được xử lý với “ASO 10” ở 0 zM (đối chứng âm), hoặc 1 zM đến 1 aM trong 5 giờ. (phân tích thống kê bằng t-test)

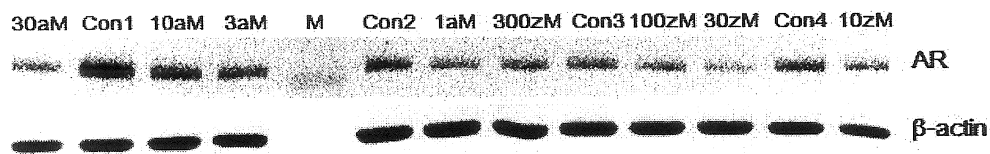


Hình 10

(A) Dữ liệu Western blot cho tế bào MCF7 xử lý với "ASO 1" tại 0 zM (đối chứng âm), hoặc 100 zM đến 300 aM.

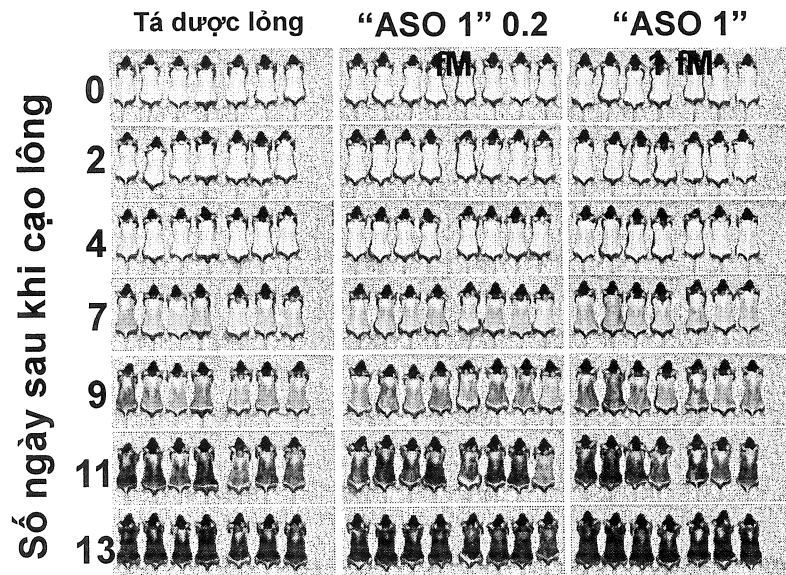


(B) Dữ liệu Western blot cho tế bào MCF7 xử lý với "ASO 5" tại 0 zM (đối chứng âm), hoặc 10 zM đến 30 aM.

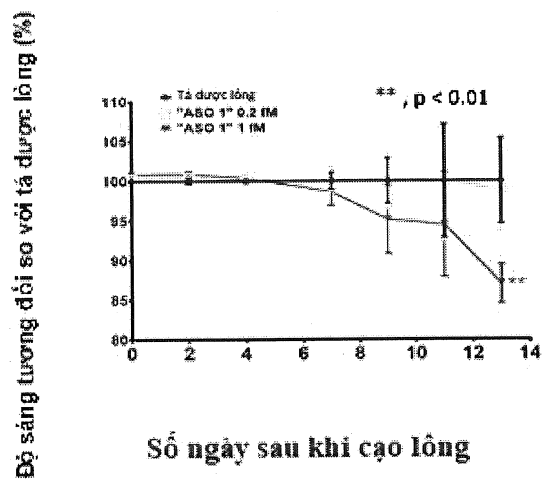


Hình 11

(A) Hình ảnh về sự tăng trưởng của lông trên vùng da theo ngày sau khi cạo lông.

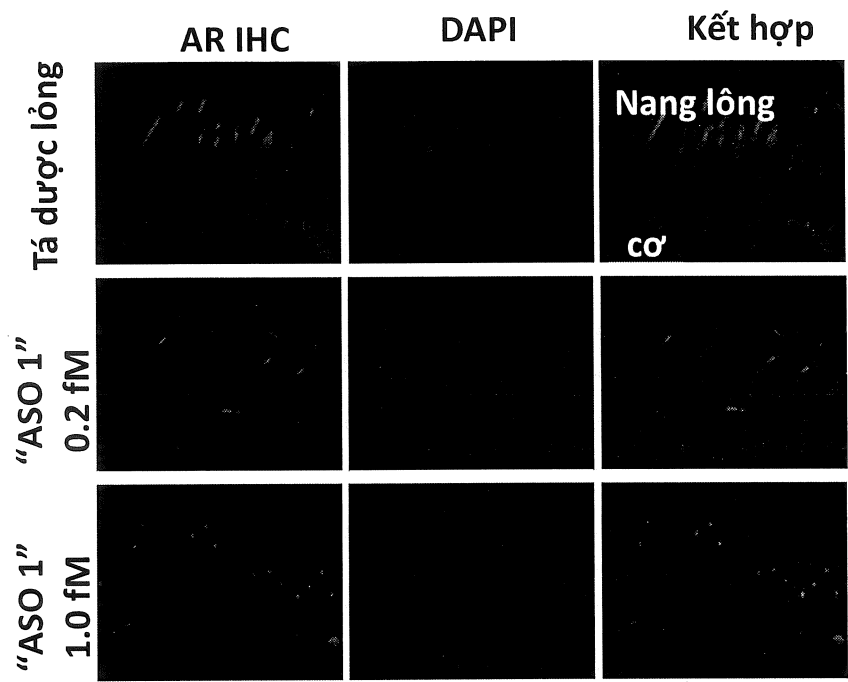


(B) Điểm sáng tương đối của cá nhóm xử lý “ASO 1” so với nhóm đối chứng âm (tá được lông).
(phân tích thống kê bằng t-test)



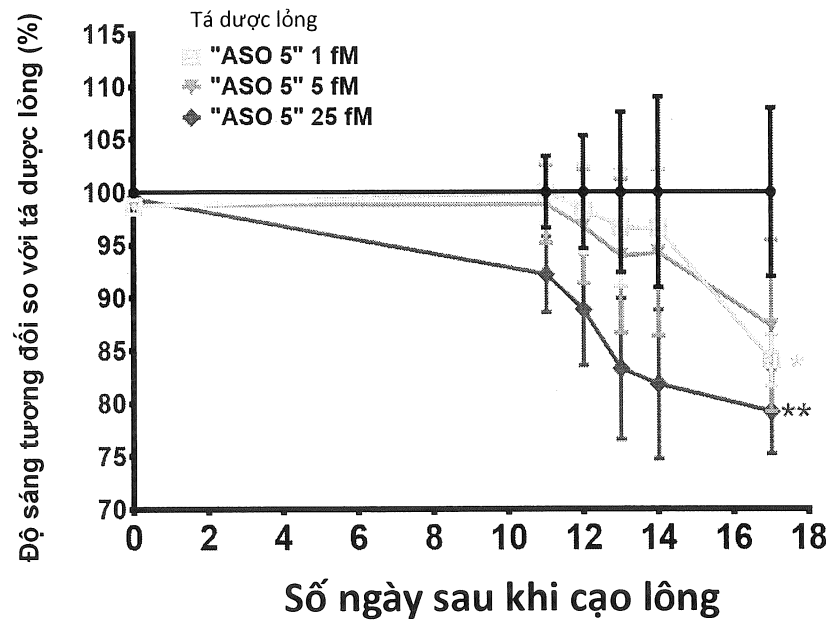
Hình 12

Bộ đại diện hình ảnh huỳnh quang IHC AR (màu đỏ) và DAPI (màu xanh) cho các mẫu da thu được từ các con vật được xử lý với "ASO 1" tại 0 fM (đối chứng âm, tá dược lỏng), 0.2 fM hoặc 1 fM.



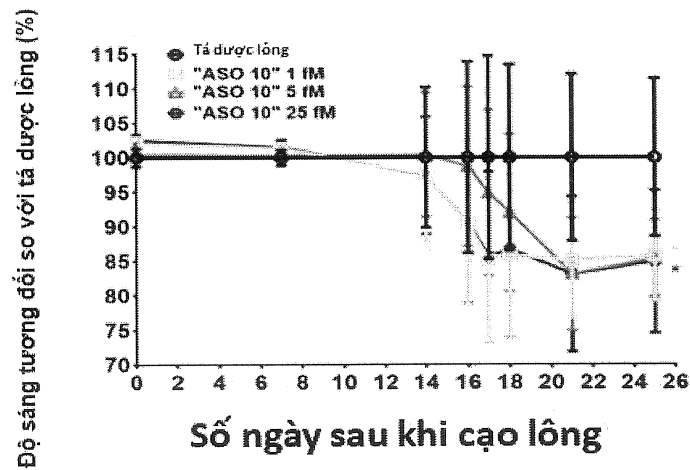
Hình 13

Điểm sáng tương đối của các nhóm xử lý "ASO 5" so với nhóm đối chứng âm (tá dược lỏng). (phân tích bằng t-test)

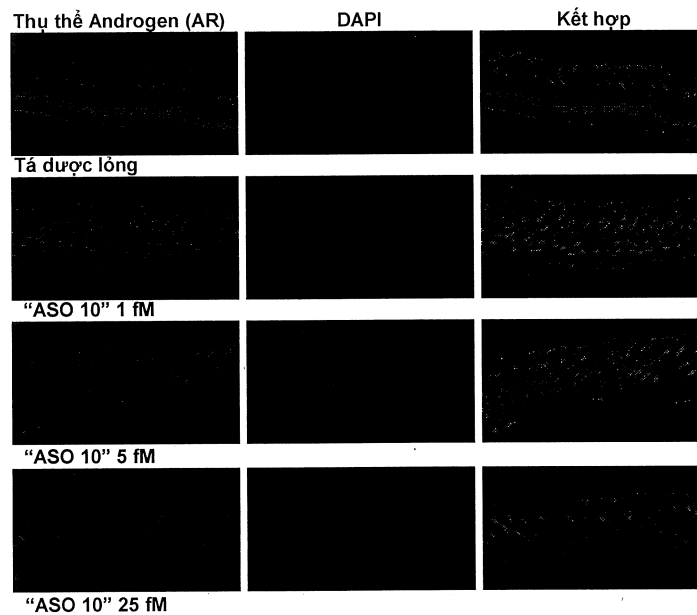


Hình 14

(A) Điểm sáng tương đối của các nhóm xử lý “ASO 10” so với nhóm đối chứng âm (tá được lông).
(phân tích bằng t-test)

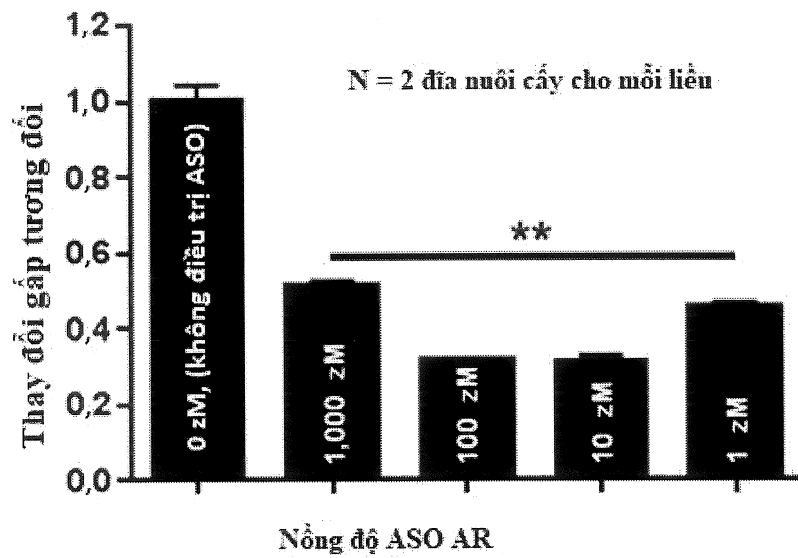


(B) Bộ đại diện hình ảnh huỳnh quang IHC AR (màu đỏ) và DAPI (màu xanh) cho các mẫu da thu được từ các con vật được xử lý với “ASO 10” tại 0 (đối chứng âm, tá được lông), 1,5 hoặc 25 fM.



Hình 15

Dữ liệu qPCR cho mức độ AR mRNA tương đối theo thí nghiệm TaqMan trong các tế bào MCF7 được xử lý với "ASO 10" tại 0 (đối chứng âm), 1, 10, 100, or 1,000 zM trong 24 giờ so với đối chứng âm. (phân tích bằng t-test)



Hình 16

Bộ đại diện của hình ảnh huỳnh quang AR IHC (màu đỏ) và DAPI (màu xanh) cho các mẫu mô thu được từ chuột được tiêm dưới da với "ASO 10" ở 0 (đối chứng âm), 0,01 hoặc 0,1 pmol/Kg, 2X mỗi tuần trong thời gian 4 tuần.

