



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0048536

(51)^{2019.01} C07K 14/00; C12N 15/113; A61K 38/00 (13) B

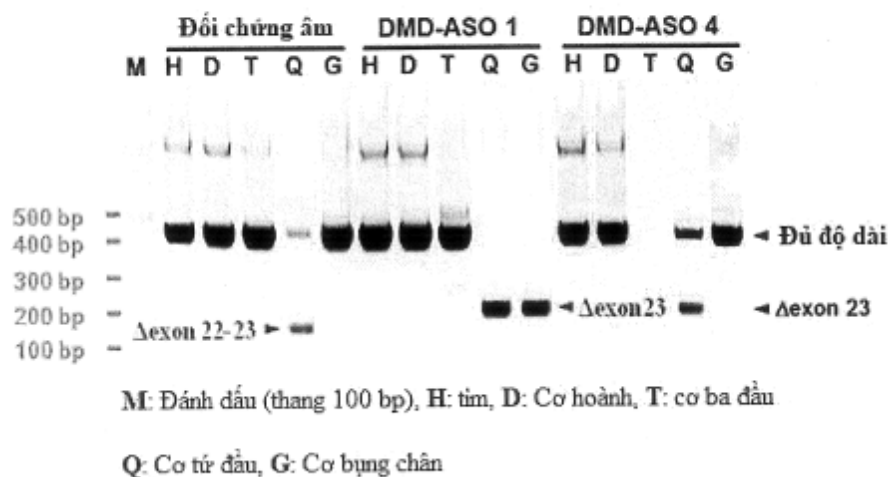
-
- | | |
|--|----------------------------------|
| (21) 1-2019-04166 | (22) 29/12/2017 |
| (86) PCT/IB2017/001725 29/12/2017 | (87) WO2018/122610 A1 05/07/2018 |
| (30) 62/440,929 30/12/2016 US | |
| (45) 25/07/2025 448 | (43) 25/12/2019 381A |
| (73) OLIPASS CORPORATION (KR)
20th Floor, Ace Dongbaek 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 GÂY NHẢY ĐOẠN EXON VÀ PHƯƠNG
PHÁP GÂY RA SỰ NHẢY EXON ĐÍCH TRONG TIỀN ARN THÔNG TIN MỤC
TIÊU

(21) 1-2019-04166

(57) Dẫn xuất axit nucleic peptit có công thức I được cung cấp để gắn kết chặt chẽ với vị trí cắt nối trong tiền ARN thông tin theo một trình tự cụ thể. Với tính thấm màng tế bào tuyệt vời và ái lực mạnh với ARN, dẫn xuất axit nucleic peptit nói trên gây ra nhảy exon trong các tế bào được xử lý bằng axit peptit nucleic ở nồng độ dưới femtô mol (10^{-15} mol) dưới dạng oligonucleotit "nguyên dạng". Hợp chất nói trên cho thấy hoạt tính trị liệu ở các đối tượng khi sử dụng toàn thân ngay cả ở mức 1 $\mu\text{g/Kg}$ hoặc ít hơn, và do đó rất hữu ích để điều trị bệnh hoặc triệu chứng với chi phí điều trị hợp lý.

Hình 37A



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến nhảy vùng mã hóa (nhảy exon, Exon Skipping) tạo ra bởi dẫn xuất axit nucleic peptit với sự thâm nhập tế bào tốt và ái lực mạnh với axit nucleic, và yêu cầu bảo hộ benefit of priority cho U.S. Provisional Application No. 62/440,929, được đệ trình vào ngày 30 tháng 12 năm 2016, toàn bộ nội dung được tham chiếu và tích hợp vào tài liệu này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Oligonucleotit đã được sử dụng cho các mục đích sinh học đa dạng bao gồm ức chế ngược (antisense inhibition) biểu hiện gen, PCR (phản ứng chuỗi polymeraza), phân tích chẩn đoán bằng chip gen, v.v. Vì các oligonucleotit tương tác với axit nucleic bao gồm ADN và ARN theo một trình tự cụ thể, chúng rất hữu ích để điều chỉnh một cách có thể dự đoán được các quá trình sinh học liên quan đến ADN hoặc ARN trong tế bào. Các oligonucleotit có khả năng thâm nhập tế bào tốt có thể điều chỉnh các quá trình sinh học như vậy trong tế bào theo một trình tự có thể dự đoán được.

Protein là mục tiêu của thuốc: Protein làm trung gian cho các chức năng tế bào đa dạng. Sẽ không có gì đáng ngạc nhiên khi thấy rằng hầu hết các loại thuốc hiện được bán trên thị trường đều cho thấy hoạt tính trị liệu thông qua các chức năng điều chỉnh của protein. Ví dụ, aspirin thuốc chống viêm không steroid có tác dụng ức chế các enzyme gọi là xyclooxygenaza để chống viêm. Losartan gắn kết với một thụ thể xuyên màng gọi là thụ thể angiotensin II cho hoạt tính hạ huyết áp của nó. Rosiglitazone hoạt hoá có chọn lọc một thụ thể nội bào gọi là thụ thể được hoạt hóa bởi yếu tố tăng sinh vi thể peroxy γ (Peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR γ) để khơi gợi hoạt tính chống đái tháo đường của nó. Etanercept là một protein tổng hợp gắn kết với một cytokine được gọi là yếu tố

hoạt tử khối u - α (TNF- α), và vô hiệu hóa hoạt tính sinh học của TNF- α cho hoạt tính chống thấp khớp của nó. Herceptin là một kháng thể đơn dòng để điều trị ung thư vú bằng cách gắn kết một cách chọn lọc với erbB2 được biểu hiện quá mức trong một số loại tế bào ung thư vú nhất định.

Tiền ARN thông tin: Thông tin di truyền được mang trên ADN (axit 2-deoxyriboza nucleic), được phiên mã để tạo ra tiền ARN thông tin (tiền ARN thông tin/pre-messenger ribonucleic acid) trong nhân tế bào. Tiền ARN thông tin của động vật có vú thường bao gồm exon và intron, và exon và intron được gắn kết với nhau. Exon và intron được đánh số như minh họa trong Hình 1A.

Việc ghép tiền ARN thông tin vào ARN thông tin: Trong nhân, tiền ARN thông tin được xử lý thành ARN thông tin sau khi xóa intron và thắt các exon bằng một loạt các phản ứng phức hợp được gọi chung là "cắt nối" như minh họa trong hình 1B. [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 mRNA và các nhân tố đáp ứng cắt nối. Trong "phức hợp Spliceosome E", U1 gắn kết với chỗ nối của exon N và intron N và U2AF³⁵ gắn kết với chỗ nối của intron N và exon (N + 1). Như vậy, điểm nối của exon/intron hoặc intron/exon rất quan trọng đối với sự hình thành phức hợp spliceosome ban đầu. "Phức hợp Spliceosome E" tiến triển thành "phức hợp Spliceosome A" khi tạo phức hợp thêm với U2. "Phức hợp Spliceosome A" sau đó trải qua một loạt các phản ứng phức hợp để xóa hoặc tách intron để nối các exon lân cận.

Sự cắt bỏ chọn lọc và biến thể cắt nối (Alternative Splicing and Splice Variant): Tất cả các exon của tiền ARN thông tin không phải luôn luôn được giữ lại để tạo thành ARN thông tin "đủ độ dài" trong quá trình cắt nối. Một số exon nhất định bị xóa hoặc tách ra để tạo thành các ARN thông tin biến thể, tức là "các biến thể cắt nối". Do đó, tiền ARN thông tin có thể "được cắt bỏ chọn lọc" để tạo ra nhiều biến thể cắt nối.

Sự cắt bỏ chọn lọc trong các tế bào động vật có vú được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1981 với gen mã hóa calcitonin. [Nature vol 290(5801), 63-65 (1981); Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol 79(6), 1717-1721 (1982)]. Gen này bao gồm 6 exon và ARN thông tin calcitonin được thiết kế bằng cách nhảy Exon 5 và exon 6. Trong khi đó, việc nhảy Exon 4 tạo ra biến thể ARN thông tin mã hóa peptit liên quan đến gen calcitonin (CGRP).

Việc cắt bỏ chọn lọc dường như hoàn toàn phụ thuộc vào các tế bào và điều kiện mà các tế bào được tiếp xúc. Do sự cắt bỏ chọn lọc, nhiều protein được thiết kế từ một gen duy nhất. Việc cắt bỏ chọn lọc cho phép động vật tạo ra nhiều loại protein hơn cho kích thước bộ gen của chúng. Ở người, 95% gen đa exon (multi-exonic genes) được ước tính sẽ được cắt nối một cách xen kẽ. [Nature Genetics vol 40(12), 1413-1415 (2008)]

Các biến thể cắt nối và các chức năng sinh học: Các biến thể cắt nối được tìm thấy một cách tự nhiên theo cách phụ thuộc vào loại hoặc mô tế bào, và mã hóa các protein có cấu hình sinh học thường khác với cấu hình của protein đủ độ dài.

Thụ thể Androgen (AR) sẽ là một ví dụ tốt về các gen mang lại nhiều biến thể cắt nối. [Int. J. Biol. Sci. vol 7(6), 815-822 (2011)]. AR tiền ARN thông tin này bao gồm 8 exon cộng với 4 exon ẩn (exon ẩn - cryptic exon, được cung cấp dưới dạng bóng mờ trong sơ đồ bên dưới). Có ít nhất bảy biến thể cắt nối của ARN thông tin AR.

Biến thể 1 của ARN thông tin AR được cấu tạo từ exon 1 đến exon 8 được kết nối nối tiếp và mã hóa protein AR đủ độ dài như được minh họa trong Hình 2A. Trong trường hợp biến thể 3 của ARN thông tin AR, exon 4 đến exon 8 được tách ra (nghĩa là bị xóa). Do đó, biến thể 3 của ARN thông tin AR mã hóa protein AR bị cắt ngắn (AR3) thiếu miền gắn kết phối tử (ligand-binding domain; LBD) có trong protein đủ độ dài.

Protein AR đủ độ dài trở nên hoạt động chức năng khi hình thành phức hợp với một loại androgen như testosterone hoặc dihydrotestosterone (DHT). Trong khi đó, protein AR3 bị cắt ngắn hoạt động chức năng ngay cả khi không có

androgen. Trong các khối u tuyến tiền liệt kháng trị liệu cắt bỏ androgen, protein AR3 này thường được điều chỉnh tăng. Như vậy, sự hình thành nội sinh của protein biến thể AR3 có thể được thực hiện như một quá trình chọn lọc tự nhiên đối với các tế bào ung thư tuyến tiền liệt để tránh liệu pháp cắt bỏ androgen.

Yếu tố kích thích giảm oxy 1α (HIF- 1α) là một tiểu đơn vị của một yếu tố phiên mã được gọi là yếu tố kích thích giảm oxy 1 (HIF-1) và được mã hóa bởi gen HIF1A. HIF- 1α được điều chỉnh tăng để đáp ứng với tình trạng thiếu oxy (nghĩa là mức oxy thấp) và do đó có thể được coi là cảm biến oxy của tế bào. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 92, 5510-5514 (1995)] HIF- 1α tạo ra sự phiên mã của hơn 60 gen bao gồm Yếu tố phát triển nội mạc mạch (VEGF) và EPO. HIF- 1α thúc đẩy sự hình thành các mạch máu mới thông qua VEGF. [Exp. Mol. Med. vol 36, 1-12 (2004)]. Các khối u rắn bị thiếu oxy do nguồn cung cấp máu hạn chế, và điều chỉnh tăng HIF- 1α để sống sót trong tình trạng thiếu oxy.

Protein HIF- 1α bao gồm nhiều miền khác nhau cho hoạt tính chức năng của nó như là một chất kích hoạt phiên mã. Nó chứa một mô-típ cấu trúc dạng xoắn - vòng - xoắn cơ bản (bHLH) và hai miền PAS. [for PAS domain, cf. Curr. Biol. vol 7(11), R674-677 (1997); Eur. J. Biochem. vol 271(6), 1198-1208 (2004)] HIF- 1α có một miền giảm phụ thuộc oxy (ODD) đóng vai trò như cảm biến oxy và được biết đến là rất quan trọng đối với sự ổn định của protein HIF- 1α .

Có ít nhất sáu biến thể của protein HIF- 1α được mã hóa bởi sáu biến thể cắt nối ARN thông tin HIF- 1α như được minh họa trong Hình 2B. [Exp. Mol. Med. vol 36, 1-12 (2004)]. ARN thông tin HIF- 1α (HIF- $1\alpha^{FL}$) đủ độ dài là tương tự như ARN thông tin HIF- 1α (HIF- $1\alpha^{WT}$) dạng tự nhiên ngoại trừ ba gốc (UAG) bổ sung giữa exon 1 và exon 2 do cắt bỏ chọn lọc. Exon 14 bị xóa hoặc bị nhảy trong HIF- $1\alpha^{736}$. HIF- $1\alpha^{736}$ thiếu miền kích hoạt đầu C (CAD). Cả HIF- $1\alpha^{FL}$ và HIF- $1\alpha^{736}$ được biết là đều kích hoạt chất hoạt hóa VEGF khi bị thiếu oxy. Trong khi đó, HIF- $1\alpha^{557}$ (HIF- $1\alpha^Z$) và HIF- $1\alpha^{516}$ hoạt động như một isoform âm tính trội của HIF- 1α . Trong ung thư vú, biến thể cắt nối ARN thông tin HIF- $1\alpha^{FL}$ phản ánh giai đoạn tiến triển ung thư và có liên quan đến tiên lượng xấu. [BMC Medicine vol 8(44), 1-12 (2010)]

Như được minh họa bởi các thụ thể androgen và protein HIF-1 α , các biến thể cắt nối đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra sự đa dạng sinh lý cho một gen động vật có vú cho trước. Thiên nhiên tạo ra các biến thể cắt nối một cách tự nhiên để duy trì nội cân bằng cũng như đáp ứng với các động lực sinh lý.

Tổng hợp protein ribosome: Các intron của tiền ARN thông tin được tách enzyme để tạo ra ARN thông tin (axit ribonucleic thông tin), sau đó được chuyển đến nơi chứa dung dịch bào tương. Trong dung dịch bào tương, một phức hợp bộ máy vận hành gọi là ribosome gắn kết với ARN thông tin và thực hiện quá trình tổng hợp protein khi quét các thông tin di truyền được mã hóa dọc theo ARN thông tin. [Biochemistry vol 41, 4503-4510 (2002); Cancer Res. vol 48, 2659-2668 (1988)]

Codon: Trong quá trình tổng hợp protein ribosome, mỗi axit amin được mã hóa bởi một bộ ba chuỗi ARN thông tin. Ví dụ: "AUG", "UUA", "CCC" và "AGA" lần lượt mã hóa "methionine", "leucine", "proline" và "arginine". Các bộ ba như vậy gọi là "codon". Giả dụ với 4 đơn phân A, G, U và C của ARN thông tin có thể có 64 ($4 \times 4 \times 4 = 64$) codon. Một số codon tương ứng với tín hiệu "dừng" tổng hợp protein ribosome. "UGA", "UAA" và "UAG" là các codon cho tín hiệu "dừng". Sự tổng hợp protein ribosome chấm dứt khi bộ máy ribosome nhận ra một codon "dừng" khi nó quét dọc theo ARN thông tin.

Antisense Oligonucleotit (ASO): Một oligonucleotit gắn kết với ARN thông tin hoặc tiền ARN thông tin theo trình tự riêng biệt (nghĩa là bổ sung) được gọi là "antisense oligonucleotit" (ASO). ASO gắn kết chặt chẽ với ARN thông tin có thể ngăn chặn sự tổng hợp protein ribosome. Tương tự như vậy, ASO gắn kết chặt chẽ với tiền ARN thông tin có thể can thiệp vào quy trình nối và tạo ra các biến thể cắt nối của ARN thông tin.

Sự ức chế cắt nối antisense: việc cắt nối tiền ARN thông tin bắt đầu sau khi "phức hợp Splicesome E" (nghĩa là phức hợp E) được hình thành. Như được mô tả dưới dạng sơ đồ trong Hình 3, các protein SR (tức là protein giàu serine arginine) gắn kết với các "vùng tăng cường cắt nối bên trong mỗi exon" (ESE) và hỗ trợ tuyển dụng U1 và U2AF³⁵ để gắn kết với "vị trí cắt nối 5'" và "vị trí cắt nối

3'", tương ứng. [Biochem. Cell Biol. vol 77(4), 277-291 (1999); Curr. Opin. Cell Biol. vol 13(3), 302-309 (2001)]

Về nguyên tắc, ASO có thể ức chế triệt để sự hình thành "phức hợp Splicesome E" bằng cách gắn kết với một vùng tiền ARN thông tin nhất định mà rất quan trọng đối với sự hình thành phức hợp E. Sự hình thành phức hợp E bị ức chế hoặc bị chặn nếu ASO gắn kết chặt chẽ với "vị trí cắt nối 5'", "vị trí cắt nối 3'" hoặc vùng ESE.

Vì ARN thông tin mã hóa protein theo trình tự của nó, một biến thể cắt nối ARN thông tin mã hóa một protein khác với protein được mã hóa bởi ARN thông tin "nguyên bản" hoặc "đủ độ dài". Do đó, ức chế cắt nối antisense là một lựa chọn điều trị hiệu quả bằng cách mã hóa (các) protein biến thể cho thấy các đặc tính sinh học khác với các protein được mã hóa bởi ARN thông tin "nguyên bản" hoặc "đủ độ dài".

Dịch khung gây ra bởi sự ức chế cắt nối Antisense: Một phần của "trình tự ADN mã hóa" (CDS) cho ARN thông tin HIF-1 α ở người [Mã ARN thông tin NCBI: NM_001530] được đưa ra trong Hình 4A làm ví dụ để minh họa cho "dịch chuyển khung" (nghĩa là ra khỏi khung) gây ra bởi sự ức chế cắt nối antisense. CDS (là thanh màu vàng) được hiển thị bằng codon và exon (là mũi tên màu xanh lá cây). Cần lưu ý rằng T (tức là thymine) trong CDS nên được thay thế bằng U (tức là uraxil) trong ARN thông tin hoặc tiền ARN thông tin.

Nếu exon 3 bị xóa do sự ức chế cắt nối antisense, thì đầu 3' của exon 2 được gắn kết trực tiếp với đầu 5' của exon 4. Sau đó, điểm nối giữa exon 2 và exon 4 đọc "...-GAT-GCT-(**G-TTT**)-GAA-CTA-..." như được đưa ra trong Hình 4B (xem sơ đồ bên trái). Có bốn nucleotit giữa hai codon lân cận của ARN thông tin đủ độ dài. Việc xóa exon 3 đặt các codon bắt đầu từ exon 4 ra khỏi khung. Do đó, việc xóa exon 3 gây ra "dịch chuyển khung" của các codon.

Nếu exon 3 và exon 4 bị xóa đồng thời bởi sự ức chế cắt nối antisense, thì đầu 3' của exon 2 nối với đầu 5' của exon 5. Khi đó, điểm nối giữa exon 2 và exon 5 là "...- GAT-GCT-(**G-GC**)-CTT-GTC-..." như được thấy trong Hình 4B (xem sơ đồ bên phải). Có ba nucleotit giữa hai codon lân cận của ARN thông tin đủ độ

dài. Việc xóa cùng lúc exon 3 và exon 4 đặt các codon bắt đầu từ exon 5 trong khung, tức là không có dịch chuyển khung.

Sự dịch chuyển khung mang lại các codon khác với các codon "gốc" và thường tạo ra codon kết thúc sớm (PTC), như được minh họa trong Hình 4 cho trường hợp xóa exon 3 trong ARN thông tin HIF-1 α . Nhảy exon gây ra chuyển khung được định hướng để tạo ra một đoạn protein bị cắt ngắn ở đầu C do sự kết thúc sớm của quá trình tổng hợp protein ribosome. Một đoạn protein như vậy có thể cho thấy các đặc tính sinh lý khác với protein "nguyên bản" hoặc "đủ độ dài". Do đó, sự ức chế cắt nối antisense có thể là một lựa chọn điều trị hiệu quả đối với một gen gây bệnh.

Phát hiện nhảy Exon bằng kỹ thuật Nested phương pháp RT-PCR: Một ARN thông tin biến thể cắt nối (splice variant mARN) gây ra bởi ASO thường được phát hiện bằng PCR (phản ứng chuỗi polymeraza). Nếu một ASO gây ra nhảy Exon 4 có độ dài 150 bp như minh họa trong Hình 5A, thì có hai ARN thông tin có thể được thiết kế từ tiền ARN thông tin đích của ASO, tức là ARN thông tin có đủ độ dài và ARN thông tin biến thể cắt nối thiếu exon 4. Trong trường hợp ASO gây ra nhảy exon 4 hoàn toàn (nghĩa là 100%), các tế bào được xử lý bằng ASO chỉ mang lại sản phẩm PCR nhỏ hơn sản phẩm PCR của ARN thông tin có đủ độ dài 150 bp. Dải sản phẩm PCR do nhảy Exon được lấy mẫu và chịu sự sắp xếp chuỗi để xác nhận rằng dải sản phẩm PCR thực sự đến từ biến thể cắt nối ARN thông tin.

Ước tính năng suất nhảy Exon bằng phương pháp PCR: Trong các tài liệu, năng suất hoặc hiệu quả nhảy Exon thường được ước tính bằng cách so sánh cường độ dải gel của sản phẩm PCR cho ARN thông tin biến thể cắt nối với cường độ cho ARN thông tin đủ độ dài. Ước tính như vậy có giá trị hầu hết về mặt lý thuyết nếu chỉ khi ARN thông tin đủ độ dài và biến thể cắt nối ARN thông tin có độ ổn định tương đương trong các tế bào cũng như trong các quy trình xét nghiệm được áp dụng để phát hiện PCR. Lưu ý rằng sự ổn định của ARN thông tin là kết quả tổng thể của quá trình tiến triển qua một tỷ năm, tuy nhiên, không chắc là các

biến thể cắt nối ARN thông tin sẽ cho thấy sự ổn định tương tự như ARN thông tin đủ độ dài.

Tương tự như vậy, thật công bằng khi giả định rằng sự làm giàu tương đối của ARN thông tin biến thể cắt nối và ARN thông tin đủ độ dài có thể khác nhau tùy thuộc vào mỗi PCR (PCR primers), điều kiện PCR và phương pháp phát hiện PCR. Gần đây, Phương pháp PCR định lượng bằng kỹ thuật số (phương pháp qPCR kỹ thuật số) đã được áp dụng để ước tính năng suất nhảy Exon của ARN thông tin dystrophin ở chuột mdx được điều trị bằng ASO dystrophin của morpholino hoặc 2'-OMe PTO (phosphorothioat). Năng suất nhảy Exon đo bằng phương pháp qPCR kỹ thuật số khác biệt đáng kể so với năng suất nhảy đo bằng các phương pháp truyền thống như phương pháp PCR định lượng lồng (qPCR lồng - nested qPCR). [*Lab. Investigation, vol 90, 1396-1402 (2010)*]. Một nghiên cứu qPCR kỹ thuật số về nhảy exon ở các nguyên bào cơ và nguyên bào sợi từ người bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) cho thấy rằng phương pháp qPCR kỹ thuật số là lựa chọn đáng tin cậy để phát hiện các sản phẩm nhảy Exon có độ nhạy cao. [*PLoS One 0162467, September 09 (2016)*]

Mặc dù năng suất nhảy Exon rõ ràng có xu hướng thay đổi tùy thuộc vào phương pháp và điều kiện xét nghiệm PCR, năng suất nhảy Exon bằng xét nghiệm PCR có thể cần được xác nhận bổ sung bằng biểu hiện protein hoặc xét nghiệm chức năng cho gen đích.

Phản hồi điều chỉnh tăng phiên mã do EICIARN (Feedback Upregulation of Transcription by EICIARN): Intron lariat được hình thành như một sản phẩm phụ trong quá trình cắt nối tiền ARN thông tin. Nhảy Exon mang lại không chỉ ARN thông tin biến thể cắt nối mà còn ARN vòng tròn intron exon (EICIARN) như minh họa trong Hình 5B, trong đó exon 3 và exon 4 được tách ra để tạo ra lariat gồm intron, exon 3 và exon 4. Các lariat ban đầu được hình thành, tức là, EICIARN ①, có thể trải qua cắt nối thêm để tạo ra một lariat thứ hai EICIARN ②.

Những lariat EICIARN đó giữ lại trình tự của vị trí cắt nối 5' (5' SS) của "exon 4" và có khả năng tuyển dụng "U1 small nuclear ribonuclear protein (U1 snRNP)". U1 snRNP sau đó tuyển dụng ARN polymeraza II, có thể điều chỉnh

tăng quá trình phiên mã của tiền ARN thông tin. Sự phiên mã của một tiền ARN thông tin có thể tăng nếu EIciARN tích lũy vượt quá ngưỡng trong nhân. Do đó, các EIciARN thường có thể hoạt động như một bộ điều chỉnh phản hồi của quá trình phiên mã khi nhảy Exon xảy ra quá mức. [Nature Struct. Mol. Biol. vol 22(3), 256-264 (2015)]

Oligonucleotit không tự nhiên: oligonucleotit ADN hoặc ARN dễ bị thoái hóa bởi các nucleaza (enzyme xúc tác phân hủy các nucleic acid-người dịch) nội sinh, hạn chế lợi ích trị liệu của chúng. Cho đến nay, một số oligonucleotit không tự nhiên (nghĩa là không xuất hiện một cách tự nhiên) đã được phát triển và nghiên cứu chuyên sâu. [*Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* vol 33, 533-540 (2006)]. Nhiều trong số chúng cho thấy sự ổn định trao đổi chất mở rộng so với ADN và ARN. Trong Hình 6A, là các cấu trúc hóa học cho một số oligonucleotit không tự nhiên đại diện. Những oligonucleotit này dự đoán sẽ gắn kết với một axit nucleic bổ sung như ADN hoặc ARN gắn kết.

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

Phản ánh sự tương đồng về cấu trúc của trụ cột giữa PTO và ADN, cả hai đều xâm nhập kém vào màng tế bào trong hầu hết các loại tế bào động vật có vú. Tuy nhiên, ở một số loại tế bào biểu hiện phong phú chất vận chuyển cho ADN, ADN và PTO cho thấy tính thấm tế bào tốt tương đương. Các PTO được sử dụng toàn thân được biết là dễ dàng phân phối đến gan và thận do sự biểu hiện phong phú của các chất vận chuyển cho ADN. [Nucleic Acids Res. vol 25, 3290-3296 (1997)].

Để cải thiện tính thấm tế bào của PTO trong ống nghiệm, phương pháp lipofection đã được áp dụng phổ biến. Tuy nhiên, phương pháp lipofection làm thay đổi màng tế bào, gây độc tế bào, và do đó sẽ không lý tưởng cho việc sử dụng điều trị lâu dài.

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

Nhiều PTO antisense 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 hoạt tính lâm sàng ở một nhóm bệnh nhân xơ vữa động mạch nhất định do sự phân phối ưu tiên của nó đến gan. [Circulation vol 118(7), 743-753 (2008)] ISIS-113715 là một chất tương tự PTO ức chế quá trình tổng hợp protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), và đã được thấy hiển thị hoạt tính điều trị ở những bệnh nhân đái tháo đường type II. [Curr. Opin. Mol. Ther. vol 6, 331-336 (2004)]

ARN 2'-O-Alkyl: ARN 2'-O-alkyl là một chất tương tự ARN có nhóm 2'-hydroxy trên vòng ribosa được thay thế bằng nhóm alkyloxy. ARN 2'-O-Alkyl cho thấy ái lực ARN mạnh hơn PTO hoặc ADN. Ngoài ra, ARN 2'-O-Alkyl cho thấy sự ổn định trao đổi chất được cải thiện cho mục đích điều trị. Tuy nhiên, ARN 2'-O-alkyl cho thấy tính thấm màng kém, điều này làm hạn chế phạm vi điều trị.

Axit nucleic bị khóa (LNA): Trong LNA, vòng ribosa trụ cột của ARN bị hạn chế về mặt cấu trúc để tăng ái lực gắn 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)]. Tuy nhiên, LNA cũng cho thấy tính thấm tế bào kém như ADN hoặc ARN.

Oligonucleotit lai của ADN hoặc ARN trụ cột: PTO và ARN 2'-O-Alkyl thường được hợp nhất thành một oligonucleotit duy nhất. Nhờ có phần ARN 2'-O-Alkyl, một oligonucleotit lai như thế có ái lực gắn ARN mạnh hơn so với oligonucleotit PTO của cùng trình tự. Tương tự, LNA và PTO thường được hợp nhất thành một oligonucleotit duy nhất và oligonucleotit lai có ái lực gắn ARN mạnh hơn so với oligonucleotit PTO của cùng trình tự. Tuy nhiên, các oligonucleotit lai như vậy cũng cho thấy tính thấm tế bào kém.

Phosphorodiamidat Morpholino Oligonucleotit (PMO): Trong PMO, các mô đun trụ cột ADN của phosphat và 2-deoxyriboza được thay thế bằng phosphorodiamidat và morpholine, một cách tương ứng. [*Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol 71, 575-586 (2006)] Trong khi trụ cột ADN bị tích điện âm, trụ cột PMO không bị tích điện. Do đó, gắn kết giữa PMO và ARN thông tin không có lực đẩy tĩnh điện giữa các trụ cột và có xu hướng mạnh hơn gắn kết giữa ADN và ARN thông tin. Vì PMO khác biệt rõ rệt với ADN trong cấu trúc trụ cột, PMO sẽ không được công nhận bởi (các) chất vận chuyển ở gan nhận biết ADN hoặc ARN. Tuy nhiên, PMO không dễ dàng xâm nhập màng tế bào.

Axit Peptit Nucleic (APN): APN là một polypeptit với trụ cột đơn vị là N-(2-aminoethyl)glyxin, và được phát hiện bởi Tiến sĩ Nielsen và các đồng nghiệp. [*Science* vol 254, 1497-1500 (1991)] Hình 6B minh họa cấu trúc và danh pháp hóa học cho APN đầu tiên (nghĩa là không biến đổi).

Giống như ADN và ARN, APN cũng gắn kết chọn lọc với axit nucleic bổ sung. [*Nature (London)* vol 365, 566-568 (1992)]. Trong quá trình gắn kết với axit nucleic bổ sung, đầu N của APN tương đương với đầu 5' của ADN hoặc ARN và đầu cuối C của APN tương đương với đầu 3' của ADN hoặc ARN.

Giống như PMO, trụ cột APN không được tích điện. Do đó, gắn kết giữa APN và ARN có xu hướng mạnh hơn gắn kết giữa ADN và ARN. Do APN khác biệt rõ rệt với ADN trong cấu trúc hóa học, APN sẽ không được công nhận bởi (các) chất vận chuyển ở gan nhận biết ADN và sẽ hiển thị hồ sơ phân phối mô khác với hồ sơ phân phối mô của ADN hoặc PTO. Tuy nhiên, APN cũng thâm

nhập kém vào màng tế bào động vật có vú. [Adv. Drug Delivery Rev. vol 55, 267-280 (2003)]

Loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD): DMD là một bệnh teo cơ, ảnh hưởng đến một trên khoảng 3.500 trẻ em nam mới sinh. [Lancet Neurol. vol 9, 77-93 (2010)]. Bệnh nhân DMD dần mất chức năng cơ bắp và chết vì suy tim hoặc suy hô hấp trước khi đến tuổi 30. Ở nhiều bệnh nhân DMD, gen dystrophin bị đột biến để tạo ra ARN thông tin dystrophin với một codon kết thúc sớm (PTC) và biểu hiện một dystrophin không chức năng bị cắt ngắn thiếu phần đầu C. [Human Mol. Genetics vol 12(8), 907-914 (2003); and references therein]

Một cách tiếp cận phổ biến để điều trị DMD là nhảy Exon có PTC trong ARN thông tin dystrophin sử dụng ASO, và mã hóa protein biến thể cắt nối với đầu C thường được gọi là dystrophin đủ độ dài.

Nhảy Exon 23 của ARN thông tin Dystrophin ở Chuột MDX [chuột chuyển gen bị loạn dưỡng cơ Duchenne (chuột mdx)]: chuột mdx là một đột biến với PTC trong exon 23 của ARN thông tin dystrophin, và đã được phát triển rộng rãi như một mô hình động vật cho DMD ở người. [FEBS J. vol 280 (17), 4177-4186 (2013)]. Các ASO nhắm bổ sung vào vào ARN thông tin dystrophin ở chuột đã được đánh giá về khả năng gây ra nhảy Exon 23. [Artificial DNA: PNA & XNA vol 2(1), 6-15 (2011)]. Về vấn đề này, chuột mdx đã tỏ ra là một hệ thống mô hình tốt để đánh giá khả năng gây ra nhảy Exon của một nhóm oligonucleotit.

Một ASO PTO 20-mer 2'-OMe (2'-O-methyl phosphorothioat) bù đầy đủ chỗ nối của exon 23 và intron 23 (tức là vị trí cắt nối 5' (5' SS) của exon 23) đã được tiêm cục bộ vào cơ bắp của chuột mdx ở khoảng 10 µg/Kg khi được pha chế với chất chuyển nhiễm lưỡng tính F127, và làm tăng biểu hiện của dystrophin đủ độ dài trong mô cơ được tiêm bằng phương pháp Hóa mô miễn dịch (IHC) và Western blot cho dystrophin đủ độ dài. Những phát hiện bằng các phương pháp IHC và Western blot chỉ ra rằng exon 23 đã bị nhảy khi tiêm ASO cục bộ. ASO có một chồng lấp bổ sung 18-mer với đầu 5' của intron 23 và một chồng lấp bổ sung 2-mer với đầu 3' của exon 23. [Nature Med. vol 9(8), 1009-1014 (2003)]

Một ASO PTO 20-mer 2'-OMe khác bù đầy đủ điểm nối của exon 23 và intron 23 (tức là vị trí cắt nối 5' (5' SS) của exon 23) đã được đánh giá về khả năng gây ra nhảy Exon 23 của nó. Việc bổ sung ASO 20 me nhắm vào điểm nối của exon 23 và intron 23 và có một chồng lấp bổ sung 18 me với đầu 5' của intron 23 và một chồng lấp bổ sung 2 me với đầu 3' của exon 23. Thời gian ủ 96 giờ của nguyên bào cơ ở chuột với 2 hoặc 4 μ M ASO đã gây ra nhảy Exon 23 như được xác nhận bằng phương pháp RT-PCR lồng. Việc nhảy Exon 23 cũng được xác định bằng phương pháp RT-PCR ở chuột mdx đã nhận được hai mũi tiêm bắp 12,9 nmol của ASO. Nhảy Exon 23 đã được phát hiện trong các mô cơ của chuột mdx tiêm dưới da với ASO PTO 2'-OMe ở mức 50 mg/Kg. Một ASO 2'-FPS (2'-floro-phosphorothioat) 20-mer có trình tự giống như ASO PTO 2'-OMe đã nói ở trên cũng gây ra việc nhảy Exon 23 trong nguyên bào cơ ở chuột như ASO PTO 2'-OMe. Tuy nhiên, ASO 2'-FPS đã thất bại trong việc nhảy Exon 23 ở chuột mdx sau khi tiêm bắp hoặc tiêm dưới da. [Mol. Ther. Nucl. Acids vol 4, e265 (2015)].

Một Axit Peptit Nucleic 20 me (APN) nhắm bổ sung vào điểm nối của exon 23 và intron 23 được đánh giá về khả năng của nó tạo ra sự nhảy exon 23 ở chuột mdx. ASO APN 20 me có một chồng lấp bổ sung 18 me ở đầu 5' của intron 23 và một chồng lấp bổ sung 2 me ở đầu 3' của exon 23. APN 20 me này ở 250 nM gây ra sự xóa exon 23 trong các tế bào mdx H₂K như được phân tích bằng phương pháp RT-PCR lồng. Tiếp theo tiêm bắp ở mức 5 đến 20 μ g (khoảng 0,25 đến 2 mg/Kg) ở chuột mdx, APN 20 me này gây ra nhảy exon 23 trong mô cơ của vị trí tiêm. Hiệu quả nhảy Exon của APN 20 me này được kết luận là vượt trội so với hiệu quả của các ASO PTO 2'-OMe đã đề cập ở trên ở chuột mdx. APN 20 me này được gắn kết cộng hóa trị với các peptit thâm nhập tế bào khác nhau (CPPs) để cải thiện tính thấm của tế bào. Các liên hợp APN-CPP đó và APN không biến đổi có thể gây ra sự nhảy Exon 23 trong các tế bào cũng như trong mô cơ của vị trí tiêm. [Mol. Ther. vol 16(1), 38-45 (2008)].

Một ASO PMO 25-mer bù đầy đủ điểm nối của exon 23 và intron 23 (nghĩa là vị trí cắt nối 5' của exon 23) đã được đánh giá về khả năng của nó gây ra sự nhảy exon 23 ở chuột mdx. ASO 25-mer này có một chồng lấp bổ sung 18 me với

intron 23 và một chồng lắp bổ sung 7 me với exon 23. PMO 25 me này gây ra nhảy exon 23 ở chuột mdx sau khi tiêm tĩnh mạch nhiều lần với liều 2 mg cho mỗi con (khoảng 100 mg/Kg). [*Nat. Med.* vol 12 (2), 175-177 (2006)] PMO 25 me này được gắn kết cộng hóa trị với các peptit thâm nhập tế bào khác nhau (CPPs) để cải thiện tính thấm của tế bào. Những liên hợp PMO-CPP đó gây ra sự nhảy Exon 23 trong cơ bắp khi tiêm tĩnh mạch lần duy nhất ở mức 3 mg/Kg. [*Human Mol. Genet.* vol 18(22), 4405-4414 (2009)]

Nhảy Exon 46 của ARN thông tin dystrophin trong Nguyên bào cơ ở người bệnh DMD: Các ASO PTO 2'-OMe được thiết kế để nhắm bổ sung cho vùng tăng cường cắt nối bên trong mỗi exon (ESE) ở exon 46 trong tiền ARN thông tin dystrophin ở người, và được đánh giá hiệu quả nhảy exon 46 trong các tế bào nguyên bào cơ có nguồn gốc từ một người bệnh DMD thiếu exon 45 trong ARN thông tin dystrophin. Các tế bào đã được chuyển nạp ASO ở mức 1 μ M bằng phương pháp lipofection và được ủ trong 24 giờ cho đến khi chiết tách ARN bằng phương pháp RT-PCR lồng để phát hiện nhảy Exon 46. Nhiều ASO được thử nghiệm đã gây ra việc nhảy Exon 46. [*Human Mol. Genet.* vol 10(15), 1547-1554 (2001)]

Nhảy Exon 51 của ARN thông tin Dystrophin ở bệnh nhân DMD: Drisapersen (PRO051 hoặc GSK24022968) là một PTO 2'-OMe 20-mer được thiết kế để nhắm bổ sung vào vùng ESE trong exon 51 ở ARN tiền thông tin dystrophin ở người, và được đánh giá cho hoạt tính trị liệu ở những người bệnh DMD. Dựa trên đánh giá sinh thiết các mô cơ bằng phương pháp PCR lồng, drisapersen đã gây ra sự nhảy Exon 51 ở bệnh nhân DMD được tiêm dưới da từ 2 đến 6 mg/Kg mỗi tuần, mặc dù hiệu quả nhảy Exon không cao. [*N. Engl. J. Med.* vol 364, 1513-1522 (2011)]

Eteplirsen (AVI-4658) là một PMO 30 me được thiết kế để nhắm bổ sung vào ESE trong exon 51 ở tiền ARN thông tin của dystrophin ở người, và đã được đánh giá về hoạt tính trị liệu của nó ở bệnh nhân DMD. Dựa trên đánh giá sinh thiết các mô cơ bằng phương pháp IHC (hóa mô miễn dịch) cho dystrophin đủ độ

dài, eteplirsen đã gây ra nhảy Exon 51 ở bệnh nhân DMD nhận từ 2 đến 20 mg/Kg mỗi tuần bằng cách tiêm tĩnh mạch. [*Lancet* vol 378 (9791), 595-605 (2011)]

Nhảy Exon 27 của ARN thông tin APOB trong các tế bào HepG2: Apolipoprotein B (APOB) tạo thành một phần không thể thiếu của các hạt lipoprotein. ARN thông tin APOB bao gồm 29 exon. Các ASO APOB 2'-OMe ARN được thiết kế để nhắm vào vị trí cắt nối 3' của exon 27, vị trí cắt nối 5' của exon 27 hoặc cả vị trí cắt nối 3' và vị trí cắt nối 5'. Vị trí cắt nối 3' ASO (ASO 3'-SS) có một 15 me chồng lên intron 26 và một 5 me chồng lên exon 27. [*BMC Mol.Biol.* **2007**, 8:3. published 17 January 2007]. Vị trí cắt nối 5' ASO (ASO 5'-SS) có một 5 me chồng lên exon 27 và một 15 me chồng lên intron 27. Một ASO ARN 2'-OMe 40-mer được thiết kế bằng cách hợp nhất cộng hóa trị ASO 3'-SS với ASO 5'-SS. Như vậy, ASO 40 me có khả năng tương tác đồng thời với vị trí cắt nối 3' cũng như vị trí cắt nối 5'.

Các ASO được đánh giá về khả năng của chúng trong việc gây ra nhảy exon 27 trong các tế bào HepG2 bằng phương pháp lipofection. Thật thú vị khi lưu ý rằng cả ASO 3'-SS và ASO 5'-SS đều thất bại trong việc gây ra nhảy exon 27 trong các tế bào HepG2 ở mức 25 đến 250 nM. Trong khi đó, ASO 40 me cho thấy mức độ rõ rệt của nhảy exon 27 theo cách phụ thuộc liều ở mức 25 đến 250 nM. Có vẻ như một chồng lấp bổ sung 15 me của ARN 2'-OMe chỉ lên phần intron của một vị trí cắt nối sẽ không đủ để ức chế hiệu quả sự hình thành phức hợp spliceosome ban đầu. Gắn kết chặt chẽ hơn với vị trí cắt nối kéo dài từ exon 27 của tiền ARN thông tin APOB sẽ được mong muốn gây ra nhảy exon bằng cách ức chế hiệu quả sự hình thành phức hợp spliceome ban đầu trong các tế bào HepG2.

Cắt nối chọn lọc tiền ARN thông tin Bcl-x: BCL2L1 (Bcl-x) là một gen mã hóa Bcl-xL hoặc Bcl-xS ở người thông qua cắt bỏ chọn lọc. Một ASO PTO 2'-OMe 18-mer được thiết kế để nhắm vào vị trí cắt nối 5' (5' SS) của exon 2 và có một chồng lấp bổ sung 16 me lên exon 2 và một chồng lấp 2 me lên intron 2. Bằng phương pháp lipofection ở mức 80 đến 400 nM, ASO đã thúc đẩy sản xuất tế bào Bcl-xS thông qua cắt bỏ chọn lọc trong một nhóm các tế bào ung thư bao gồm

MCF7, PC3, Du145, HeLa và MDA MB231. [J. Biol. Chem. vol 277(51), 49374-49382 (2002)].

Việc hiệu chỉnh cắt nối tế bào tự do trong ống nghiệm ở tiền ARN thông tin β -Globin: Bệnh thalassemia là do rối loạn máu di truyền gây ra bởi sự bất thường trong việc hình thành hemoglobin. Một đột biến hiếm gặp của IVS2⁷⁰⁵ được tìm thấy ở bệnh nhân thalassemia vùng Địa Trung Hải mang đột biến điểm [T $\rightarrow$ G] ở vị trí nucleotit 705 ở intron 2 của gen β -globin ở người. Đột biến IVS2⁷⁰⁵ tạo thêm một vị trí cắt nối 5' và kích hoạt một vị trí cắt nối 3' bí ẩn tại vị trí 579 của intron này. Đột biến IVS2⁷⁰⁵ gây ra sự cắt bỏ chọn lọc để chèn 127 nucleotit, tức là nucleotit 579-705 của intron giữa exon 2 và exon 3. [J. Biol. Chem. vol 260, 16332-16337 (1985)]

ASO ARN 2'-OMe 17-mer bù đầy đủ vị trí cắt nối ẩn 5' của đột biến IVS2⁷⁰⁵ đã được đánh giá về khả năng sửa lỗi cắt nối khác thường (aberrant splicing) của nó trong một tế bào tự do trong hệ thống cắt nối trong ống nghiệm. ASO có một chồng lắp 8 me với intron và một chồng lắp 9 me với exon ẩn. ASO đã hiệu chỉnh một cách hiệu quả cắt nối khác thường ở mức 0,12 đến 2 μ M để mang lại ARN thông tin mà không cần exon ẩn có nguồn gốc từ intron 2. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol 90, 8673-8677 (1993)]. Hệ thống cắt nối trong ống nghiệm là tế bào tự do và do đó không yêu cầu bất kỳ tác nhân phân phối nào gây ra nhảy exon. ASO đã gây ra nhảy exon ở 120 nM trong hệ thống cắt nối tế bào tự do. Nếu ASO có ái lực mạnh hơn đối với vị trí cắt nối 5', hoạt động nhảy exon đã có thể có hiệu lực hơn. Để cải thiện hiệu lực nhảy Exon, người ta mong muốn sử dụng ASO có một ái lực mạnh cho vị trí cắt nối 5' (5' SS).

Hiệu chỉnh cắt nối của tiền ARN thông tin luciferaza trong các tế bào HeLa pLuc/705 bởi ARN 2'-OMe: pLuc/705 là một gen luciferaza bị biến đổi để có intron 2 của đột biến IVS2⁷⁰⁵ của β -globin ở người được chèn giữa các nucleotit 1368 và 1369. Các tế bào HeLa pLuc/705 biểu hiện ổn định gen pLuc/705 luciferaza đã bị biến đổi. Các tế bào HeLa bị biến đổi biểu hiện một ARN thông tin luciferaza với exon ẩn giữa các nucleotit 1368 và 1369, và do đó mã hóa một protein biến thể luciferaza không hoạt động.

Một oligonucleotit ARN 2'-OMe 17-mer nhắm bổ sung vào vị trí cắt nối ẩn 5' của đột biến IVS2⁷⁰⁵ (một chồng lắp có 8-mer với intron và một chồng lắp 9-mer với exon ẩn) được đánh giá về khả năng của nó trong việc hiệu chỉnh sự cắt nối bất thường của tiền ARN thông tin luciferaza đã bị biến đổi trong các tế bào HeLa pLuc/705. Với phương pháp lipofection ở mức 20 đến 500 nM, ASO 17 me đã khôi phục lại hoạt tính luciferaza của tế bào theo cách phụ thuộc vào liều. Exon ẩn đã được thấy bị tách ra bởi việc điều trị với ASO bằng phân tích phương pháp RT-PCR. Hoạt động nhảy Exon được quan sát ở nồng độ 20 nM hoặc cao hơn. [*Hóa sinh* tập 37, 6235-6239 (1998)]

Hiệu chỉnh cắt nối tiền ARN thông tin Luciferaza trong các tế bào HeLa pLuc/705 của APN: Các dẫn xuất APN 17-mer nhắm bổ sung vào vị trí cắt nối ẩn 5' của đột biến IVS2⁷⁰⁵ (có một chồng lắp 8-mer với intron và một chồng lắp 9-mer với exon ẩn) đã được đánh giá về khả năng hiệu chỉnh sự cắt nối bất thường của tiền ARN thông tin đã luciferaza bị biến đổi trong các tế bào HeLa pLuc/705. Các dẫn xuất APN đó đã được thiết kế để có một số nhóm phosphonat khác nhau gắn kết cộng hóa trị với đầu N của trình tự APN. [Nucl. Acids Res. vol 30(13), 4424-4432 (2008)]. Sự liên hợp cộng hóa trị của các gốc phosphonat với APN đã được đưa vào để tạo điều kiện cho việc truyền vào tế bào bằng phương pháp lipofection.

Dựa vào phương pháp lipofection ở mức 2,5 đến 60 nM, các ASO APN đã khôi phục hoạt tính luciferaza ở tế bào theo cách phụ thuộc vào liều lượng. Exon ẩn đã được thấy bị tách ra trong quá trình điều trị với ASO bằng phương pháp RT-PCR. Các ASO APN có nhiều nhóm phosphonat gắn kèm theo cho thấy hiệu lực và hiệu quả cao hơn trong việc tách exon ẩn. Một ASO APN với 12 nhóm phosphat cho thấy hiệu quả nhảy Exon là 81% ở mức 2,5 nM.

Hiệu lực dưới mức nanomol (10^{-9} mol) được quan sát thấy của nhảy exon gây ra bởi ASO APN mạnh hơn nhiều so với hiệu lực của ASO ARN 2'-OMe17-mer. [Biochemistry vol 37, 6235-6239 (1998)]. APN sẽ rất hữu ích để tạo ra sự nhảy Exon một cách hiệu lực, nếu bị biến đổi đúng cách để đưa vào tế bào.

Nhảy exon tiền ARN thông tin FOLH1 với PTO 2'-OMe: Kháng nguyên màng đặc hiệu tuyến tiền liệt (PSMA) là sản phẩm của gen folate hydrolaza (FOLH1), và được biểu hiện cao trong các mô tuyến tiền liệt ác tính. Các ASO PTO 2'-OMe nhắm vào tiền ARN thông tin FOLH1 đã được đánh giá về khả năng của chúng trong việc gây ra nhảy exon trong các tế bào ung thư tuyến tiền liệt LNCap tiếp sau sự chuyển nạp bằng phương pháp lipofection. [*Oligonucleotits*, vol 16, 186-175 (2006)]

SSO1 là một ASO 18 me nhắm vào vị trí cắt nối 5' of của exon 1 và có một chồng lấp bổ sung 16 me với exon 1 và một chồng lấp 2 me với intron 1. SSO6 và SSO18 là các ASO 18-mer nhắm bổ sung vào exon 6 và exon 18, một cách tương ứng.

SSO1 gây ra sự cắt bỏ chọn lọc với IC50 khoảng 400 nM. SSO6 gây ra nhảy Exon 6 với IC50 khoảng 4 nM. SSO18 gây ra việc nhảy Exon 18 với IC50 khoảng 4 nM.

Thật thú vị khi để ý rằng SSO6 và SSO18 nhắm vào khu vực bên trong exon (nghĩa là vị trí vùng tăng cường cắt nối bên trong mỗi exon) gây ra nhảy exon một cách hiệu lực hơn nhiều so với SSO1 nhắm vào vị trí cắt nối 5'. Nhắm vào vùng ESE với ASO PTO 2'-OMe đã được thấy là hiệu quả hơn so với nhắm vào vị trí cắt nối trong ví dụ thực hiện sáng chế này.

Việc cắt bỏ chọn lọc tiền ARN thông tin IL-5R α với ARN 2'-O-MOE: Các ASO ARN 2'-O-MOE (ARN 2'-O-metoxyletyl) nhắm bổ sung cho tiền ARN thông tin IL-5R α ở chuột đã được đánh giá về khả năng của chúng trong việc gây ra sự cắt bỏ chọn lọc (nghĩa là nhảy Exon) trong các tế bào BCL1 tiếp sau sự chuyển nạp bằng kỹ thuật xung điện. [*Mol. Pharmacol.* vol 58, 380-387 (2000)].

Các ASO được thiết kế bằng cách quét bổ sung các vùng khác nhau của exon 9 và các vị trí cắt nối ở cạnh exon 9. Một ASO 20 me bù đầy đủ vị trí cắt nối 3' (3' SS) của exon 9 với một chồng lấp 4 me với intron 8 đã gây ra sự cắt bỏ chọn lọc rõ rệt ở 10 μ M. Các ASO nhắm vào khu vực bên trong exon của exon 9 đã gây ra sự cắt bỏ chọn lọc ở 10 μ M với hiệu quả tương đương với ASO 3'SS. Tất cả các ASO được thử nghiệm đều gây ra cắt bỏ chọn lọc, chỉ ra rằng exon 9 và

các vị trí cắt nối của nó rất dễ bị nhảy Exon. Vị trí cắt nối 3' dễ bị ảnh hưởng hơn vị trí cắt nối 5'.

Các ASO 20 me cũng được thiết kế để nhắm bổ sung cho các vị trí cắt nối ở cạnh exon 8 với một chồng lấp 4 me với intron. Các ASO gây ra nhảy Exon 8 ở mức 10 μ M, mặc dù ASO 3'SS là hiệu quả hơn so với ASO 5'SS.

Hiệu lực nhảy exon ở mức micromol của các ASO ARN 2'-O-MOE bằng kỹ thuật xung điện được coi là rất kém so với hiệu lực nhảy Exon ở mức nanomol của ASO PTO 2'-OMe nhắm vào tiền ARN thông tin FOLH1. [*Oligonucleotits*, vol 16, 186-175 (2006)]. Phương pháp lipofection sẽ hiệu quả hơn so với kỹ thuật xung điện để truyền oligonucleotit với trụ cột tích điện âm vào tế bào.

Nhảy Exon 10 của tiền ARN thông tin Tau với PTO 2'-O-MOE: vị trí cắt nối 5' của exon 10 trong tiền ARN thông tin tau có trình tự 18 me có thể điều chỉnh để tạo thành một vòng đoạn và sẽ không phù hợp đối với sự hình thành phức hợp Spliceosome E. Do đó, exon 10 của tiền ARN thông tin tau rất dễ bị nhảy.

Các ASO PTO 2'-O-MOE nhắm vào vị trí cắt nối 3' hoặc vị trí cắt nối 5' của tau exon 10 đã được đánh giá về khả năng tăng cường nhảy Exon 10 của chúng. [*J. Biol. Chem.* vol 276(46), 42986-42993 (2001)]. E10 α là một ASO 18-mer nhắm bổ sung vào vị trí cắt nối 3'. E10 α có một chồng lấp 10 me với intron 9 và một chồng lấp 8 me với exon 10. E10 β là một ASO 21-mer nhắm bổ sung vào vị trí cắt nối 5'. E10 β có một chồng lấp 8-mer với exon 10 và một chồng lấp 13-mer với intron 10.

Tiếp sau sự chuyển nạp vào tế bào COS-1 bằng phương pháp lipofection, E10 α và E10 β gây ra sự nhảy exon 10 với IC₅₀ 2-5 nM. Trong các tế bào PC12 được chuyển nạp bằng kỹ thuật xung điện, các ASO tạo ra nhảy exon 10 với IC₅₀ ở mức micromol.

Nhảy Exon 2 của tiền ARN thông tin MyD88 với ASO ARN 2'-O-MOE: MyD88 là một protein thích ứng có liên quan đến việc kích hoạt NF- κ B do IL-1R và TLR gây ra. Các ASO ARN 2'-O-metoxymethyl (2'-O-MOE) 20-mer được thiết kế để nhắm bổ sung vào vị trí cắt nối 3' hoặc vị trí cắt nối 5' của exon 2 trong tiền

ARN thông tin MyD88 ở người. Các ASO 20 me được thiết kế để có một chồng lắp 0, 5, 10, 15 hoặc 20 me với đầu 5' của intron 1 (nghĩa là vị trí cắt nối 3' của exon 2) hoặc đầu 3' của intron 2 (nghĩa là vị trí cắt nối 5' của exon 2). Các ASO đã được đánh giá về khả năng gây ra nhảy exon 2 trong các tế bào A549 tiếp sau sự chuyển nạp bằng phương pháp lipofection. [J. Immunol. vol 176, 3652-3661 (2006)]

Trong số các ASO, ASO có một chồng lắp 20 me với intron 1 ở vị trí cắt nối 3' của exon 2 gây ra nhảy exon 2 một cách hiệu lực và hiệu quả nhất. IC₅₀ được quan sát gây nhảy exon 2 là từ 50 đến 100 nM. Các ASO nhắm vào vị trí cắt nối 5' không hiệu quả bằng các ASO nhắm vào vị trí cắt nối 3'. Trong số các ASO nhắm vào vị trí cắt nối 5', ASO mạnh nhất là ASO có một chồng lắp 20 me với đầu 3' của exon 2.

Trong số các ASO ARN 2'-O-MOE được thiết kế tương tự để nhắm bổ sung vào vị trí cắt nối 3' hoặc vị trí cắt nối 5' của exon 2 trong tiền ARN thông tin MyD88 ở chuột, ASO có một chồng lắp 20 me với đầu 5' của exon 2 gây hiệu lực nhất cho nhảy Exon 2 trong các tế bào RAW 264.7 được chuyển nạp bằng phương pháp lipofection.

ASO mạnh nhất trong các tế bào chuột được tiêm hai lần mỗi tuần trong 2 tuần với liều 50 mg/Kg. Có sự giảm đáng kể trong tiền ARN thông tin MyD88 từ 60 đến 85% ở ruột, mô mỡ và gan. 50 mg/Kg là một liều lớn có thể gây ra tác dụng phụ điển hình của trị liệu oligonucleotit với trụ cột riboza phosphat. Cần phải cải thiện rõ rệt hiệu lực nhảy Exon nếu các ASO ARN 2'-O-MOE cho thấy hoạt động trị liệu mà không chịu tác dụng phụ điển hình.

Phục hồi Exon 7 trong SMN2 bởi Nusinersen: teo cơ cột sống (SMA) là một bệnh hiểm gập đe dọa đến tính mạng do xóa hoặc mất chức năng trong gen SMN1 (sự sống sót của dây thần kinh vận động 1). Con người có gen SMN2 paralogous có trình tự mã hóa giống hệt nhau ngoại trừ 11 nucleotit. Một SNP (đa hình đơn nucleotit) từ C đến T trong SMN2 exon 7 gây ra sự nhảy exon 7, làm cho ARN thông tin biến thể cắt nối mã hóa protein biến thể SMN2 được chuyển hóa nhanh chóng. Do đó, đột biến SMN2 không thể bù đắp sự thiếu hụt chức năng

của protein SMN1, dẫn đến sự bùng phát SMA. [Neurology vol 86, 890-897 (2016)]

Nusinersen (SpiranzaTM) là một ASO ARN 2'-O-MOE 18-mer nhằm bổ sung vào vùng tắt cắt nối trong SMN2 intron 7. Vì nusinersen ngăn chặn hoàn toàn sự gắn kết của protein tắt cắt nối, exon 7 được giữ lại hoặc khôi phục để tạo ra protein SMN2 có đủ độ dài. Nusinersen khôi phục quy trình nối thông thường bằng cách gắn kết với vùng tắt cắt nối nằm trong SMN2 intron 7.

Nusinersen đã được FDA Hoa Kỳ chấp thuận vào năm 2016 để điều trị SMA. Nusinersen được tiêm tĩnh mạch một lần 12 mg mỗi quý hoặc hai quý. Nusinersen ở lại trong tủy sống với thời gian bán hủy từ 135 đến 177 ngày trong dịch não tủy (CSF). [Nusinersen US Label, FDA, December 2016].

Hiệu lực điều trị của Liệu pháp Oligonucleotit cho Nhảy Exon: Như trong các trường hợp điển hình được trích dẫn phía trên trong tài liệu này, oligonucleotit với trụ cột phosphat gây ra nhảy exon với hiệu lực ở mức nanomol trong các tế bào được chuyển nạp bằng phương pháp lipofection, nhưng với hiệu lực micromol trong các tế bào được coi là oligonucleotit "nguyên dạng".

Hiệu lực nhảy exon ở mức micromol của tiền ARN thông tin MyD88 đã được chuyển thành liều trị liệu 10 mg/Kg hoặc cao hơn khi điều trị toàn thân dưới dạng oligonucleotit "nguyên dạng" ở chuột. [J. Immunol. vol 176, 3652-3661 (2006)]. Với liều điều trị cao như vậy, oligonucleotit với trụ cột phosphat dễ bị tác dụng phụ miễn dịch. Do đó, việc phát triển một phương pháp hoặc công thức để cải thiện rõ rệt liều điều trị là điều rất được mong muốn.

Drisapersen, một PTO 2'-OMe 20-mer được thiết kế để gây nhảy exon 51 trong tiền ARN thông tin dystrophin ở người, đã gây ra nhảy exon 51 ở bệnh nhân DMD được tiêm ASO dưới da ở mức 2 đến 6 mg/Kg mỗi tuần dưới dạng oligonucleotit nguyên dạng, mặc dù hiệu quả nhảy exon không cao. [N. Engl. J. Med. vol 364, 1513-1522 (2011)]. Có một mối lo ngại trong việc tăng liều điều trị của drisapersen do độc tính khi sử dụng quá liều/mức độ.

APN và PMO có trụ cột trung tính, không được hệ thống miễn dịch (đặc biệt là thụ thể giống Toll) công nhận và sẽ không có các phản ứng miễn dịch như thường thấy ở oligonucleotit với trụ cột phosphat.

Eteplirsen (AVI-4658), một PMO 30 me được phát triển để gây nhảy exon 51 ở tiền ARN thông tin dystrophin ở người, đã được dung nạp tốt ở bệnh nhân DMD nhận ASO bằng cách tiêm tĩnh mạch 2 đến 20 mg/Kg mỗi tuần. [*Lancet* vol 378 (9791), 595-605 (2011)] Gần đây, eteplirsen đã nhận được sự chấp thuận nhanh chóng từ FDA Hoa Kỳ để sử dụng cho bệnh nhân DMD.

Mặc dù nusinersen là một ASO có khả năng phục hồi exon thay vì nhảy Exon, liều điều trị được phê duyệt là 12 mg mỗi quý là khá hấp dẫn. Sự hấp thu tế bào thần kinh hiệu quả sau khi tiêm tủy sống được coi là có trách nhiệm cao đối với hiệu lực của nusinersen.

Sự phát triển lâm sàng của phương pháp điều trị bằng oligonucleotit với trụ cột phosphat đã bị cản trở nghiêm trọng bởi độc tính giới hạn liều bao gồm độc tính miễn dịch thông qua kích hoạt các thụ thể giống Toll hoặc kích hoạt bổ sung, độc tính đặc hiệu mô ở gan hoặc thận. Bằng cách cải thiện hiệu lực điều trị in vivo, độc tính giới hạn liều như vậy có thể được khắc phục.

Oligonucleotit rất đắt tiền để sản xuất. Mức hiện tại của liều điều trị ở người là 100 mg đến 2 g mỗi tuần được chuyển thành chi phí API từ 100 đến 2.000 USD (đô la Mỹ) mỗi tuần, nếu chi phí sản xuất API được giả định chung là 1,000 USD mỗi gram. Trong thực tế, chi phí sản xuất API của phương pháp trị liệu oligonucleotit vượt quá 1,000 USD mỗi gram. Do đó, sẽ có yêu cầu mạnh mẽ từ các bên liên quan đến chăm sóc sức khỏe để cải thiện rõ rệt hiệu lực điều trị nhằm cung cấp liệu pháp điều trị oligonucleotit với chi phí điều trị hàng năm phải chăng cho việc sử dụng kinh niên.

Tính thấm tế bào tốt của Oligonucleotit: Màng tế bào là hàng rào hai lớp lipid được tiến hóa qua hàng tỷ năm. Màng tế bào thực sự hoạt động như một rào cản lớn đối với các oligonucleotit antisense sợi đơn có kích thước từ 4 đến 10K Da. Sự phân phối vào tế bào của các ASO như vậy bằng cách thâm nhập trực tiếp vào màng tế bào về mặt thực tế là không thể. Có những con đường khác cho sự

hấp thu vào tế bào của các oligonucleotit sợi đơn. Để trích dẫn một số, endocytosis trung gian vận chuyển trong tế bào gan như đã thấy với mipomersen nhắm vào ApoB100, sự hấp thu tế bào thần kinh (có khả năng là endocytosis) như quan sát với nusinersen, hấp thu tế bào qua trung gian GalNac (N-acetylgalactosamin), v.v. Tuy nhiên, các con đường hấp thu tế bào như vậy phụ thuộc rất nhiều vào các mô và hầu như không áp dụng chung cho hầu hết các loại mô. [Nature Biotechnol. vol 35(3), 222-229 (2017)]

Có thể tạo ra oligonucleotit một cách đúng đắn với trụ cột phosphat để có tính thấm tế bào tốt, và oligonucleotit có công thức như vậy được dự đoán sẽ cho thấy hiệu lực điều trị in vivo tốt hơn so với oligonucleotit "nguyên dạng" (không có công thức). Cho rằng oligonucleotit với trụ cột phosphat đã cho thấy hiệu lực nhảy Exon ở mức nanomol ở hầu hết các tế bào nếu được chuyển nạp bằng phương pháp lipofection, hiệu lực điều trị in vivo đối với một oligonucleotit được tạo ra để có khả năng thâm thấu tế bào tốt sẽ được cải thiện rõ rệt khi mà hiệu lực nhảy exon in vitro ở mức nanomol ra lệnh. Do đó tính thấm tế bào tốt sẽ rất quan trọng đối với hiệu lực điều trị in vivo của oligonucleotit gây ra nhảy Exon. Tuy nhiên, việc phát triển một công thức khơi gợi sự phân phối tốt vào các mô vẫn là một thách thức kỹ thuật lớn trong lĩnh vực trị liệu oligonucleotit.

Các Nucleobazơ được biến đổi của APN để có tính thấm tế bào tốt và có ái lực cao: Như đã trích dẫn trước đó, các dẫn xuất APN được thiết kế để có một số nhóm phosphonat khác nhau được gắn kết cộng hóa trị để tạo điều kiện thuận lợi cho việc đưa vào trong tế bào bằng phương pháp lipofection. Các ASO APN như vậy đã được thấy là thể hiện hiệu lực nhảy exon ở mức dưới nanomol trong các tế bào HeLa dựa trên phương pháp lipofection. [Nucl. Acids Res. vol 30(13), 4424-4432 (2008)] Hiệu lực ở mức dưới nanomol mạnh hơn đáng kể so với hiệu lực nhảy Exon đã quan sát thấy ở các ASO với trụ cột phosphat. Do đó, APN sẽ hữu ích trong việc gây ra nhảy exon một cách hiệu lực nếu được đưa vào tế bào đúng cách.

APN đã được tạo ra có thể thấm tốt vào màng tế bào động vật có vú bằng cách đưa các nucleobazơ đã được biến đổi với lipit dạng cation hoặc tương đương

của nó được gắn cộng hóa trị kèm theo. Các cấu trúc hóa học của các nucleobazơ đã được biến đổi như vậy được minh họa trong Hình 6C. Các nucleobazơ đã được biến đổi như vậy của cytosine, adenine và guanine đã được thấy là có khả năng lai với guanine, thymine và cytosine, một cách tương ứng. [PCT Appl. No. PCT/KR2009/001256; EP2268607; US8680253]

Việc kết hợp các nucleobazơ đã bị biến đổi như vậy vào APN mô phỏng các tình huống của phương pháp lipofection. Bằng phương pháp lipofection, các phân tử oligonucleotit được bao bọc hoặc tạo phức với các phân tử lipid cation như lipofectamine và các phức hợp lipofectamine/oligonucleotit như vậy có xu hướng xâm nhập vào màng tế bào khá dễ dàng so với các phân tử oligonucleotit nguyên dạng.

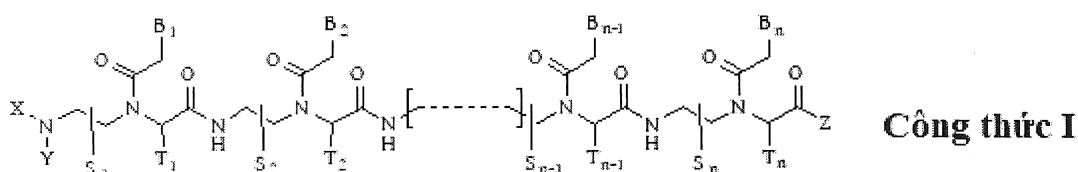
Ngoài khả năng thấm màng tốt, các dẫn xuất APN này được thấy là có ái lực cực mạnh đối với axit nucleic bổ sung. Ví dụ, việc kết hợp 4 đến 5 nucleobazơ đã bị biến đổi vào các dẫn xuất APN từ 11 đến 13 me dễ dàng mang lại mức tăng T_m từ 20°C trở lên trong sự hình thành song công với ADN bổ sung.

Các dẫn xuất APN như vậy đã được thấy rất nhạy cảm với một bazơ đơn không phù hợp. Một bazơ đơn không phù hợp dẫn đến sự giảm T_m từ 11 đến 22°C tùy thuộc vào loại bazơ bị biến đổi cũng như trình tự APN.

Với tính thấm màng tốt và ái lực cực cao đối với axit nucleic, các dẫn xuất APN với các nucleobazơ đã được biến đổi như vậy sẽ hữu ích để tạo ra sự nhảy Exon một cách hiệu lực.

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 giữa 10 và 25;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lấp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối đích 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon bên trong một tiền ARN thông tin đích;

hợp chất của Công thức I bổ sung đầy đủ cho trình tự tiền ARN thông tin đích, hoặc bổ sung một phần cho trình tự tiền ARN thông tin đích với một hoặc hai sự không phù hợp;

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

X và Y độc lập là gốc hydrido, formyl [HC(=O)-], aminocarbonyl [NH₂-C(=O)-], aminothiocarbonyl [NH₂-C(=S)-], alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminothiocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminothiocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkyloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, arylsulfonyl được thế hoặc không được thế, alkylphosphonyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc arylphosphonyl được thế hoặc không được thế;

Z là gốc hydrido, hydroxy, alkyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, amino [-NH₂] không được thế, alkylamino được thế hoặc không được thế, arylamino được thế hoặc không được thế, alkyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn 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 được thể hoặc không được thể gắn kết cộng hóa trị với gốc nucleobazơ.

Theo một số phương án, hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lắp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối đích 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon bên trong một tiền ARN thông tin đích, trong đó trình tự vị trí cắt nối đích không phải là $[(5' \rightarrow 3') \text{UUGCCUGGUAAGGA}]$ bên trong tiền ARN thông tin của thụ thể androgen ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{UUUUUGCGUAAGUA}]$ bên trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{UAAGUAGGAUAAGU}]$ bên trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{AUCCCAGGGUAACA}]$ bên trong tiền ARN thông tin SNAP25 ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{UGUUUAGGUACACU}]$ bên trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người, hoặc $[(5' \rightarrow 3') \text{UGUACAGAUUGUCU}]$ bên trong tiền ARN thông tin tyrosinaza ở người.

Theo một số phương án, hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lắp bổ sung 10 me với vị trí cắt nối đích trong một tiền ARN thông tin đích, trong đó trình tự vị trí cắt nối đích không bao gồm $[(5' \rightarrow 3') \text{UUGCCUGGUAAGGA}]$ bên trong tiền ARN thông tin của thụ thể androgen ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{UUUUUGCGUAAGUA}]$ bên trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{UAAGUAGGAUAAGU}]$ bên trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{AUCCCAGGGUAACA}]$ bên trong tiền ARN thông tin SNAP25 ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{UGUUUAGGUACACU}]$ bên trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người, hoặc $[(5' \rightarrow 3') \text{UGUACAGAUUGUCU}]$ bên trong tiền ARN thông tin tyrosinaza ở người.

Hợp chất của công thức I có khả năng gây ra việc nhảy Exon đích của tiền ARN thông tin đích, tạo ra (các) biến thể cắt nối ARN thông tin thiếu exon đích, và do đó rất hữu ích để điều chỉnh hoạt động chức năng của gen phiên mã tiền ARN thông tin đích.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1A. Minh họa việc đánh số cho các intron và exon trong tiền ARN thông tin.

Hình 1B. Sơ đồ minh họa ngắn gọn quá trình cắt nối.

Hình 2A. Các biến thể cắt nối ARN thông tin AR mã hóa các protein AR biến thể.

Hình 2B. Các biến thể cắt nối ARN thông tin HIF-1 α mã hóa các protein HIF-1 α biến thể.

Hình 3. Sơ đồ minh họa các quá trình sinh học liên quan đến sự hình thành phức hợp spliceosome ban đầu.

Hình 4A. Một phần của CDS đọc ra từ ARN thông tin HIF-1 α ở người.

Hình 4B. Trình tự điểm nối exon-exon của các biến thể cắt nối HIF-1 α thiếu exon 3 (trái) và exon 3-4 (phải) minh họa dịch khung (ra ngoài khung) và trong khung, một cách tương ứng.

Hình 4C. Sự dịch khung điển hình mang lại một PTC.

Hình 5A. Sơ đồ minh họa phương pháp RT-PCR lồng để phát hiện nhảy Exon.

Hình 5B. Sơ đồ minh họa sự hình thành của các EIciARN trong quá trình nhảy Exon.

Hình 6A. Cấu trúc hóa học của các oligonucleotit không tự nhiên tiêu biểu.

Hình 6B. Cấu trúc hóa học và danh pháp viết tắt của APN nguyên mẫu.

Hình 6C. Các nucleobazơ đã bị biến đổi được phát triển để cải thiện tính thấm màng của APN.

Hình 7. Ví dụ về các nucleobazơ (bị biến đổi) tự nhiên hoặc không tự nhiên có thể lựa chọn làm dẫn xuất axit nucleic peptit của công thức I.

Hình 8A. Ví dụ về các gốc alkyl được thế hoặc không được thế có thể lựa chọn làm hợp chất của Công thức I.

Hình 8B. Ví dụ về alkylaxyl được thế hoặc không được thế, và các gốc arylaxyl được thế hoặc không được thế có thể lựa chọn làm hợp chất của công thức I.

Hình 8C. Ví dụ về alkylamin được thế, arylamino được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, arylsulfonyl được thế hoặc không được thế, alkylphosphonyl được thế hoặc không được thế, và các gốc arylphosphonyl được thế hoặc không được thế có thể lựa chọn làm hợp chất của công thức I.

Hình 8D. Ví dụ về alkyloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, và các gốc arylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế có thể lựa chọn làm hợp chất của công thức I.

Hình 8E. Ví dụ về alkyloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminothiocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminothiocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkyloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế, và các gốc aryloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế có thể lựa chọn làm hợp chất của công thức I.

Hình 9. Cấu trúc hóa học của các monome APN với nucleobazơ tự nhiên hoặc bị biến đổi.

Hình 10. Cấu trúc hóa học các chữ viết tắt của các nhóm thế đầu N hoặc đầu C.

Hình 11. Cấu trúc hóa học của dẫn xuất APN 14 me của (N → C) Fethoc-GA(5)A-C(1O2)TT-A(5)TC-CTA(5)-C(1O2)T-NH₂.

Hình 12. Cấu trúc hóa học của dẫn xuất APN 15 me của (N → C) Fmoc-Val-CTC(1O2)-A(5)TC-CTA(6)-C(1O3)TT-AA(2O2)C-NH₂.

Hình 13. Cấu trúc hóa học của các monome Fmoc-APN được sử dụng để tổng hợp các dẫn xuất APN của sáng chế.

Hình 14. Chu kỳ kéo dài monome điển hình được áp dụng trong tổng hợp peptit pha rắn.

Hình 15A. Sắc phổ HPLC pha đảo C₁₈ cho "HIF-ASO 1" trước khi tinh chế.

Hình 15B. Sắc phổ HPLC pha đảo C₁₈ cho "HIF-ASO 1" sau khi tinh chế HPLC.

Hình 16. Khối phổ ESI-TOF của "HIF-ASO 1" được tinh chế bằng HPLC điều chế pha đảo C₁₈.

Hình 17A. Vị trí đích của các môi đặc hiệu exon được sử dụng trong phương pháp PCR lồng HIF-1 α để phát hiện nhảy Exon gây ra bởi "HIF-ASO 2" trong các tế bào HeLa.

Hình 17B. Dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng HIF-1 α trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 2" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM.

Hình 17C. Dữ liệu giải trình tự Sanger của dải sản phẩm PCR được chỉ định nhảy exon 2 HIF-1 α .

Hình 18A. Dữ liệu Western blot HIF-1 α trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 2" ở 0 zM (đối chứng âm), 10 zM, 100 zM, 1 aM hoặc 10 aM trong 24 giờ.

Hình 18B. Mức độ biểu hiện protein HIF-1 α tương đối được chuẩn hóa so với β -actin trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 2" ở 0 zM (đối chứng âm), 10 zM, 100 zM, 1 aM hoặc 10 aM trong 24 giờ. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 18C. Phương pháp qPCR lồng HIF-1 α thực hiện bởi SYBR Green trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 2" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 18D. Phương pháp qPCR lồng HIF-1 α bằng đầu dò TaqMan trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 2" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 19A. Dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng HIF-1 α trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 6" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM.

Hình 19B. Dữ liệu Western blot HIF-1 α trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 6" ở 0 zM (đối chứng âm), 10 zM, 100 zM hoặc 1 aM trong 24 giờ.

Hình 19C. Mức biểu hiện HIF-1 α được chuẩn hóa so với β -actin trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 6" ở 0 zM (đối chứng âm), 10 zM, 100 zM hoặc 1 aM trong 24 giờ. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 20A. Dữ liệu qPCR lồng bởi SYBR Green trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 6" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 20B. Dữ liệu qPCR lồng bằng đầu dò TaqMan trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 6" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 21A. Dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng HIF-1 α trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 1" ở 0 (đối chứng âm), 1, 3, 10, 30 hoặc 100 aM (trái); và dữ liệu giải trình tự Sanger của sản phẩm PCR có thể gán cho nhảy Exon 2-3 (phải).

Hình 21B. Dữ liệu Western blot HIF-1 α trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 1" trong 72 giờ ở 0 zM (đối chứng âm), 100 zM, 300 zM, 1 aM, 3 aM, 10 aM, 30 aM, 100 aM hoặc 300 aM.

Hình 21C. Mức biểu hiện HIF-1 α được chuẩn hóa so với β -actin trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 1" trong 72 giờ ở 0 zM (đối chứng âm), 100 zM, 300 zM, 1 aM, 3 aM, 10 aM, 30 aM, 100 aM hoặc 300 aM.

Hình 22A. Dữ liệu PCR lồng HIF-1 α trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 12" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM (trái) cùng với dữ liệu giải trình tự Sanger của dải nhảy Exon (phải).

Hình 22B. Dữ liệu Western blot HIF-1 α trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 12" ở 0 (đối chứng âm), 0,01, 0,1, 1 hoặc 10 aM.

Hình 22C. Dữ liệu qPCR lồng HIF-1 α thu được trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 12" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 23A. Phân tích điện di của các sản phẩm PCR lồng AR trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "AR-ASO 1" trong 3 giờ ở 0 (đối chứng âm), 3, 30, 300 hoặc 3.000 aM.

Hình 23B. Dữ liệu giải trình tự Sanger của dải sản phẩm PCR được chỉ định để nhảy Exon 4-5.

Hình 23C. Dữ liệu Western blot AR trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "AR-ASO 1" trong 48 giờ ở 0 zM (đối chứng âm, tức là N/C), 10 zM, 30 zM, 100 zM, 300 zM, 1 aM, 3 aM, 10 aM hoặc 30 aM.

Hình 24A. Dữ liệu qPCR bằng SYBR Green cho cấp độ exon 4-6 AR trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "AR-ASO 1" trong 5 giờ ở 0 (đối chứng âm), 1, 10, 100 hoặc 1.000 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 24B. Dữ liệu qPCR bằng SYBR Green cho cấp độ exon 4-6 AR trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "AR-ASO 5" trong 5 giờ ở 0 (đối chứng âm), 1, 10, 100 hoặc 1.000 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 24C. Dữ liệu qPCR bằng xét nghiệm TaqMan đối với ARN thông tin AR trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "AR-ASO 5" trong 24 giờ ở 0 (đối chứng âm), 1, 10, 100 hoặc 1.000 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 25A. Dữ liệu Western blot thô thu được với da của vị trí tiêm. NC, 1p, 10p, 100p và 1.000p đề cập đến nhóm đối chứng âm, tương ứng với nhóm điều trị ASO 1, 10, 100 và 1.000 pmol/Kg.

Hình 25B. Dữ liệu Western blot thô thu được với da của vị trí không tiêm. NC, 1p, 10p, 100p và 1.000p đề cập đến nhóm đối chứng âm, tương ứng với nhóm điều trị ASO 1, 10, 100 và 1.000 pmol/Kg.

Hình 26A. Mức độ biểu hiện protein AR theo nhóm cũng như theo đối tượng ở vị trí tiêm (trái) và vị trí không tiêm (phải). (** cho $p < 0,01$ và * cho $p < 0,05$).

Hình 26B. Mức độ biểu hiện protein AR trung bình theo nhóm ở vị trí tiêm (trái) và vị trí không tiêm (phải). (** cho $p < 0,01$ và * cho $p < 0,05$)

Hình 27A. Phân tích điện di của các sản phẩm PCR lồng AR trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "AR-ASO 1" trong 3 giờ ở 0 (đối chứng âm), 30, 100 hoặc 1.000 aM.

Hình 27B. Dữ liệu giải trình tự Sanger của dải sản phẩm PCR được chỉ định để nhảy Exon 5.

Hình 28A. Phân tích điện di của các sản phẩm PCR lồng SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 7" trong 24 giờ ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM.

Hình 28B. Dữ liệu giải trình tự Sanger của các sản phẩm PCR lồng được chỉ định nhảy Exon 4 (trên cùng) và exon 4-5 (dưới cùng), một cách tương ứng.

Hình 29A. Dữ liệu qPCR lồng SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 7" trong 24 giờ ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 29B. Dữ liệu qPCR lồng SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 3" trong 24 giờ ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 29C. Dữ liệu qPCR lồng SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 8" trong 24 giờ ở 0 (đối chứng âm), 10 hoặc 100 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 30A. Kết quả xét nghiệm CoroNa trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 7" trong 30 giờ ở 0 (đối chứng âm), 100 hoặc 1.000 zM.

Hình 30B. Kết quả xét nghiệm CoroNa được xử lý bằng "SCN-ASO 3" trong 30 giờ ở 0 (đối chứng âm), 100 hoặc 1.000 zM.

Hình 30C. Kết quả xét nghiệm CoroNa được xử lý bằng "SCN-ASO 8" trong 30 giờ ở 0 (đối chứng âm), 100 hoặc 1.000 zM.

Hình 31A. Dữ liệu điện di của các sản phẩm RT-PCR lồng SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "ASO 27" trong 24 giờ ở 0 (đối chứng âm), 10 hoặc 100 zM.

Hình 31B. Dữ liệu giải trình tự Sanger của dải sản phẩm PCR được chỉ định để nhảy Exon 4-5.

Hình 31C. Dữ liệu điện di của các sản phẩm RT-PCR lồng SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "ASO 27" ở 0 (đối chứng âm), 1, 10, 100 hoặc 1.000 aM.

Hình 32A. Dữ liệu qPCR SCN9A bằng cách tổng hợp cADN một bước trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 27" ở 0 (đối chứng âm), 0,1, 1 hoặc 10 aM trong 24 giờ. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 32B. Dữ liệu qPCR SCN9A bằng cách tổng hợp cADN với môi trường ngẫu nhiên trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 27" ở 0 (đối chứng âm), 0,1, 1 hoặc 10 aM trong 24 giờ. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 33A. Dấu vết trung bình của cường độ huỳnh quang tế bào trong các tế bào DR5 L5 ở chuột (được kích thích bằng cách thắt L5/L6) được xử lý bằng "SCN-ASO 27" ở 0 (đối chứng âm), 100 hoặc 1.000 zM.

Hình 33B. Dấu vết trung bình của cường độ huỳnh quang tế bào trong các tế bào DR5 L5 ở chuột (không thắt L5/L6) được xử lý bằng "SCN-ASO 27" ở 0 (đối chứng âm), 100 hoặc 1.000 zM.

Hình 34A. Dữ liệu Western blot về biểu hiện protein Nav1.7 trong các tế bào thần kinh DRG (được kích thích bằng cách thắt L5/L6) được xử lý bằng "SCN-ASO 30" trong 24 giờ ở 0 (tức là đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM.

Hình 34B. Dòng natri bằng thử nghiệm kẹp rập nối thủ công trong các tế bào thần kinh DRG (được kích thích bằng cách thắt L5/L6) được xử lý bằng "SCN-ASO 30" trong 4 giờ ở 0 (đối chứng âm) và 100 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 35A. Dữ liệu qPCR SCN9A bằng cách tổng hợp cADN một bước trong các tế bào thần kinh DRG L5 ở chuột được xử lý bằng "SCN-ASO 30" trong 24 giờ ở 0 (đối chứng âm), 10, 30, 100 hoặc 300 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 35B. Dữ liệu qPCR SCN9A bằng cách tổng hợp cADN với môi trường ngẫu nhiên trong các tế bào thần kinh DRG L5 ở chuột được xử lý bằng "SCN-ASO 30" trong 24 giờ ở 0 (đối chứng âm), 10, 30, 100 hoặc 300 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 36. Sự đảo ngược của allodynia gây ra bởi DPNP ở chuột được tiêm dưới da với tá dược lỏng (PBS, đối chứng âm), "SCN-ASO 7" 100 pmol/Kg, "SCN-ASO 8" 100 pmol/Kg, "SCN-ASO 21" 100 pmol/Kg, "SCN-ASO 35" 100

pmol/Kg, "SCN-ASO 36" 100 pmol/Kg hoặc "SCN-ASO 37" 100 pmol/Kg. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 37A. Dữ liệu điện di về các sản phẩm PCR lồng (Phương pháp A) thu được từ các mô cơ của chuột mdx được tiêm dưới da chỉ với tá dược lồng (đối chứng âm), 1.000 pmol/Kg "DMD-ASO 1", hoặc 1.000 pmol/Kg "DMD-ASO 4", BID trong 3 ngày.

Hình 37B. Dữ liệu giải trình tự Sanger của dải sản phẩm PCR được chỉ định để nhảy Exon 23.

Hình 38A. Dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng (Phương pháp B) thu được từ các mô cơ của chuột mdx được tiêm dưới da chỉ với tá dược lồng (đối chứng âm), 1.000 pmol/Kg "DMD-ASO 1", hoặc 1.000 pmol/Kg "DMD-ASO 4", BID trong 3 ngày.

Hình 38B. Dữ liệu giải trình tự Sanger của dải sản phẩm PCR được chỉ định để nhảy Exon 21-23.

Hình 38C. Dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng (Phương pháp A) thu được với các mẫu cơ ba đầu ở chuột mdx được tiêm dưới da với "DMD-ASO 1" ở 0 (đối chứng âm) hoặc 10 pmol/Kg, BID trong 5 ngày.

Hình 39A. Điểm số Rotarod ở chuột mdx được điều trị bằng tá dược lồng (đối chứng âm), 100 pmol/Kg "DMD-ASO 1" hoặc 1.000 pmol/Kg "DMD-ASO 1". (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn và * cho $p < 0,05$)

Hình 39B. Điểm số đo lực bám ở chuột mdx được dùng thường xuyên "DMD-ASO 1" ở mức 0 (đối chứng âm), 10, 50 hoặc 200 pmol/Kg. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn và * cho $p < 0,05$)

Hình 40. Hình ảnh IHC dystrophin đủ độ dài được kết hợp với sự nhuộm DAPI trong các mô cơ của chuột mdx được dùng "DMD-ASO 1" ở 0 (đối chứng âm) hoặc 200 pmol/Kg, 2 lần mỗi tuần trong 30 tuần.

Hình 41. Mức độ biểu hiện tương đối của protein dystrophin đủ độ dài trong cơ xương của chuột mdx được sử dụng thường xuyên "DMD-ASO 1" ở mức 0 (đối chứng âm), 10, 50 hoặc 200 pmol/Kg. Mức độ biểu hiện được chuẩn hóa

theo mức độ biểu hiện ở chuột WT. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn, * cho $p < 0,05$ và ** $p < 0,01$)

Hình 42. Dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng thu được với các cơ xương được lấy mẫu từ chuột mdx trong Tuần 7.

Hình 43. Thay đổi mô bệnh học bằng cách nhuộm H & E trên cơ ba đầu của chuột C57BL/6 (đối chứng âm WT) và chuột mdx thường dùng "DMD-ASO 1" ở mức 0 (đối chứng âm mdx), 10, 50 hoặc 200 pmol/Kg.

Hình 44A. Khoảng cách đi bộ trên máy chạy bộ ở chuột C57BL/6 (đối chứng âm WT) và chuột mdx thường xuyên tiếp xúc với "DMD ASO2" ở 0 (đối chứng âm mdx), 10 pmol/Kg hoặc 30 pmol/Kg. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn, * cho $p < 0,05$, ** cho $p < 0,01$ và *** cho $p < 0,001$)

Hình 44B. Nồng độ creatin kinaza trong huyết thanh ở chuột C57BL/6 (đối chứng âm WT) và chuột mdx thường xuyên tiếp xúc với "DMD ASO2" ở mức 0 (đối chứng âm mdx), 10 pmol/Kg hoặc 30 pmol/Kg. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn, ** cho $p < 0,01$ và **** cho $p < 0,0001$)

Hình 44C. Nồng độ myoglobin trong huyết thanh ở chuột C57BL/6 (đối chứng âm WT) và chuột mdx thường xuyên tiếp xúc với "DMD ASO2" ở mức 0 (đối chứng âm mdx), 10 pmol/Kg hoặc 30 pmol/Kg. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn, *** cho $p < 0,001$ và **** cho $p < 0,0001$)

Hình 45A. Dữ liệu Western blot được dò của các dystrophin đủ độ dài trong các mẫu cơ xương từ chuột hoang dã (đối chứng âm WT) hoặc chuột mdx tiếp xúc thường xuyên với "DMD-ASO 2" ở mức 0 (đối chứng âm mdx), 10 hoặc 30 pmol/Kg.

Hình 45B. Nồng độ creatin kinaza trong huyết thanh ở chuột WT (đối chứng âm WT), chuột mdx không điều trị ASO và chuột mdx được tiêm dưới da với 50 pmol/Kg "DMD-ASO 1", 10 pmol/Kg "DMD-ASO 2", hoặc 10 pmol/Kg "DMD-ASO 6", 2 lần mỗi tuần trong 66 tuần. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn và ** cho $p < 0,01$)

Hình 45C. Nồng độ myoglobin trong huyết thanh ở chuột WT (đối chứng âm WT), chuột mdx không điều trị ASO và chuột mdx được tiêm dưới da với 50

pmol/Kg "DMD-ASO 1", 10 pmol/Kg "DMD-ASO 2", hoặc 10 pmol/Kg "DMD-ASO 6", 2 lần mỗi tuần trong 66 tuần. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn, * cho $p < 0,05$ và *** cho $p < 0,001$)

Hình 46A. Dữ liệu điện di cho các sản phẩm PCR lồng IDO-1 trong các tế bào SKOV3 được xử lý bằng "IDO-ASO 1" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM (sơ đồ bên trái) và dữ liệu giải trình tự Sanger của dải PCR nhảy exon (sơ đồ bên phải).

Hình 46B. Kết quả xét nghiệm bài tiết Kynurenin trong các tế bào SKOV3 được điều trị bằng "IDO-ASO 1" ở 0 zM (đối chứng âm) hoặc 10 zM đến 1 fM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn và * cho $p < 0,05$)

Hình 47A. Dữ liệu điện di cho các sản phẩm PCR lồng IDO-1 trong các tế bào SKOV3 được xử lý bằng "IDO-ASO 5" ở 0 (đối chứng âm), 1, 3, 10, 30 hoặc 100 aM.

Hình 47B. Dữ liệu giải trình tự Sanger của các dải PCR được chỉ định nhảy Exon 2-4 và exon 2-6.

Hình 47C. Dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng IDO-1 trong các tế bào SKOV3 được xử lý bằng "IDO-ASO 6" ở 0 (đối chứng âm), 1, 3, 10, 30 hoặc 100 aM (sơ đồ bên trái) và dữ liệu giải trình tự Sanger cho dải PCR được chỉ định nhảy exon 2-5 (sơ đồ bên phải).

Hình 48A. Phân tích điện di của các sản phẩm PCR lồng SNAP25 trong các tế bào PC12 được xử lý bằng 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM "SNAP-ASO 3" (sơ đồ bên trái) và dữ liệu giải trình tự Sanger của dải PCR để nhảy Exon 5 -7.

Hình 48B. Thay đổi mức độ ARN thông tin SNAP25 đủ độ dài ở chuột trong các tế bào PC12 được xử lý bằng "SNAP-ASO 3" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1,000 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 48C. Thay đổi mức độ ARN thông tin SNAP25 đủ độ dài ở chuột trong các tế bào PC12 được xử lý bằng "SNAP-ASO 1" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 49A. Dữ liệu Western blot SNAP25 (sơ đồ trên cùng) và mức độ biểu hiện SNAP25 tương đối được chuẩn hóa so với β -actin (sơ đồ dưới) trong các tế bào PC12 được xử lý bằng "SNAP-ASO 3" trong 48 giờ ở 0 ZM (đối chứng âm), 1 ZM, 10 ZM, 30 ZM, 100 ZM, 300 ZM, 1 aM, 3 aM hoặc 10 aM.

Hình 49B. Dữ liệu Western blot SNAP25 trong các tế bào PC12 được xử lý bằng "SNAP-ASO 1" ở 0 (đối chứng âm), 0,1 hoặc 1 aM trong 48 giờ hoặc trong 72 giờ.

Hình 50A. Dữ liệu Western blot SNAP25 (sơ đồ trên cùng) và mức độ biểu hiện SNAP25 tương đối được chuẩn hóa so với β -actin (sơ đồ dưới) trong các tế bào SiMa được xử lý bằng "SNAP-ASO 3" trong 48 giờ ở 0 ZM (đối chứng âm), 1 zM, 10 zM, 100 zM, 1 aM, 10 aM, hoặc 100 aM.

Hình 50B. Thay đổi mức độ ARN thông tin SNAP25 ở người trong các tế bào SiMa được xử lý bằng "SNAP-ASO 3" ở 0 zM (đối chứng âm), 1 zM, 10 zM, 100 zM, 1 aM, 10 aM hoặc 100 aM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 51. Hình ảnh IHC SNAP25 của các mẫu da của chuột được tiêm tại chỗ "SNAP-ASO 1" ở 0 (đối chứng âm), 1, 10 hoặc 100 fM, BID trong khoảng thời gian 4 ngày.

Hình 52A. Phân tích điện di của các sản phẩm PCR lồng trong các tế bào u ác tính ở chuột B16F10 được xử lý bằng "TYR-ASO 4" ở 0 (đối chứng âm), 1, 10 hoặc 1.000 aM.

Hình 52B. Giải trình tự Sanger của sản phẩm PCR được chỉ định để nhảy Exon 2-3.

Hình 52C. Thay đổi mức độ ARN thông tin TYR đủ độ dài bằng qPCR trong các tế bào u ác tính ở chuột B16F10 được xử lý bằng "TYR-ASO 4" ở 0 (đối chứng âm), 1, 10, 100 hoặc 1.000 aM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 53A. Dữ liệu Western blot TYR trong các tế bào B16F10 được xử lý bằng "TYR-ASO 4" trong 24 giờ ở 0 (đối chứng âm), 0,01, 0,1, 1 hoặc 10 aM.

Hình 53B. Sự thay đổi hàm lượng melanin trong các tế bào u ác tính ở chuột B16F10 được xử lý bằng "TYR-ASO 4" ở 0 (đối chứng âm) 1, 10, 100 hoặc

1.000 aM, hoặc với 10 µg/mL hoặc 100 µg/mL arbutin. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn, * cho $p < 0,05$, ** cho $p < 0,01$ và *** cho $p < 0,001$)

Hình 53C. Thay đổi mức độ ARN thông tin TYR đủ độ dài bằng qPCR trong các tế bào biểu bì tạo hắc tố biểu mô nguyên phát ở người được điều trị bằng "TYR-ASO 1" ở 0 zM (đối chứng âm), 1 zM, 100 zM hoặc 10 aM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn)

Hình 54A. Phân tích điện di của các sản phẩm PCR lồng trong các tế bào Jurkat được xử lý bằng "PD-ASO 3" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 aM.

Hình 54B. Giải trình tự Sanger của các sản phẩm PCR được chỉ định nhảy Exon 2 (trái) và exon 3 (phải), một cách tương ứng.

Hình 55A. Thay đổi mức độ ARN thông tin PD-1 ở người bằng qPCR lồng trong các tế bào Jurkat được xử lý bằng "PD-ASO 3" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 aM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn, ** cho $p < 0,01$ và * cho $p < 0,05$)

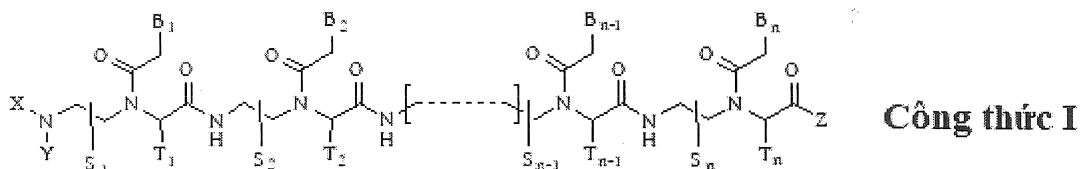
Hình 55B. Thay đổi mức độ ARN thông tin IL-2 ở người bằng qPCR trong các tế bào Jurkat được xử lý bằng "PD-ASO 3" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 aM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn, ** cho $p < 0,01$ và * cho $p < 0,05$)

Hình 56A. Thay đổi mức độ ARN thông tin PD-1 ở người bằng qPCR lồng trong các tế bào Jurkat được xử lý bằng "PD-ASO 1" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 aM. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn và * cho $p < 0,05$)

Hình 56B. Ước chế sự tăng trưởng khối u ác tính B16F10 ở chuột C57BL/6 được tiêm dưới da "PD-ASO 2" ở mức 2, 10 hoặc 50 pmol/Kg, 2 lần mỗi tuần. (thanh sai số theo sai số tiêu chuẩn và * cho $p < 0,05$)

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 giữa 10 và 25;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lấp bổ sung 10 me với trình tự vị trí điểm cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong một tiền ARN thông tin mục tiêu;

hợp chất của Công thức I hoàn toàn bổ sung cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu, hoặc bổ sung một phần cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu với một hoặc hai sự không phù hợp;

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

X và Y độc lập là hydrido, focmyl [H-C(=O)-], aminocacbonyl [$\text{NH}_2\text{-C(=O)-}$], aminothiocacbonyl [$\text{NH}_2\text{-C(=S)-}$], alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxyacacbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxyacacbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminothiocacbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminothiocacbonyl được thế hoặc không được thế, alkyloxythiocacbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxythiocacbonyl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, arylsulfonyl được thế hoặc không được thế, alkylphosphonyl được thế hoặc không được thế hoặc gốc arylphosphonyl được thế hoặc không được thế;

Z là gốc hydrido, hydroxy, alkyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, amino [-NH₂] không được thế, alkylamino được

thể hoặc không được thể, arylamino được thể hoặc không được thể, alkyl được thể hoặc không được thể, hoặc gốc aryl được thể hoặc không được thể;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn 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 thể hoặc không được thể gắn kết cộng hóa trị với gốc nucleobazơ.

Theo một số phương án, hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lấp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong một tiền ARN thông tin mục tiêu, trong đó trình tự vị trí cắt nối mục tiêu không phải là $[(5' \rightarrow 3') \text{UUGCCUGGUAAGGA}]$ trong tiền ARN thông tin của thụ thể androgen ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{UUUUUGCGUAAGUA}]$ trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{UAAGUAGGAUAAGU}]$ trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{AUCCCAGGGUAACA}]$ trong tiền ARN thông tin SNAP25 ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{UGUUUAGGUACACU}]$ trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người hoặc $[(5' \rightarrow 3') \text{UGUACAGAUUGUCU}]$ trong tiền ARN thông tin tyrosinaza ở người.

Theo một số phương án, hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lấp bổ sung 10 me với vị trí cắt nối mục tiêu trong một tiền ARN thông tin mục tiêu, trong đó trình tự vị trí cắt nối mục tiêu không bao gồm $[(5' \rightarrow 3') \text{UUGCCUGGUAAGGA}]$ trong tiền ARN thông tin của thụ thể androgen ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{UUUUUGCGUAAGUA}]$ trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{UAAGUAGGAUAAGU}]$ trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{AUCCCAGGGUAACA}]$ trong tiền ARN thông tin SNAP25 ở người, $[(5' \rightarrow 3') \text{UGUUUAGGUACACU}]$ trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người, hoặc $[(5' \rightarrow 3') \text{UGUACAGAUUGUCU}]$ trong tiền ARN thông tin tyrosinaza ở người.

Hợp chất của công thức I có khả năng gây ra việc nhảy Exon đích của tiền ARN thông tin mục tiêu, tạo ra (các) biến thể cắt nối ARN thông tin thiếu exon

đích, và do đó rất hữu ích để điều chỉnh hoạt động chức năng của gen phiên mã tiền ARN thông tin mục tiêu.

Điều kiện được áp dụng để mô tả hợp chất của Công thức I rằng "n là một số nguyên nằm giữa 10 và 25" theo nghĩa đen là "n là một số nguyên được chọn từ 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 và 24".

Người ta ước tính rằng sẽ có 26.564 gen trong toàn bộ bộ gen của con người. [*In Silico Biol.* vol 4, 387-393 (2004)] Cho rằng trung bình có khoảng 8,8 exon và 7,8 intron cho mỗi gen, có 368.122 vị trí cắt nối $[(8,2 \times 2) - 2] \times 26.564 = 368.122$ có thể có trong bộ gen của con người. Vì có 1.048.576 (tức là 4^{10}) trình tự có thể cho tiền ARN thông tin 10-mer, các dẫn xuất APN 10-mer thậm chí sẽ cho thấy mức độ đặc hiệu đủ cho vị trí cắt nối mục tiêu. Tuy nhiên, đầu 5' và đầu 3' của mỗi intron được đánh giá cao bảo tồn để có trình tự bắt đầu với $[(5' \rightarrow 3') \mid \text{GU-}]$ và trình tự kết thúc với $[(5' \rightarrow 3') \text{-AG} \mid]$, tương ứng, trong đó " | " là viết tắt của điểm nối của intron-exon hoặc exon-intron. Do đó, hợp chất của Công thức I có độ dài oligome là 11-mer hoặc dài hơn (nghĩa là n là số nguyên lớn hơn 10) được dự đoán sẽ hiển thị mức độ đặc hiệu đủ cho vị trí cắt nối mục tiêu.

Hợp chất của Công thức I gắn kết chặt chẽ với axit nucleic bổ sung như được minh họa trong lĩnh vực kỹ thuật này trước đây [PCT/KR2009/001256]. Ví dụ, việc kết hợp từ 4 đến 5 nucleobazơ đã được biến đổi (nghĩa là không tự nhiên của các nucleobazơ không có trong tự nhiên) vào các dẫn xuất APN từ 11 đến 13 me của Công thức I dễ dàng mang lại mức tăng T_m từ 20°C trở lên trong quá trình tạo chuỗi kép với AND bổ sung. Hợp chất của sáng chế có ái lực mạnh mẽ đối với ARN bổ sung giống như đối với ADN bổ sung. Do đó, nên để hợp chất của sáng chế này càng ngắn càng tốt để tránh các hiệu ứng ngoài mục tiêu không mong muốn có nguồn gốc từ gắn kết của hợp chất nói trên với các trình tự tiền ARN thông tin khác với một số lượng không phù hợp. Do đó, chiều dài oligome của hợp chất nói trên được giới hạn ngắn hơn 25 mer.

Hợp chất của Công thức I rất nhạy cảm với một bazơ đơn không phù hợp như được minh họa trong lĩnh vực kỹ thuật này trước đây [PCT/KR200/001256]. Ví dụ, một bazơ đơn không phù hợp dẫn đến sự giảm T_m từ 11 đến 22°C tùy thuộc

vào loại bazơ bị biến đổi cũng như trình tự APN. Tuy nhiên, do có ái lực mạnh với ARN, hợp chất của sáng chế này vẫn gắn kết chặt chẽ với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu có một hoặc hai sự không phù hợp và gây ra sự nhảy của exon mục tiêu.

Hợp chất của Công thức I gắn kết chặt chẽ với vị trí cắt nối 3' hoặc vị trí cắt nối 5' trong một tiền ARN thông tin mục tiêu, tùy thuộc vào trình tự của nó.

Trong trường hợp hợp chất gắn kết với vị trí cắt nối 3', hợp chất nói trên có ít nhất một chồng lắp bổ sung 10 me với trình tự 14 me trong vị trí cắt nối 3' mục tiêu bao gồm 7 me từ intron mục tiêu và 7 me từ exon mục tiêu. Do đó, vị trí cắt nối 3' được xác định rõ ràng là điểm nối giữa đầu 3' của intron đích và đầu 5' của exon đích.

Trong trường hợp hợp chất gắn kết với vị trí cắt nối 5', hợp chất nói trên có ít nhất một chồng lắp bổ sung 10 me với trình tự 14 me trong vị trí cắt nối 5' mục tiêu bao gồm 7 me từ exon mục tiêu và 7 me từ intron mục tiêu. Do đó, vị trí cắt nối 5' được định nghĩa không rõ ràng là điểm nối giữa đầu 3' của exon đích và đầu 5' của intron đích.

Trình tự 14 me mô tả hợp chất của Công thức I nhắm đích đến vị trí cắt nối 3' được minh họa bằng vị trí cắt nối 3' trải qua điểm nối của intron 1 và exon 2 trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người đọc từ gen *HIF1A* ở người [Trình tự tham chiếu NCBI: NG_029606.1]. Trình tự 40 me của vị trí cắt nối 3' bao gồm 20 me từ intron 1 và 20 me từ exon 2 là [(5' $\rightarrow$ 3') uucuuguuguuguuaaguag | GAUAAGUUCUGAACGUCGAA], trong đó các trình tự intron và exon lần lượt được biểu thị bằng chữ nhỏ và chữ in hoa và đường giao nhau giữa intron 1 và exon 2 được đánh dấu bằng " | ". Do đó, trình tự 14-mer của vị trí cắt nối 3' bao gồm 7-mer từ intron 1 HIF-1 α và 7-mer từ exon 2 HIF-1 α đọc là [(5' $\rightarrow$ 3') uaaguag | GAUAAGU]. Trong vị trí cắt nối 3' này, intron và exon đích lần lượt là intron 1 và exon 2 HIF-1 α .

Trình tự tiền ARN thông tin 40 me ở trên đã được cung cấp để xác định một cách rõ rệt vị trí cắt nối 3' của exon 2 trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người, vì số exon thường thay đổi tùy theo bản sao ARN thông tin. Trong sáng

chế này, vị trí cắt nối mục tiêu của hợp chất APN đã nêu được xác định một cách rõ ràng ở bất cứ nơi nào có thể áp dụng bằng cách chỉ định đồng thời số exon mục tiêu và trình tự tiền ARN thông tin bao gồm vị trí cắt nối mục tiêu.

Trình tự 14 me mô tả hợp chất của Công thức I nhắm đích vào vị trí cắt nối 5' được minh họa bằng vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 2 và intron 2 trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người. Trình tự 40-mer của vị trí cắt nối 5' bao gồm 20-mer từ exon 2 và 20-mer từ intron 2 đọc là [(5' $\rightarrow$ 3') GAGGAAACUUCUGGAUGCUG | gugaguuaauuuuacaaggu], trong đó trình tự exon và intron được biểu hiện bằng chữ hoa, chữ nhỏ, tương ứng, và điểm nối giữa exon 2 và intron 2 được đánh dấu bằng " | ". Do đó, trình tự 14-mer của vị trí cắt nối 5' bao gồm 7-mer từ exon 2 HIF-1 α và 7-mer từ intron 2 HIF-1 α đọc là [(5' $\rightarrow$ 3') GAUGCUG | gugaguu]. Trong vị trí cắt nối 5' (5' SS) này, exon và intron đích lần lượt là exon 2 và intron 2 HIF-1 α .

Hợp chất của Công thức I gắn kết chặt chẽ với vị trí cắt nối mục tiêu trong tiền ARN thông tin mục tiêu và cản trở sự hình thành "phức hợp ban đầu spliceome" liên quan đến vị trí cắt nối mục tiêu của hợp chất. Hợp chất nói trên gắn kết chặt chẽ với vị trí cắt nối 3' hoặc vị trí cắt nối 5' trong tiền ARN thông tin mục tiêu tùy thuộc vào trình tự nucleotit của hợp chất nói trên. Do hợp chất của sáng chế này ngăn chặn một cách rõ ràng sự hình thành "phức hợp ban đầu spliceosome", nên exon mục tiêu được tách ra để tạo ra (các) biến thể cắt nối ARN thông tin thiếu exon đích. Do đó, hợp chất của sáng chế có khả năng gây ra sự nhảy của exon mục tiêu.

Các cấu trúc hóa học của các nucleobazơ tự nhiên (nghĩa là có trong tự nhiên) hoặc không tự nhiên (nghĩa là không có trong tự nhiên) được sử dụng để mô tả dẫn xuất APN của Công thức I được minh họa trong Hình 7. Các nucleobazơ tự nhiên hoặc không tự nhiên của sáng chế này bao gồm nhưng không giới hạn ở các nucleobazơ được cung cấp trong Hình 7. Việc cung cấp các nucleobazơ tự nhiên hoặc không tự nhiên như vậy là để minh họa sự đa dạng của các nucleobazơ được phép, và do đó không nên diễn giải để giới hạn phạm vi của sáng chế với các nucleobazơ được cung cấp trong Hình 7. Một chuyên gia trong lĩnh vực

oligonucleotit có thể dễ dàng tìm ra một nucleobazơ tự nhiên bổ sung cho từng nucleobazơ không tự nhiên được minh họa trong Hình 7. Do đó, chuyên gia này có thể xác định rõ ràng sự bổ sung giữa hợp chất có công thức I và trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu.

Các nhóm thế được sử dụng để mô tả dẫn xuất APN của Công thức I được minh họa trong Hình 8 đến Hình 8E. Hình 8A cung cấp các ví dụ cho các gốc alkyl được thế hoặc không được thế. Các gốc alkylaxyl được thế hoặc không được thế, và các gốc arylaxyl được thế hoặc không được thế được minh họa trong Hình 8B. Hình 8C minh họa ví dụ cho các gốc alkylamino được thế, arylamino được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, arylsulfonyl được thế hoặc không được thế, alkylphosphonyl được thế hoặc không được thế, và các gốc arylphosphonyl được thế hoặc không được thế. Hình 8D cung cấp các ví dụ cho các gốc alkyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxycarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, và các gốc arylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế. Trong Hình 8E, cung cấp các ví dụ cho alkyloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminothiocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminothiocarbonyl được thế hoặc được thế, alkyloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế và aryloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế. Việc cung cấp các nhóm thế điển hình 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 đối với các chất nhóm thế được minh họa trong Hình 8A đến Hình 8E. Vì một chuyên gia trong lĩnh vực này có thể dễ dàng nhận ra rằng trình tự oligonucleotit là yếu tố ghi đè cho gắn kết đặc hiệu của trình tự oligonucleotit với trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu trên các nhóm thế ở đầu N hoặc đầu C, nên có nhiều nhóm thế khác nhau được phép cho hợp chất nói trên của sáng chế này hơn các nhóm thế được minh họa trong Hình 8A đến Hình 8E.

Hợp chất của Công thức I có tính thấm tế bào tốt và có thể dễ dàng phân phối vào tế bào dưới dạng "nguyên dạng" (nghĩa là không được pha chế với tá dược để làm tăng sự phân phối vào tế bào) như được minh họa trong lĩnh vực kỹ

thuật này trước đây [PCT/KR2009/001256]. Do đó, hợp chất của sáng chế này có khả năng gây ra việc nhảy Exon mục tiêu trong tiền ARN thông tin mục tiêu để tạo ra (các) biến thể cắt nối ARN thông tin thiếu exon đích trong các tế bào được xử lý bằng hợp chất của Công thức I là oligonucleotit "nguyên dạng".

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 nhảy của exon đích trong các tế bào. Về vấn đề này, hợp chất của sáng chế khác biệt rõ rệt với các nhóm oligonucleotit khác bao gồm ADN, ARN, PTO, PTO 2'-OMe, ARN 2'-OMe, ARN 2'-OMOE, LNA, PMO, APN, và v.v.

Với ái lực mạnh mẽ đối với ARN và tính thấm của tế bào tốt, hợp chất của Công thức I dễ dàng tạo ra sự nhảy của exon mục tiêu trong các tế bào có tiềm năng antisense dưới mức femtô mol (10^{-15} mol). Cho đến nay, chưa bao giờ được báo cáo hoặc nhận ra tiềm năng nhảy exon antisense dưới mức femtô mol (10^{-15} mol) với các nhóm oligonucleotit khác bao gồm ADN, ARN, PTO, PTO 2'-OMe, ARN 2'-OMe, ARN 2'-OMOE, LNA, PMO, APN, v.v. Ngay cả khả năng nhảy Exon antisense dưới mức nanomol cũng hiếm khi được ghi nhận với các nhóm oligonucleotit khác. Hiệu lực nhảy Exon antisense dưới mức nanomol đã được báo cáo với ASO APN được thiết kế để có một số nhóm phosphonat khác nhau gắn kết cộng hóa trị với đầu N của trình tự APN để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình chuyển hóa vào tế bào. [Nucl. Acids Res. vol 30 (13), 4424-4432 (2008)] Như được trích dẫn trước đó trong tài liệu này, khả năng nhảy exon antisense in vivo đã được báo cáo là ở mức nanomol đến mức micromol ngay cả trong các điều kiện cưỡng bức đưa vào tế bào như phương pháp lipofection, điện di, v.v. Về vấn đề này, hợp chất của Công thức I khác biệt rõ rệt với các nhóm oligonucleotit khác bao gồm ADN, ARN, PTO, PTO 2'-OMe, ARN 2'-OMe, ARN 2'-OMOE, LNA, PMO, APN, v.v.

Để một phân tử oligonucleotit gắn kết với trình tự bổ sung của nó trong một tiền ARN thông tin, phân tử này cần phải được kéo dài ra hoặc mở ra để gắn kết bổ sung với trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu. Các phân tử oligonucleotit có xu hướng tập hợp hoặc duy trì nếp gấp (ví dụ như cái kẹp tóc) do xu hướng cao

của chúng trong việc hình thành gắn kết hydro liên phân tử hoặc nội phân tử giữa các nucleobazơ. Do đó, sẽ có thêm một rào cản năng lượng cho việc mở ra chống lại sự nhảy exon antisense với các oligonucleotit được nghiên cứu phổ biến bao gồm ADN, ARN, PTO, PTO 2'-OMe, ARN 2'-OMe, ARN 2'-OMOE, LNA, PMO, APN, v.v. Các oligonucleotit đã được định lượng thông thường bằng cách hấp thụ tia cực tím sau khi ủ ở nhiệt độ $> 90^{\circ}\text{C}$ trong dung dịch đệm nước cho các phân tử oligonucleotit mở ra càng nhiều càng tốt.

Dẫn xuất APN của Công thức I có nhiều điện tích dương phân bố trên toàn bộ chuỗi oligonucleotit ở độ pH sinh lý do một số nhóm amino bazơ gắn kết cộng hóa trị với các nucleobazơ đã được biến đổi trong đó. Nhiều điện tích dương cho phép hợp chất của Công thức I không bị mở ra hoặc kéo dài ra do lực đẩy tĩnh điện giữa các điện tích dương lân cận trên cùng một chuỗi oligonucleotit. Dẫn xuất của công thức I có xu hướng thấp để tập hợp với (các) phân tử khác có công thức I. Do đó, hợp chất của Công thức I có xu hướng vẫn sẵn sàng về mặt cấu trúc (nghĩa là được kéo dài ra) để gắn kết bổ sung với trình tự mục tiêu trong tiền ARN thông tin mục tiêu. Sự sẵn sàng về cấu trúc cũng rất quan trọng đối với oligonucleotit của Công thức I để nhanh chóng phù hợp với trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu vì tiền ARN thông tin mục tiêu đang được phiên mã từ ADN. Do đó, mức độ sẵn sàng về cấu trúc kết hợp với ái lực mạnh được coi là cộng thêm vào ái lực gắn kết mạnh mẽ để đạt được tiềm năng nhảy exon antisense dưới mức femtô mol của hợp chất có công thức I. Về mặt này, hợp chất của Công thức I khác biệt rõ rệt với các nhóm oligonucleotit khác bao gồm ADN, ARN, PTO, PTO 2'-OMe, ARN 2'-OMe, ARN 2'-OMOE, LNA, PMO, APN, v.v.

Nhờ tính thấm tế bào tốt, dẫn xuất APN của Công thức I có thể được sử dụng toàn thân dưới dạng oligonucleotit "nguyên dạng" để tạo ra sự nhảy exon có hiệu lực trong (các) mô đích. Hợp chất của Công thức I không yêu cầu công thức hoặc tá dược để làm tăng phân phối vào mô đích để gọi ra hoạt tính trị liệu mong muốn. Hợp chất của Công thức I được hòa tan dễ dàng trong PBS (dung dịch muối đệm phosphat) hoặc nước muối, và được sử dụng toàn thân để dễ dàng khơi gợi hoạt tính trị liệu trong (các) mô đích.

Với tiềm năng nhảy exon dưới mức femtô mol trong các tế bào được xử lý với oligonucleotit "nguyên dạng", dẫn xuất APN của sáng chế cho thấy hoạt tính trị liệu in vivo thường xuyên với liều toàn thân 1 $\mu\text{g/Kg}$ hoặc ít hơn. Hiệu lực điều trị mạnh như vậy chưa bao giờ được thực hiện với các nhóm oligonucleotit khác bao gồm ADN, ARN, PTO, PTO 2'-OMe, ARN 2'-OMe, ARN 2'-OMOE, LNA, PMO, APN, v.v. Do chi phí sản xuất oligonucleotit nói chung là rất cao, nên tiềm năng cực mạnh là một lợi thế lớn để hiện thực hóa chi phí điều trị phải chăng, đặc biệt là đối với những bệnh nhân mắc bệnh mãn tính. Về vấn đề này, hợp chất của Công thức I khác biệt rõ rệt với các nhóm oligonucleotit khác bao gồm ADN, ARN, PTO, PTO 2'-OMe, ARN 2'-OMe, ARN 2'-OMOE, LNA, PMO, APN, v.v.

Do tính thấm tế bào tốt, dẫn xuất APN của sáng chế hiện tại dễ dàng được phân phối tại chỗ hoặc qua da để khơi gợi hoạt tính trị liệu tại địa điểm sử dụng. Hợp chất của sáng chế này không cần được điều chế phức tạp hoặc xâm lấn để tạo ra hoạt tính trị liệu tại chỗ. Dẫn xuất APN của Công thức I dễ dàng được chuyển qua da dưới dạng oligonucleotit "nguyên dạng". Nhờ có hiệu lực nhảy Exon cực mạnh, hợp chất nói trên cho thấy hoạt tính trị liệu khi sử dụng tại chỗ hoặc qua da của dung dịch oligonucleotit dưới mức picomol. Việc phân phối tại chỗ hoặc qua da dưới dạng oligonucleotit "nguyên dạng" đã vô cùng thách thức với các nhóm oligonucleotit khác bao gồm ADN, ARN, PTO, PTO 2'-OMe, ARN 2'-OMe, ARN 2'-OMOE, LNA, PMO, APN, v.v. Về vấn đề này, hợp chất của Công thức I khác biệt rõ rệt với các nhóm oligonucleotit khác bao gồm ADN, ARN, PTO, PTO 2'-OMe, ARN 2'-OMe, ARN 2'-OMOE, LNA, PMO, APN, v.v.

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

Dẫn xuất APN của Công thức I hoặc một loại muối được dùng có thể được sử dụng cho một đối tượng kết hợp với một tá dược được dùng bao gồm nhưng không giới hạn ở axit xitric, axit hydrocloric, axit tauric, axit stearic, polyetylen glycol, ethanol, isopropanol sodium bicarbonate, nước cất, chất bảo quản, v.v.

Hợp chất của sáng chế có thể được sử dụng toàn thân cho một đối tượng với liều điều trị có hiệu quả từ 1 fmol/Kg đến cao hơn 1nmol/Kg, có thể thay đổi tùy theo lịch dùng thuốc, điều kiện hoặc tình trạng của đối tượng, 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 từ 1 aM đến cao hơn 1 nM, có thể thay đổi tùy theo lịch dùng thuốc, điều kiện hoặc tình trạng của đối tượng, v.v.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm giữa 11 và 15;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lắp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong tiền ARN thông tin mục tiêu;

hợp chất của Công thức I hoàn toàn bổ sung cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu, hoặc bổ sung một phần cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu với một hoặc hai sự không phù hợp;

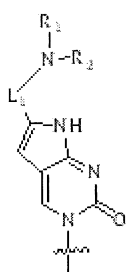
$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$ và T_n độc lập là gốc deuterido, hydrido, alkyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế;

X và Y độc lập là gốc hydrido, formyl, aminocarbonyl, aminothiocarbonyl, alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminothiocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminothiocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkyloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, arylsulfonyl được thế hoặc không được thế, gốc alkylphosphonyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc arylphosphonyl được thế hoặc không được thế;

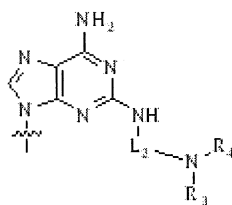
Z là gốc hydrido, hydroxy, alkyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, amino không được thế, alkylamino được thế hoặc không được thế, arylamino được thế hoặc không được thế, alkyl được thế hoặc không được thế hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế;

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

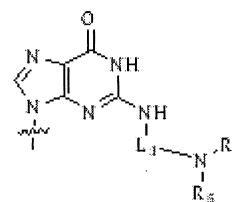
ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được biểu diễn bởi Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV;



Công thức II



Công thức III

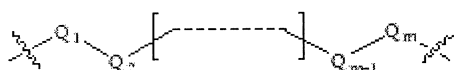


Công thức IV

trong đó:

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

L_1, L_2 và L_3 là một mối liên kết cộng hóa trị được biểu diễn bởi Công thức V liên kết cộng hóa trị nhóm amino bazơ với gốc nucleobazơ:



Công thức V

trong đó:

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

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

m là một số nguyên nằm giữa 1 và 15.

Các nucleobazơ không tự nhiên của Công thức II, Công thức III và Công thức IV tương ứng với xytosin, adenin và guanin để ghép cặp bazơ bổ sung với tiền ARN thông tin như được minh họa trong lĩnh vực kỹ thuật này trước đây [PCT/KR2009/001256].

Điều kiện được sử dụng để mô tả Công thức V rằng " m là một số nguyên nằm giữa 1 và 15" theo nghĩa đen là " n là một số nguyên được chọn từ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 và 14".

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm giữa 11 và 23;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lắp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong tiền ARN thông tin mục tiêu;

hợp chất của Công thức I hoàn toàn bổ sung cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu, hoặc bổ sung một phần cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu với một hoặc hai sự không phù hợp;

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

x và Y độc lập là gốc hydrido, aminocacbonyl, alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxyacacbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế hoặc gốc arylsulfonyl được thế hoặc không được thế;

Z là amino không được thế, hoặc gốc alkylamino 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 gốc alkyl 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 bazơ;

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

m là một số nguyên nằm giữa 1 và 11.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm giữa 11 và 21;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lắp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong tiền ARN thông tin mục tiêu;

hợp chất của Công thức I hoàn toàn bổ sung cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu, hoặc bổ sung một phần cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu với một hoặc hai sự không phù hợp;

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

X và Y độc lập là gốc hydrido, alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế hoặc gốc arylsulfonyl được thế hoặc không được thế;

Z là amino không được thế, hoặc gốc alkylamino 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 hydrido, và gốc alkyl được thế hoặc không được thế;

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

$Q_2, Q_3, \dots$ và Q_{m-1} được chọn độc lập từ gốc metylen, oxy và gốc amino; và m là một số nguyên nằm giữa 1 và 11.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm giữa 11 và 19;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lấp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong tiền ARN thông tin mục tiêu;

hợp chất của Công thức I hoàn toàn bổ sung cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu;

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

X và Y độc lập là gốc hydrido, alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế hoặc gốc arylsulfonyl được thế hoặc không được thế;

Z là gốc amino không được thế, hoặc gốc alkylamino 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_3 và R_5 là gốc hydrido và R_2, R_4 và R_6 độc lập là gốc hydrido, hoặc gốc alkyl được thế hoặc không được thế;

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

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

m là một số nguyên nằm giữa 1 và 9.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm giữa 12 và 19;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lấp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong tiền ARN thông tin mục tiêu;

hợp chất của Công thức I hoàn toàn bổ sung cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu;

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

X và Y độc lập là gốc alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế;

Z là gốc amino không được thế, hoặc gốc alkylamino được thế hoặc không được thế;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, và B_n được chọn 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 bazơ;

$Q_2, Q_3, \dots$, và Q_{m-1} được chọn độc lập từ gốc metylen và oxy; và m là một số nguyên nằm giữa 1 và 9.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm giữa 12 và 18;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lắp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong tiền ARN thông tin mục tiêu;

hợp chất của Công thức I hoàn toàn bổ sung cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu;

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

X là gốc hydrido;

Y là gốc alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế;

Z là gốc amino không được thế, hoặc gốc alkylamino 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 là $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$, $-CH_2-O-(CH_2)_2-$, $-CH_2-O-(CH_2)_3-$, $-CH_2-O-(CH_2)_4-$, $-CH_2-O-(CH_2)_5-$, $-CH_2-O-(CH_2)_6-$, hoặc $-CH_2-O-(CH_2)_7-$ với đầu bên phải được liên kết trực tiếp với nhóm amin bazơ; và

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

Hợp chất của Công thức I có thể được viết tắt như được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này trước đây [PCT/KR2009/001256; EP2268607; US8680253]. Dưới đây là các ví dụ về các chữ viết tắt như vậy được sử dụng để mô tả các dẫn xuất APN của Công thức I nhằm mục tiêu vào vị trí cắt nối 3' trải qua điểm nối của intron 1 và exon 2 trong tiền ARN thông tin ở người đọc từ gen *HIF1A* ở người [Trình tự tham chiếu NCBI: NG_029606.1]:

(N → C) Fethoc-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)-TCC(1O2)-TA(5)-NH₂;

(N → C) Fmoc-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)-TCC(1O2)-TA(5)-NH₂;

(N → C) H-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)-TCC(1O3)-TA(5)-NH₂;

(N → C) Ac-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)-TCC(1O2)-TA(5)-NH₂;

(N → C) Piv-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)-TCC(1O2)-TA(5)-NH₂;

(N → C) Benzoyl-CA(5)G(2O3)-AA(5)C-TTA(4)-TCC(1O2)-TA(5)-NH₂;

(N → C) n-Propyl-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)-TCC(2O2)-TA(5)-NH₂;

(N → C) Benzyl-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)-TCC(1O2)-TA(5)-NH₂;

(N → C) p-Toluensulfonyl-CA(5)G-AA(5)C-TTA(2O2)-TCC(1O2)-TA(5)-NH₂;

(N → C) [N-(2-Phenyletyl)amino]cacbonyl-CA(5)G(3)-AA(5)C-TTA(3)-TCC(1O2)-TA(5)-NH₂;

(N → C) Fethoc-Lys-Leu-CA(5)G(2O2)-AA(5)C-TTA(8)-TCC(1O2)-TA-Lys-NH₂;

(N → C) N-Phenyl-N-Me-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)-TCC(1O2)-TA(5)-Lys-NH₂;

(N → C) Piv-HEX-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)-TCC(1O2)-TA(5)-Lys-NH₂;

(N → C) FAM-HEX-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)-TCC(1O2)-TA(5)-Lys-NH₂;

(N → C) Fethoc-GA(5)A-C(1O2)TT-A(5)TC-CTA(5)-C(1O2)T-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-Arg-GA(5)A-C(1O2)TT-A(5)TC-CTA(5)-C(1O2)T-Gly-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-Val-GA(5)A-CTT-A(6)TC-CTA(5)-C(2O2)T-Gly-Lys-NH₂;

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-C(1O5)TT-A(6)TC-CTA(6)-C(1O2)TT-AA(6)C-NH₂;

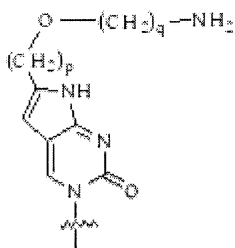
(N $\rightarrow$ C) Fmoc-Val-CTC(1O2)-A(5)TC-CTA(6)-C(1O3)TT-AA(2O2)C-NH₂; và

(N $\rightarrow$ C) Fethoc-TTC(1O5)-AG(5)A-A(4)CT-TA(5)T-CC(2O2)T-A(6)CT-TA(6)-NH₂;

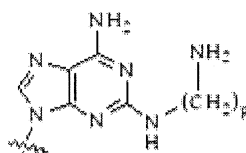
trong đó:

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

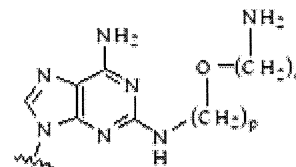
C(pOq), A(p), A(pOq), G(p) và G(pOq) là các monome APN có nucleobazơ không tự nhiên được biểu diễn bởi Công thức VI, Công thức VII, Công thức VIII, Công thức IX và Công thức X, tương ứng;



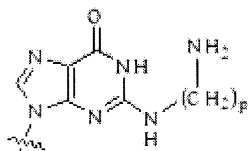
Công thức VI



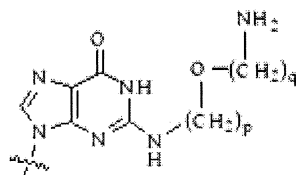
Công thức VII



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 định nghĩa cụ thể như sau: "Fmoc-" là tên viết tắt cho "[2-(9-fluorenyl)ethoxy]carbonyl-"; "Fethoc-" cho "[2-(9-fluorenyl)ethyl-1-oxy]carbonyl-"; "Ac-" cho "acetyl-"; "Benzoyl-" cho "benzencarbonyl-"; "Piv-" cho "pivalyl-"; "n-Propyl-" cho "1-(n-propyl)-"; "H-" cho nhóm "hydrido-"; "p-Toluensulfonyl" cho "(4-methylbenzen)-1-sulfonyl-"; "-Lys-" cho gốc axit amin "lysin"; "-Val-" cho gốc axit amin "valin"; "-Leu-" cho gốc axit amin "leuxin"; "-Arg-" cho gốc axit amin "arginin"; "-Gly-" cho gốc axit amin "glyxin"; "[N-(2-Phenylethyl)amino]carbonyl-" cho "[N-1-(2-phenylethyl)amino]carbonyl-"; "Benzyl-" cho "1-(phenyl)methyl-"; "Phenyl-" cho "phenyl-"; "Me-" cho "methyl-"; "-HEX-" cho "6-amino-1-hexanoyl-"; "FAM-" cho "5, hoặc 6-florescein-carbonyl- (hỗn hợp đồng phân)"; và "-NH₂" cho nhóm "amino" không được thế.

Hình 9 cung cấp chung các cấu trúc hóa học cho các monome APN được viết tắt là A, G, T, C, C(pOq), A(p), A(pOq), G(p) và G(pOq). Như đã thảo luận trong lĩnh vực kỹ thuật này trước đây [PCT/KR2009/001256], C(pOq) được coi là một monome APN bị biến đổi tương đương với "xytosin" do sự lai hóa được ưu tiên của nó thành "guanin". A(p) và A(pOq) được coi là các monome APN bị biến đổi đóng vai trò là "adenin" vì ái lực chặt chẽ của chúng đối với "tymin". Tương tự như vậy G(p) và G(pOq) được coi là các đơn phân APN bị biến đổi tương đương với "guanin" do sự ghép cặp bazơ phong phú của chúng với "xytosin".

Hình 10 cung cấp một cách rõ rệt 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 APN của Công thức I trong sáng chế. Việc cung cấp các nhóm đầu N hoặc đầu C trong Hình 10 làm ví dụ là để minh họa sự đa dạng của các nhóm thế được phép cho đầu N hoặc đầu C của dẫn xuất APN của Công thức I, do đó không nên hiểu để giới hạn phạm vi của các nhóm đầu N hoặc đầu C cho hợp chất của sáng chế. Một chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật có thể dễ dàng nhận ra rằng trình tự oligonucleotit là tác nhân quan trọng nhất cho tương tác đặc hiệu của trình tự này với trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu.

Để minh họa các chữ viết tắt được sử dụng cho các dẫn xuất APN như vậy, cấu trúc hóa học cho dẫn xuất APN 14 me được viết tắt là "(N $\rightarrow$ C) Fethoc-GA(5)A-C(1O2)TT-A(5)TC-CTA(5)-C(1O2)T-NH₂" được cung cấp trong Hình 11.

Như một minh họa khác, cấu trúc hóa học cho dẫn xuất APN 15 me được viết tắt là "(N $\rightarrow$ C) Fmoc-Val-CTC(1O2)-A(5)TC-CTA(6)-C(1O3)TT-AA(2O2)C-NH₂" được cung cấp trong Hình 12.

Hợp chất của Công thức I phải đáp ứng yêu cầu có "ít nhất một chồng lấp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong một tiền ARN thông tin mục tiêu". Ví dụ, nếu hợp chất của Công thức I nhắm mục tiêu vào, vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 1 và exon 2 trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người, thì vị trí cắt nối 3' được xác định một cách rõ ràng bởi trình tự tiền ARN thông tin HIF-1 α 30-mer ở người [(5' $\rightarrow$ 3') guuguuguuaguag | GAUAAGUUCUGAACG]. Sau đó, trình tự 14-mer của vị trí cắt nối 3' HIF-1 α mục tiêu đọc là [(5' $\rightarrow$ 3') uaaguag | GAUAAGU].

Một ASO HIF-1 α 15-mer với trình tự "(N $\rightarrow$ C) Fethoc-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)-TCC(1O2)-TA(5)C-NH₂" tương đương với trình tự ADN của "(5' $\rightarrow$ 3') CAG-AAC-TTA-TCC-TAC" để gắn kết bổ sung với tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người. ASO 15 me có một chồng lấp bổ sung 15 me (nghĩa là bổ sung đầy đủ) với vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 1 và exon 2 trong tiền ARN thông tin của HIF-1 α như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin 30 me của [(5' $\rightarrow$ 3') guuguuguuaguag | GAUAAGUUCUGAACG]. ASO APN có một chồng lấp bổ sung 11-mer (tức là, 4-mer từ intron 1 và 7-mer từ exon 2) với trình tự tiền ARN thông tin HIF-1 α 14-mer của [(5' $\rightarrow$ 3') uaaguag | GAUAAGU]. Do đó, ASO APN HIF-1 α 15-mer đáp ứng các điều kiện của một chồng lấp bổ sung cần thiết cho hợp chất có công thức I.

Một ASO HIF-1 α 15-mer khác với trình tự "(N $\rightarrow$ C) Fethoc-CTC(1O2)-A(6)TC-CTA(6)-C(1O2)TT-AA(6)C-NH₂" tương đương với trình tự ADN của "(5' $\rightarrow$ 3') CTC-ATC-CTA-CTT-AAC" để gắn kết bổ sung với tiền ARN thông

tin HIF-1 α . ASO APN 15 me có một sự không phù hợp duy nhất với vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 1 và exon 2 như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin HIF-1 α 30-mer của [(5' $\rightarrow$ 3') guuguuguuaaguag | GAU"A"AGUUCUGAACG], trong đó không phù hợp duy nhất được đánh dấu bằng dấu ngoặc kép (" "). APN 15-mer có một chồng lấp bổ sung 12-mer với trình tự vị trí cắt nối 3' 14-mer được sử dụng để mô tả hợp chất có công thức I như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong [(5' $\rightarrow$ 3') uaaguag | GAU"A"AGU], trong đó sự không phù hợp duy nhất được đánh dấu bằng dấu ngoặc kép (" "). Mặc dù không phù hợp duy nhất, ASO HIF-1 α 15-mer đáp ứng các điều kiện của chồng lấp bổ sung cần thiết cho hợp chất có công thức I.

Ví dụ, trong trường hợp hợp chất của Công thức I nhằm mục tiêu vào, vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 4 và intron 4 trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người, vị trí cắt nối 5' được xác định một cách rõ ràng bởi – trình tự tiền ARN thông tin SCN9A ở người của [(5' $\rightarrow$ 3') CGUCAUUGUUUUUGC | guaaguacuuucagc] đọc từ gen SCN9A ở người (truy cập từ Trình tự tham chiếu NCBI: NC_000002.12). Sau đó, trình tự 14-mer của vị trí cắt nối 5' SCN9A mục tiêu đọc là [(5' $\rightarrow$ 3') UUUUUGC | guaagua].

Một ASO SCN9A 16 me với trình tự "(N $\rightarrow$ C) Fethoc-AC(102)T-TA(5)C-G(6)CA-A(5)AA(5)-AC(102)A-A(5)-NH₂" tương đương với trình tự ADN của "(5' $\rightarrow$ 3') ACT-TAC-GCA-AAA-ACA-A" để gắn kết bổ sung với tiền ARN thông tin SCN9A ở người. APN 16 me có một chồng lấp bổ sung 16 me (nghĩa là bổ sung đầy đủ) với vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 4 và intron 4 trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin SCN9A 30-mer của [(5' $\rightarrow$ 3') CGUCAUUGUUUUUGC | guaaguacuuucagc]. ASO SCN9A 16 me có một chồng lấp bổ sung 13 me với trình tự vị trí cắt nối 5' 14-mer như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong [(5' $\rightarrow$ 3') UUUUUGC | guaagua]. ASO SCN9A 16-mer đáp ứng các điều kiện của một chồng lấp bổ sung cần thiết cho hợp chất có công thức I.

Mô tả chi tiết sáng chế

Quy trình chung để điều chế oligome APN

Các oligome APN được tổng hợp bằng phương pháp tổng hợp Peptit pha rắn (SPPS) dựa trên hóa học Fmoc theo phương pháp được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này trước đây [US 6,133,444; WO 96/40685] hoặc với các sửa đổi nhỏ. Giá đỡ rắn được sử dụng trong sáng chế này là H-Rink Amide-ChemMatrix được mua từ PCAS BioMatrix Inc. (Quebec, Canada). Các monome Fmoc-APN với nucleobazơ biến tính đã được tổng hợp như mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này trước đây [PCT/KR 2009/001256] hoặc với các sửa đổi nhỏ.

Các cấu trúc hóa học của các monome Fmoc-APN với một nucleobazơ biến tính được sử dụng trong sáng chế này được cung cấp trong Hình 6. Các monome Fmoc-APN này được cung cấp trong Hình 13 nên được lấy làm ví dụ và do đó không nên lấy để giới hạn phạm vi của sáng chế. Một chuyên gia trong lĩnh vực này có thể dễ dàng nhận ra rằng một số lượng lớn các biến thể trong các nhóm bảo vệ, ví dụ, là có thể cho các monome Fmoc-APN như vậy được sử dụng để tổng hợp các dẫn xuất APN có công thức I.

Các oligome APN được tinh chế bằng HPLC pha đảo C₁₈ (nước/axetonitril hoặc nước/metanol với 0,1% TFA) và được đặc trưng bởi phép đo khối phổ bao gồm MALDI-TOF/MS và ESI-TOF/MS.

Hình 14 cung cấp một chu kỳ kéo dài monome điển hình được áp dụng trong SPPS của sáng chế này và các chi tiết tổng hợp được cung cấp như dưới đây. Tuy nhiên, với một chuyên gia trong lĩnh vực này, có rất nhiều biến thể nhỏ rõ ràng có thể chạy các phản ứng SPPS như vậy trên bộ tổng hợp Peptit tự động hoặc bộ tổng hợp Peptit thủ công. Các bước liên quan đến phản ứng của SPPS được cung cấp dưới đây là các quy trình phản ứng mẫu mực.

[Hoạt hoá nhựa H-Rink-ChemMatrix] 0,01 mmol (khoảng 20 mg nhựa) của nhựa ChemMatrix trong 1,5 ml piperidin/dimethylfocmamit (DMF) 20% đã được khuấy trộn trong ống libra trong 20 phút và dung dịch phản ứng được lọc ra. Nhựa

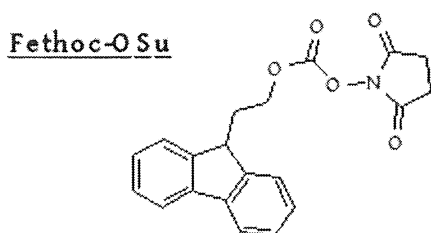
được rửa trong 30 giây mỗi lần với 1,5 ml metylen clorua (MC), 1,5 ml DMF, 1,5 ml MC, 1,5 ml DMF và 1,5 ml MC. Các amin tự do thu được trên giá đỡ rắn đã được ghép nối với một monome Fmoc-APN hoặc với một dẫn xuất axit amin được bảo vệ bởi Fmoc.

[DeFmoc] Nhựa được khuấy trộn trong 1,5 ml piperidin/DMF 20% trong 7 phút và dung dịch DeFmoc được lọc. Nhựa 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 bị ghép nối với một monome Fmoc-APN.

[Bắt cặp với monome Fmoc-APN] Các amin tự do trên giá đỡ rắn được bắt cặp với một monome Fmoc-APN như sau. 0,04 mmol của một monome Fmoc-APN, 0,05 mmol HBTU [2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyloroni hexafloro-phosphat], và 10 mmol DIEA (*N,N*-diisopropyletylamin) được ủ trong 2 phút trong 1 mL DMF khan và thêm vào nhựa với các amin tự do. Dung dịch nhựa được khuấy trộn trong 1 giờ và môi trường phản ứng được lọc ra. Sau đó, nhựa được rửa trong 30 giây mỗi lần với 1,5 mL MC, 1,5 mL DMF và 1,5 mL MC.

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

[Đưa gốc "Fethoc-" vào đầu N] gốc "Fethoc-" được đưa vào đầu N bằng cách phản ứng các amin tự do trên nhựa với "Fethoc-OSu" trong các điều kiện ghép nối bazơ thông thường. Cấu trúc hóa học của "Fethoc-OSu" [CAS số 179337-69-0, C₂₀ H₁₇ NO₅, MW 351.36] được cung cấp như sau.



[Tách từ nhựa] Các oligome APN gắn kết với nhựa đã được tách ra khỏi nhựa bằng cách lắc nhựa trong 3 giờ trong 1,5 ml dung dịch phân tách (2,5% triisopropylsilan và 2,5% nước trong axit trifloroaxetic). Nhựa được lọc ra và dịch lọc được cô đặc dưới áp suất giảm hoặc bằng cách thổi khí nitơ qua dung dịch. Phần cặn thu được được nghiền nhỏ với 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 tách ra khỏi nhựa, sản phẩm thô APN được tinh chế bằng HPLC pha đảo C_{18} rửa giải với nước/acetonitril hoặc nước/metanol (phương pháp gradient) chứa 0,1% TFA. Hình 15A và Hình 15B là các sắc phổ HPLC mẫu mực cho "HIF-ASO 1" trước và sau khi tinh chế HPLC, tương ứng. Trình tự oligome của "HIF-ASO 1" được cung cấp trong Bảng 1.

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

Các dẫn xuất APN được điều chế theo các quy trình tổng hợp ở trên có hoặc không có các sửa đổi nhỏ. Các dẫn xuất APN của sáng chế này được thiết kế để nhắm mục tiêu vào vị trí cắt nối trong tiền ARN thông tin bao gồm nhưng không giới hạn ở tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người hoặc chuột, tiền ARN thông tin của thụ thể androgen AR) ở người hoặc chuột, tiền ARN thông tin SCN9A ở người hoặc chuột, tiền ARN thông tin dystrophin ở chuột, tiền ARN thông tin tyrosinaza ở người hoặc chuột, tiền ARN thông tin SNAP25 ở người hoặc chuột, tiền ARN thông tin IDO1 ở người, tiền ARN thông tin PD-1 ở người hoặc chuột, v.v. Việc cung cấp các dẫn xuất APN như vậy nhắm mục tiêu vào vị trí cắt nối cho một số tiền ARN thông tin là để minh họa cho các dẫn xuất APN của Công thức I, và không nên diễn giải để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với các vị trí cắt nối mục tiêu được trích dẫn làm ví dụ.

Bảng 1 cung cấp các dẫn xuất APN nhắm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 1 và exon 2 trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo phổ khối. Việc cung cấp các ASO HIF-1 α trong Bảng 1 là để minh họa cho các dẫn xuất

APN của Công thức I, và không nên diễn giải để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với các dẫn xuất APN được chỉ rõ trong Bảng 1.

Bảng 1. Các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 1 và exon 2 trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo phổ khối.

APN	Trình tự APN (N $\rightarrow$ C)	Khối lượng chính xác, m/z	
		Lý thuyết. ^a	Quan sát được. ^b
HIF-ASO 1	Fethoc-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)-TCC(1O2)-TA(5)-NH ₂	4486,05	4486,04
HIF-ASO 2	Fethoc-GA(5)AC(1O2)TT-A(5)TC-CTA(5)-C(1O2)T-NH ₂	4473,99	4474,02
HIF-ASO 3	Fethoc-G(5)AA(5)-CTT-A(5)TC-CTA(5)-C(1O2)T-NH ₂	4462,03	4462,07
HIF-ASO 4	Fethoc-GA(5)A-C(1O2)TT-A(5)TC-CTA(5)-CT-NH ₂	4376,94	4376,99
HIF-ASO 5	Fethoc-G(5)AA(6)-CTT-A(6)TC-CTA(6)-C(1O2)T-NH ₂	4504,07	4504,09
HIF-ASO 6	Fethoc-A(6)GA-A(6)CT-TA(6)T-CC(1O2)T-A(6)CT-TA(6)-NH ₂	5393,47	5393,44
HIF-ASO 7	Fethoc-C(1O5)TT-A(6)TC-CTA(6)-C(1O2)TT-AA(6)C-NH ₂	4784,18	4784,14
HIF-ASO 8	Fethoc-CTC(1O2)-A(6)TC-CTA(6)-C(1O2)TT-AA(6)C-NH ₂	4727,13	4727,79
HIF-ASO 9	Piv-A(6)TC-CTA(6)-C(1O2)TT-A(5)AC-NH ₂	3695,73	3695,74

HIF- ASO 10	Piv-Lys-AA(6)C-TTA(6)-TCC(1O2)- TA(6)C-TTA(5)-Val-NH ₂	4844,33	4844,33
HIF- ASO 11	Fethoc-A(6)GA-A(6)CT-CA(6)T- CC(1O2)T-A(6)CT-TA(6)-NH ₂	5448,54	5448,50
HIF- ASO 12	H-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)-TCC(1O3)- TA(5)-NH ₂	4263,98	4263,99
HIF- ASO 13	Benzoyl-CA(5)G(2O3)-AA(5)C-TTA(4)- TCC(1O2)-TA(5)-NH ₂	4441,06	4441,06
HIF- ASO 14	n-Propyl-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)- TCC(2O2)-TA(5)-NH ₂	4306,03	4306,05
HIF- ASO 15	p-Toluensulfonyl-CA(5)G-AA(5)C- TTA(2O2)-TCC(1O2)-TA(5)-NH ₂	4405,95	4405,90
HIF- ASO 16	[N-(2-Phenyletyl)amino]cacbonyl- CA(5)G(3)-AA(5)C-TTA(3)-TCC(1O2)- TA(5)-NH ₂	4426,06	4426,08
HIF- ASO 17	Fethoc-Lys-Leu-CA(5)G(2O2)-AA(5)C- TTA(8)-TCC(1O2)-TA(5)-Lys-NH ₂	4984,44	4984,46
HIF- ASO 18	N-Phenyl-N-Me-CA(5)G-AA(5)C-TTA(5)- TCC(1O2)-TA(5)-Lys-NH ₂	4468,11	4468,14

a) khối lượng chính xác về mặt lý thuyết; b) khối lượng chính xác quan sát được

Hình 15A là sắc phổ HPLC thu được với sản phẩm thô "HIF-ASO 1". Sản phẩm thô này được tinh chế bằng HPLC điều chế pha đảo C₁₈. Hình 15B là sắc phổ HPLC cho sản phẩm đã tinh chế "HIF-ASO 1". Độ tinh khiết của "HIF-ASO 1" được cải thiện rõ rệt sau quá trình tinh chế HPLC điều chế. Hình 16 cung cấp phổ ESI-TOF/MS thu được với các sản phẩm tinh khiết của "HIF-ASO 1". Việc cung cấp dữ liệu phân tích cho "HIF-ASO 1" là để minh họa cách các dẫn xuất APN của Công thức I được tinh chế và xác định trong sáng chế, và không nên diễn giải để giới hạn phạm vi của sáng chế.

Bảng 2 cung cấp các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 3 và exon 4 trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ. Việc cung cấp các ASO HIF-1 α trong Bảng 2 là để minh họa các dẫn xuất APN của Công thức I, và không nên được giải thích để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với các ASO HIF-1 α được chỉ rõ trong Bảng 2.

Bảng 2 Các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 3 và exon 4 trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ.

Ví dụ APN	Trình tự APN (N $\rightarrow$ C)	Khối lượng chính xác, m/z	
		Lý thuyết. ^a	Quan sát được. ^b
HIF- ASO 19	Fethoc-TA(5)G-TTC(102)-A(5)AA(5)- CTG(6)-TA(5)A-NH ₂	4915,27	4915,26

HIF- ASO 20	Fethoc-TA(5)G-TTC(1O2)-A(5)AA(5)- CTG(6)-CA(5)A-NH ₂	4900,27	4900,29
-------------------	--	---------	---------

a) khối lượng chính xác về mặt lý thuyết; b) khối lượng chính xác quan sát được

Bảng 3 cung cấp các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 5' kéo dài qua điểm nối của exon 5 và intron 5 trong tiền ARN thông tin của thụ thể androgen ở người (AR) đọc ra từ gen *AR* ở người (truy cập từ NCBI Trình tự tham chiếu: NC_000023.11) cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ. Việc cung cấp các ASO AR trong Bảng 3 là để minh họa các dẫn xuất APN của Công thức I và không nên được giải thích để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với các ASO AR được chỉ rõ trong Bảng 3.

Bảng 3 Các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 5 và intron 5 trong tiền ARN thông tin AR ở người cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ.

Ví dụ APN	Trình tự APN (N → C)	Khối lượng chính xác, m/z	
		Lý thuyết. ^a	Quan sát được. ^b
AR- ASO 1	Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG- C(1O2)AA(5)-G-NH ₂	4257,90	4257,92
AR- ASO 2	Fethoc-TC(1O2)C-TTA(6)-CCA(6)- GGC(1O2)-AA(6)G-G(6)-NH ₂	5207,37	5207,42
AR- ASO 3	Fethoc-TC(1O2)C-TTA(5)-CCA(5)- GGC(1O2)-AA(5)G-G(6)-NH ₂	5165,32	5165,31
AR- ASO 4	Fethoc-TA(5)C-CAG(6)-GC(1O2)A- A(5)GG(6)-C-NH ₂	4283,97	4283,96

AR- ASO 5	Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)- CA(5)A-NH ₂	3968,85	3968,86
AR- ASO 6	Fethoc-C(1O2)TT-A(5)CC-A(6)GG(6)- CA(5)A-NH ₂	3982,86	3982,88
AR- ASO 7	Ac-C(1O2)TT-A(5)CC-A(5)GG(6)-CA(5)A- NH ₂	3774,77	3774,83
AR- ASO 8	Fethoc-C(1O2)TT-A(6)CC-A(6)GG(6)- CA(6)A-NH ₂	4010,89	4010,93
AR- ASO 9	H-CTT-A(5)C(1O3)C-A(5)G(3)G- C(1O2)AA(5)-G-NH ₂	4092,89	4092,90
AR- ASO 10	Benzoyl-CTT-A(5)C(1O5)C-A(5)G(2O2)G- C(1O2)AA(5)-G-NH ₂	4254,96	4254,99
AR- ASO 11	n-Propyl-CTT-A(5)C(2O2)C-A(3)G (2O3)G- C(1O2)AA(5)-G-NH ₂	4150,93	4150,93
AR- ASO 12	p-Toluensulphonyl-CTT-A(5)C(1O2)C- A(8)G(5)G-C(1O2)AA(5)-G-NH ₂	4302,96	4302,90
AR- ASO 13	Fethoc-Lys-Leu-CTT-A(5)C(1O2)C- A(2O2)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH ₂	4629,16	4629,16
AR- ASO 14	Fethoc-CTT-A(5)C(1O2)C-A(5)GT- C(1O2)TA(5)-G-NH ₂	4223,88	4223,93
AR- ASO 15	N-Phenyl-N-Me-CTT-A(5)C(1O2)C- A(5)GG-C(1O2)AA(5)-G-Lys-NH ₂	4239,96	4240,00

a) khối lượng chính xác về mặt lý thuyết; b) khối lượng chính xác quan sát được

Bảng 4 cung cấp các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 5' kéo dài qua điểm nối của exon 4 và intron 4 trong tiền ARN thông tin SCN9A (dưới lớp kênh natri 9A) ở người đọc từ gen *SCN9A* ở người (được truy cập từ trình tự tham chiếu NCBI: NC_000002.12) cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ. Việc cung cấp các ASO SCN9A trong Bảng 4 là để minh họa các dẫn xuất APN của Công thức I và không được giải thích để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với các ASO được chỉ rõ trong Bảng 4.

Bảng 4 Các dẫn xuất APN nhằm bổ sung vào vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 4 và intron 4 trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ.

Ví dụ APN	Trình tự APN (N → C)	Khối lượng chính xác, m/z	
		Lý thuyết. ^a	Quan sát được. ^b
SCN- ASO 1	Fmoc-TA(5)A-A(5)TA(5)-CGC(102)-AA(5)A-A(5)A-NH ₂	4640,19	4640,88
SCN- ASO 2	FAM-HEX-TA(5)A-A(5)TA(5)-CGC(102)-AA(5)A-A(5)A-NH ₂	4887,24	4887,40
SCN- ASO 3	Fethoc-TA(5)A-A(5)TA(5)-CGC(102)-AA(5)A-A(5)A-NH ₂	4652,20	4652,24
SCN- ASO 4	Fethoc-TG(6)T-TA(5)A-A(5)TA(5)-CGC(102)AA(5)A-A(5)A-NH ₂	5574,61	5574,57
SCN- ASO 5	Fethoc-TA(5)C-GC(102)A-A(5)AA(5)-ACA(5)-A-NH ₂	4261,98	4262,00
SCN- ASO 6	Fethoc-TA(6)C-GC(102)A-A(6)AA(6)-ACA(6)-A-NH ₂	4318,05	4318,17

SCN- ASO 7	Fethoc-AC(1O2)T-TA(5)C-G(6)CA-A(5)AA(5)-AC(1O2)A-A(5)-NH ₂	5250,53	5250,46
SCN- ASO 8	Fmoc-TA(5)A-A(5)TA(5)-CGC(1O2)-AA(5)A-A(5)AC-A(5)A-NH ₂	5539,61	5539,57
SCN- ASO 9	Piv-TA(5)A-A(5)TA(5)-CGC(1O2)-AA(5)A-A(5)A-NH ₂	4500,17	4499,80
SCN- ASO 10	FAM-HEX-A(5)TA(5)-CGC(1O2)-AA(5)A-A(5)A-NH ₂	3970,82	3974,17
SCN- ASO 11	Fmoc-TA(6)A-A(5)TA(6)-CGC(1O2)-AA(6)A-AA(6)C-A(6)-NH ₂	534,57	5335,59
SCN- ASO 12	Fethoc-CTT-A(5)CG(6)-C(1O2)AA(5)-AA(5)A-C(1O2)AA(5)NH ₂	4975,34	4975,34
SCN- ASO 13	H-CTT-A(5)CG(3)-C(1O2)AA(5)-AA(5)A-C(1O3)AA(5)-NH ₂	4711,22	4711,25
SCN- ASO 14	Benzoyl-CTT-A(5)CG(2O2)-C(1O2)AA(5)-AA(5)A-C(1O5)AA(5)-NH ₂	4873,30	4873,32
SCN- ASO 15	n-propyl-CTT-A(5)CG(2O3)-C(1O2)AA(3)-AA(5)A-C(2O2)AA(5)NH ₂	4769,27	4769,30
SCN- ASO 16	p-Toluensulfonyl-CTT-A(5)CG(6)-C(1O2)AA(8)-AA(5)A-C(1O2)AA(5)-NH ₂	4935,32	4935,29

SCN- ASO 17	[N-(2-Phenyletyl)amino]cacbonyl-CTT-A(5)CG(6)-C(1O2)AA(2O2)-AA(5)A-C(1O2)AA(5)-NH ₂	4888,31	4888,32
SCN- ASO 18	Fethoc-CTT-A(5)CG(6)-C(1O2)TA(5)-AA(5)T-C(1O2)AA(5)-NH ₂	4957,32	4957,32
SCN- ASO 19	Fethoc-Lys-Leu-CTT-A(5)CG(6)-C(1O2)AA(4)-AA(5)A-C(1O2)AA(5)-Lys-NH ₂	5330,60	5330,60
SCN- ASO 20	N-Phenyl-N-Me-CTT-A(5)CG(6)-C(1O2)AA(5)-AA(5)A-C(1O2)AA(5)-Lys-NH ₂	4957,40	4957,42

a) khối lượng chính xác về mặt lý thuyết; b) khối lượng chính xác quan sát được

Bảng 5 cung cấp các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 3 và exon 4 trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ. Việc cung cấp các ASO SCO9A trong Bảng 5 là để minh họa các dẫn xuất APN của Công thức I, và không nên được giải thích để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với các ASO SCN9A được cung cấp trong Bảng 5.

Bảng 5 Các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 3 và exon 4 trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ.

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

		Lý thuyết. ^a	Quan sát được. ^b
SCN-ASO 21	Fethoc-TA(5)A-A(5)AG(6)-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)-NH ₂	5398,60	5398,58
SCN-ASO 22	Fethoc-AA(5)G-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA(5)-A-NH ₂	4282,97	4283,00
SCN-ASO 23	Fethoc-AA(5)G-TG(6)T-AC(1O2)C-TAA(5)-A-NH ₂	4182,87	4182,89
SCN-ASO 24	Fethoc-A(5)AG-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TAA-A(5)-NH ₂	4282,97	4283,00
SCN-ASO 25	Fethoc-AAG(6)-TG(6)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A-NH ₂	4281,98	4282,05
SCN-ASO 26	Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)-NH ₂	4369,06	4369,08
SCN-ASO 27	Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)C-NH ₂	4620,16	4620,14
SCN-ASO 28	Fethoc-A(5)GT-G(5)TA(5)-CC(1O2)T-A(5)AA(5)-C-NH ₂	4345,56	4345,08
SCN-ASO 29	Fethoc-AA(6)G-TG(5)T-A(6)CC(1O2)-TA(6)A-A(6)C-NH ₂	4676,22	4676,25
SCN-ASO 30	Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)G-NH ₂	4660,16	4660,15
SCN-ASO 31	Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)CA-NH ₂	4895,27	4895,20
SCN-ASO 32	Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-A(5)CC(1O2)-TA(5)A-A(5)GG-NH ₂	4951,27	4951,26
SCN-ASO 33	Fethoc-AA(5)G-TG(5)T-ACC(1O2)-TA(5)A-A(5)CA(5)-C-NH ₂	5146,37	5146,35

a) khối lượng chính xác về mặt lý thuyết; b) khối lượng chính xác quan sát được

Bảng 6 cung cấp các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối cụ thể trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người hoặc chuột cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ. Việc cung cấp các ASO SCN9A trong Bảng 6 là để minh họa các dẫn xuất APN của Công thức I và không nên được giải thích để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với các ASO SCN9A được chỉ rõ trong Bảng 6.

Bảng 6 Các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối cụ thể (SS) trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người hoặc chuột cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ.

Ví dụ APN	Loài	Vị trí mục tiêu ^a	Trình tự APN (N → C)	Khối lượng chính xác, m/z	
				Lý thuyết. ^b	Quan sát được. ^c
SCN-ASO 34	Ở người	Vị trí cắt nối 5' (5' SS) của Exon 2	Fethoc-GA(5)T-A(5)TG-A(5)GT-G(6)TA(5)-C(102)TA(5)-A-NH ₂	5346,49	5346,46
SCN-ASO 35	Chuột	Vị trí cắt nối 5' (5' SS) của	Fethoc-GA(5)T-A(5)TG-A(5)GT-G(6)CA(5)-C(102)TA(5)-A-NH ₂	531,49	531,52

		Exon 2			
SCN- ASO 36	Ở người & Chuột	Vị trí cắt nối 5' (5' SS) của Exon 7	Fethoc-A(5)TA(5)- CC(102)C-TG(6)A- A(5)TC-TG(6)T-NH ₂	4866,26	4866,29
SCN- ASO 37	Người & Chuột	Vị trí cắt nối 3' (3' SS) của Exon 15	Fethoc-AA(5)G- A(5)C(12)T-CG(6)G- A(5)GC(102)-TA(5)- NH ₂	4772,23	4772,21

a) SS biểu thị vị trí cắt nối; b) khối lượng chính xác về mặt lý thuyết; và c) khối lượng chính xác quan sát được.

"SCN-ASO 34" là một ASO 16 me hoàn toàn bổ sung cho vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 2 và intron 2 trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người. "SCN-ASO 34" có một chồng lắp bổ sung 11 me với exon 2 và một chồng lắp bổ sung 5 me với intron 2 như được đánh dấu " đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin SCN9A 25 me ở người của [5' → 3') GAUUUUAGUACACUC | auauccuuuu].

"SCN-ASO 35" là một ASO 16 me nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 2 và intron 2 trong tiền ARN thông tin của SCN9A "ở chuột". "SCN-ASO 35" có một chồng lắp bổ sung 11 me với exon 2 và một chồng lắp bổ sung 5 me với intron 2 như được đánh dấu " đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin SCN9A 25 me ở chuột của [(5' →

3') GAUCUUAGUGCACUC | auaucuuuc] đọc từ ADN bộ gen của chuột [truy cập từ trình tự tham chiếu NCBI: NC_005102.3]. "SCN-ASO 35" có một sự không phù hợp duy nhất với tiền ARN thông tin SCN9A ở người như được đánh dấu bằng một dấu ngoặc kép (" ") trong trình tự tiền ARN thông tin 25-mer của [(5' → 3') GAUUUUAGU"A"CACUC | auaucuuuu]

"SCN-ASO 36" là một ASO 15 me nhắm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 7 và intron 7 trong tiền ARN thông tin của SCN9A ở người. "SCN-ASO 36" có một chồng lấp bổ sung 11 me với exon 7 và một chồng lấp bổ sung 4 me với intron 7 được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin SCN9A 25 me ở người của [5' → 3') CAGCACAGAUUCAGG | guauguaaua]. Trình tự mục tiêu của "SCN-ASO 43" được bảo tồn trong tiền ARN thông tin SCN9A ở chuột.

"SCN-ASO 37" là một ASO 14 me nhắm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 14 và exon 15 trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người. "SCN-ASO 37" có một chồng lấp bổ sung 3 me với intron 14 và một chồng lấp bổ sung 11 me với exon 15 được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin SCN9A ở người của [5' → 3') uugcuuuuag | CUCCGAGUCUUCAAG]. Trình tự mục tiêu của ASO được bảo tồn trong tiền ARN thông tin của SCN9A và được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin 25 me ở chuột của [(5' → 3') uuauuucuag | CUCCGAGUCUUCAAG].

Bảng 7 cung cấp các dẫn xuất APN nhắm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' hoặc 5' của exon 23 trong tiền ARN thông tin dystrophin ở chuột đọc từ ADN bộ gen của chuột [được truy cập từ trình tự tham chiếu NCBI: NC_000086.7] cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng khối phổ. Việc cung cấp các ASO dystrophin trong Bảng 7 là để minh họa các dẫn xuất APN của Công thức I, và không nên diễn giải để giới hạn phạm vi của sáng chế của các ASO dystrophin được chỉ rõ trong Bảng 7.

Bảng 7 Các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' hoặc 5' của exon 23 trong tiền ARN thông tin dystrophin ở chuột cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ.

Ví dụ APN	Vị trí mục tiêu ^a	Trình tự APN (N → C)	Khối lượng chính xác, m/z	
			Lý thuyết. ^b	Quan sát được. ^c
DMD- ASO 1	Vị trí cắt nối 3' (3' SS)	Fethoc-A(5)GA-G(6)CC(1O2)-TCA- A(5)AA(5)-T-NH ₂	4267,97	4267,97
DMD- ASO 2	Vị trí cắt nối 3' (3' SS)	Fethoc-TTG(6)-CA(5)G-AG(6)C- C(1O2)TC-AA(5)A-A(5)T-NH ₂	5441,49	5441,54
DMD- ASO 3	Vị trí cắt nối 3' (3' SS)	Fethoc-TTG(6)-CA(6)G-AG(6)C- C(12)TC-AA(6)A-A(6)T-NH ₂	5483,54	5483,55
DMD- ASO 4	Vị trí cắt nối 3' (3' SS)	Fethoc-A(6)CT-TTG(6)-CA(6)G- A(6)GC(1O2)-CTC(1O2)-AA(6)-NH ₂	5571,59	5571,59
DMD- ASO 5	Vị trí cắt nối 3' (3' SS)	Fethoc-TG(6)C-A(5)GA- G(6)CC(1O2)-TCA(5)-A-NH ₂	4258,96	4258,98

DMD- ASO 6	Vị trí cắt nối 5' (5' SS)	Fethoc-C(12)TC-GG(6)C-TTA(6)- CC(102)T-GA(6)A-A(6)TT-NH ₂	5672,52	5672,51
DMD- ASO 7	Vị trí cắt nối 5' (5' SS)	Fethoc-C(102)TT-A(5)CC(102)- TG(6)A-AA(5)T-TT-NH ₂	4488,00	4488,00

a) SS biểu thị vị trí cắt nối; b) khối lượng chính xác về mặt lý thuyết; và c) khối lượng chính xác quan sát được.

Bảng 8 cung cấp các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối trong tiền ARN thông tin indoleamin 2,3-dioxygenaza (IDO1) ở người hoặc chuột cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ. Các trình tự tiền ARN thông tin IDO 1 ở người và chuột đã được đọc từ ADN bộ gen của người [truy cập từ Trình tự tham chiếu NCBI: NC_000008.11] và ADN bộ gen của chuột [được truy cập từ Trình tự tham chiếu NCBI: NC_000074], tương ứng. Việc cung cấp các ASO IDO1 trong Bảng 8 là để minh họa các dẫn xuất APN của Công thức I và không nên được giải thích để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với các ASO IDO1 được chỉ rõ trong Bảng 8.

Bảng 8. Các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào một vị trí điểm nối cụ thể (SS) trong tiền ARN thông tin IDO1 của người hoặc chuột cùng với dữ liệu đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ.

Ví dụ APN	Loài	Vị trí mục tiêu ^a	Trình tự APN (N → C)	Khối lượng chính xác, m/z	
				Lý thuyết. ^b	Quan sát được. ^c

IDO- ASO 1	Ở người	Vị trí cắt nối 3' (3' SS) của Exon 7	Fethoc-GG(6)A-A(5)TT- A(5)CC(102)-TAA(5)-A-NH ₂	4282,97	4283,00
IDO- ASO 2	Ở người	Vị trí cắt nối 3' (3' SS) của Exon 7	Fethoc-AA(5)T-TA(5)C-CTA(5)- AA(5)A-C(102)A-NH ₂	4503,08	4503,09
IDO- ASO 3	Chuột	Vị trí cắt nối 3' (3' SS) của Exon 7	Fethoc-GG(5)G-A(5)TT- G(5)CC(102)-TTT-A(5)AA(5)- NH ₂	4918,24	4918,26
IDO- ASO 4	huật	Vị trí cắt nối 3' (3' SS) của Exon 7	Fethoc-GG(5)G-A(5)TT- G(5)CC(102)-TTT-A(5)-NH ₂	4267,91	4267,93
IDO- ASO 5	Ở người	Vị trí cắt nối 5' (5' SS) của Exon 3	Fethoc-CA(5)A-A(5)CC(102)- TTA(5)-CGG(6)-A-NH ₂	4243,96	4243,98
IDO- ASO 6	Ở người	Vị trí cắt nối 3' (3' SS) của Exon 4	Fethoc-GG(6)C-AA(5)G- A(5)CC(102)-TGA(5)-T-NH ₂	4299,96	4299,97

a) SS biểu thị vị trí cắt nối; b) khối lượng chính xác về mặt lý thuyết; và c) khối lượng chính xác quan sát được.

Bảng 9 cung cấp các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3 của "exon 7" trong tiền ARN thông tin SNAP25 ở người đọc từ gen SNAP25 của người [Trình tự tham chiếu NCBI: NG_029626.1] cùng với dữ liệu xác định

đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ. Việc cung cấp các ASO SNAP25 trong Bảng 9 là để minh họa cho các dẫn xuất APN của Công thức I và không được giải thích để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với các ASO SNAP25 được chỉ rõ trong Bảng 9.

Bảng 9 Các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 6 và exon 7 trong tiền ARN thông tin SNAP25 ở người cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ.

Ví dụ APN	Trình tự APN (N → C)	Khối lượng chính xác, m/z	
		Lý thuyết. ^a	Quan sát được. ^b
SNAP- ASO 1	Fethoc-A(6)TT-TG(6)T-TA(6)C-CC(1O2)T- GG(6)G-A(6)-NH ₂	5188,36	5188,38
SNAP- ASO 2	Fethoc-TG(5)T-TA(6)C-C(1O2)CT-GG(5)G- A(5)-NH ₂	4266,93	4266,95
SNAP- ASO 3	Fethoc-TG(5)T-TA(6)C-C(1O2)CT-GG(5)G- A(5)T-NH ₂	4533,03	4533,04
SNAP- ASO 4	Fethoc-TG(5)G-TA(5)C-C(1O2)CT-TG(5)G- A(5)T-NH ₂	4519,01	4518,95
SNAP- ASO 5	Fethoc-TG(6)T-TA(3)C-CC(1O5)T-GG(6)G- A(3)T-NH ₂	4533,03	4533,04
SNAP- ASO 6	Fethoc-G(5)TT-A(5)CC(1O2)-CTG- G(5)GA(5)-TC(1O2)-NH ₂	4601,07	4601,08
SNAP- ASO 7	Fethoc-C(1O2)AT-TTG(6)-TTA(5)- CCC(1O2)-TG(6)-NH ₂	4478,98	4478,99
SNAP- ASO 8	Fethoc-CA(6)T-TTG(5)-TTA(5)-CCC(1O2)- TG(5)-NH ₂	4468,02	4468,04

SNAP- ASO 9	Fethoc-A(6)TT-TG(5)T-TA(5)C-C(1O2)CT-G(5)-NH ₂	4216,91	4216,93
SNAP- ASO 10	Fethoc-CA(6)T-CA(6)T-TTG(5)-TTA(5)-CCC(1O2)-TG(5)-NH ₂	5374,45	5374,44
SNAP- ASO 11	Fethoc-A(6)TT-TG(5)T-TA(6)C-C(1O2)CT-GG(5)G-A(5)-NH ₂	5188,36	5188,35
SNAP- ASO 12	Fethoc-A(6)TT-TG(5)T-TA(6)C-C(1O2)CT-G(5)G-NH ₂	4522,04	4522,05

a) khối lượng chính xác về mặt lý thuyết; và b) khối lượng chính xác quan sát được

Bảng 10 cung cấp các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 1 và exon 2 trong tiền ARN thông tin tyrosinaza (TYR) ở người được đọc từ gen TYR của người [Trình tự tham chiếu NCBI: NG_0008748], hoặc tiền ARN thông tin đọc TYR ở chuột được đọc từ ADN bộ gen của chuột [được truy cập từ Trình tự tham chiếu NCBI: NC_000073] Việc cung cấp các ASO TYR trong Bảng 10 là để minh họa các dẫn xuất APN của Công thức I, và không nên hiểu để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với các ASO TYR được chỉ rõ trong Bảng 10.

Bảng 10 Các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 1 và exon 2 trong tiền ARN thông tin TYR ở người hoặc chuột cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ.

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

			Lý thuyết. ^a	Quan sát được. ^b
TYR-ASO 1	Ở người	Fethoc-CA(5)G-ACA(5)-ATC(102)-TG(6)T-A(5)-NH ₂	4258,96	4260,99
TYR-ASO 2	Ở người	Fethoc-AC(12)A-GA(5)C-AA(5)T-CTG(6)-TA(5)C(102)-AA(5)-NH ₂	5532,55	5532,54
TYR-ASO 3	Ở người	Fethoc-AC(102)A(5)-GA(5)C-AA(5)T-CTG(6)-C(102)C-NH ₂	4592,11	4592,11
TYR-ASO 4	Chuột	Fethoc-CA(5)A-A(5)TG-A(5)TC(102)-TG(6)TG-NH ₂	4289,95	4289,96

a) khối lượng chính xác về mặt lý thuyết; và b) khối lượng chính xác quan sát được

Bảng 11 cung cấp các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' hoặc 5' của exon 2 trong tiền ARN thông tin PD-1 ở người đọc từ gen *PDCDI* của người [Trình tự tham chiếu NCBI: NG_012110], hoặc –tiền ARN thông tin PD-1 ở chuột đọc từ ADN bộ gen của chuột [được truy cập từ Trình tự tham chiếu NCBI: NC_000067] Việc cung cấp các ASO PD-1 trong Bảng 11 là để minh họa các dẫn xuất APN của Công thức I, và không nên hiểu để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với các ASO PD-1 được chỉ rõ trong Bảng 11.

Bảng 11 Các dẫn xuất APN nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' hoặc vị trí cắt nối 5' của exon 2 trong tiền ARN thông tin PD-1 ở người hoặc chuột cùng với dữ liệu xác định đặc tính cấu trúc bằng phép đo khối phổ.

Ví dụ APN	Loài	Trình tự APN (N → C)	Khối lượng chính xác, m/z	
			Lý thuyết. ^a	Quan sát được. ^b

PD- ASO 1	Ở người	Fethoc-C(1O2)TG(6)-GG(6)G-AG(6)T- CTG-A(5)G-NH ₂	4636,07	4636,08
PD- ASO 2	Chuột	Fethoc-CC(1O2)T-CA(5)C-CTG(5)- TTA(5)-C(1O2)CA(5)-C-NH ₂	5022,27	5022,27
PD- ASO 3	Ở người	Fethoc-CG(6)C-A(5)CC-TG(6)T- CA(5)C-C(1O2)C-NH ₂	4422,03	4422,05

a) SS biểu thị vị trí cắt nối; b) khối lượng chính xác về mặt lý thuyết; và c) khối lượng chính xác quan sát được.

Ái lực gắn kết của các dẫn xuất APN kiểu mẫu đối với ARN hoặc ADN bổ sung

Các dẫn xuất APN 10 me có các nucleobazơ đã được biến đổi đã được điều chế như các hợp chất mẫu để minh họa cho ái lực mạnh mẽ của các hợp chất APN của Công thức I đối với ARN cũng như ADN. Các hợp chất APN kiểu mẫu này được điều chế theo các quy trình tổng hợp được cung cấp trong sáng chế hoặc với các sửa đổi nhỏ. Các dẫn xuất APN 10 me được cung cấp trong Bảng 12 cùng với dữ liệu nhận dạng cấu trúc bằng phép đo khối phổ.

Bảng 12. Các dẫn xuất APN 10-mer như các hợp chất mẫu để minh họa cho ái lực mạnh mẽ đối với ARN hoặc ADN của các hợp chất APN có công thức I.

Ví dụ APN	Trình tự APN (N → C)	Khối lượng chính xác, m/z	
		Lý thuyết. ^a	Quan sát được. ^b
APN 10-1	Fmoc-GTA-GAT-CAC-T-NH ₂	2948,14	2949,05
APN 10-2	Fmoc-GTA-GA(5)T-CAC-T-NH ₂	3048,24	3050,41
APN 10-3	Fmoc-GTA(5)-GAT-CA(5)C-T-NH ₂	3148,34	3150,65
APN 10-4	Fmoc-GTA(5)-GA(5)T-CA(5)C-T-NH ₂	3248,44	3250,81
APN 10-5	Fmoc-GTA-G(5)AT-CAC-T-NH ₂	3032,25	3035,01

APN 10-6	Fmoc-GTA-GAT-C(1O2)AC-T-NH ₂	3044,21	3047,02
APN 10-7	Fmoc-GTA(5)-GA(5)T-C(1O2)AC-T-NH ₂	3245,39	3248,10

a) khối lượng chính xác về mặt lý thuyết; và b) khối lượng chính xác quan sát được

Các oligome APN 10 me trong Bảng 12 đã được đánh giá về ái lực gắn kết của chúng đối với ARN hoặc ADN 10 me bổ sung bằng cách đo các giá trị T_m như được mô tả dưới đây.

Dung dịch hỗn hợp của 4 μ M oligome APN 10-mer và 4 μ M ADN hoặc ARN 10-mer bổ sung trong 4 mL dung dịch đệm nước (pH = 7,16, 10 mM natri phosphat, 100 mM NaCl) trong ống ly tâm nhựa (falcon) polypropylen dung tích 15 ml được ủ ở 90 ° C trong một phút và làm lạnh từ từ đến nhiệt độ môi trường. Sau đó, dung dịch được chuyển vào một cuvet UV thạch anh 4 mL và được đo T_m ở bước sóng 260nm trên quang phổ kế UV/nhìn thấy được như được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này trước đây [PCT/KR2009/001256] hoặc với các sửa đổi nhỏ. ADN và ARN để đo T_m được mua từ Bione (www.bione.com, Dajeon, Hàn Quốc) và được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

Bảng 13 cung cấp các giá trị T_m (chưa được hiệu chỉnh) được đo giữa các oligome APN kiểu mẫu và ADN hoặc ARN bổ sung. "APN 10-1", oligome APN tham chiếu không có nucleobazơ đã được biến đổi, thu được các giá trị T_m là 51 và 55°C so với ADN và ARN bổ sung, tương ứng. Các oligome APN kiểu mẫu có (các) nucleobazơ đã được biến đổi có xu hướng thể hiện giá trị T_m cao hơn với sự kết hợp nhiều hơn các nucleobazơ đã được biến đổi. "APN 10-7" cũng cho thấy T_m là 69°C so với ADN và ARN bổ sung, cho thấy rằng các oligome APN kiểu mẫu gắn kết với ADN và ARN bổ sung của chúng với ái lực gắn kết tương đương.

Bảng 13 Giá trị T_m giữa APN 10 me và ADN hoặc ARN bổ sung.

APN	ADN hoặc ARN bổ sung	T_m , °C	ΔT_m^a , °C
APN 10-1	ADN (5' → 3') AGT-GAT-CTA-C	51	-

APN 10-2		55	+ 4
APN 10-3		61	+ 10
APN 10-4		66	+ 15
APN 10-5		53	+ 2
APN 10-6		59	+ 8
APN 10-7		69	+ 18
APN 10-1	ARN (5' → 3') AGU-GAU-CUA-C	55	-
APN 10-4		66	+ 11
APN 10-7		69	+ 18

a) Giá trị T_m - Giá trị T_m của "APN 10-1"

Ái lực gắn kết của các dẫn xuất APN đối với ADN bổ sung 10 mer

Các dẫn xuất APN của Công thức I được đánh giá về ái lực gắn kết của chúng đối với các ADN 10 me nhắm mục tiêu bổ sung vào đầu cuối N hoặc đầu cuối C. Ái lực gắn kết được đánh giá bằng giá trị T_m đối với song công giữa APN và ADN bổ sung 10 mer. Sự song công giữa các dẫn xuất APN và các ADN có sự bổ sung đầy đủ thường cho thấy các giá trị T_m quá cao để được xác định một cách đáng tin cậy trong dung dịch đệm nước. Dung dịch đệm nước có xu hướng sôi trong khi đo T_m .

Các giá trị T_m quan sát được (chưa được hiệu chỉnh) của các dẫn xuất APN của Công thức I là rất cao đối với gắn kết bổ sung với ADN 10-mer và được cung cấp trong Bảng 14. Ví dụ: "AR-ASO 1" cho thấy giá trị T_m là 86,1 °C đối với song công với ADN bổ sung 10 me nhắm mục tiêu vào 10 me đầu N trong APN như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong [(N → C) Fethoc- **C(102)TT-A(5)CC-A(5)GG-C(102)AA(5)-G-NH₂**]. Trong khi đó, "AR-ASO 1" cho thấy giá trị T_m là 81,3 °C đối với song công với ADN bổ sung 10 me nhắm mục tiêu vào 10 me đầu C trong APN như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong [(N → C) Fethoc-C(102)TT-**A(5)CC-A(5)GG-C(102)AA(5)-G-NH₂**].

Bảng 14 Giá trị T_m giữa APN và ADN bổ sung 10 me nhằm mục tiêu vào đầu N hoặc đầu C của APN.

APN	Giá trị T_m , °C	
	ADN 10 me với đầu N	ADN 10 me với đầu C
AR-ASO 1	86,1	81,3
AR-ASO 4	84,3	84,5
AR-ASO 5	84,4	78,4
HIF-ASO 1	66,0	60,0
HIF-ASO 4	66,0	53,4
HIF-ASO 5	62,0	58,0
HIF-ASO 7	69,0	61,0
HIF-ASO 8	73,0	61,0
HIF-ASO 9	60,9	59,0
HIF-ASO 10	61,0	60,0
HIF-ASO 11	73,4	61,0
SCN-ASO 4	63,5	71,6
SCN-ASO 7	65,0	64,6
SCN-ASO 8	74,0	68,6
SCN-ASO 12	76,0	77,0
SCN-ASO 22	74,0	65,0
SCN-ASO 24	77,0	66,0
SCN-ASO 25	78,0	66,0
SCN-ASO 26	75,0	72,0
SCN-ASO 27	77,0	69,0
SCN-ASO 28	78,1	70,0
SCN-ASO 30	79,0	74,0
SNAP-ASO 2	76,0	87,6
SNAP-ASO 3	77,3	88,7
SNAP-ASO 8	58,0	68,0

SNAP-ASO 9	62,0	76,0
SNAP-ASO 10	61,0	68,0
SNAP-ASO 12	62,0	74,0
TYR-ASO 1	78,0	73,0
TYR-ASO 4	72,0	72,0

Ví dụ về hoạt tính của ASO HIF-1 α in vitro

Các dẫn xuất APN của Công thức I nhằm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' của exon 2 hoặc exon 4 trong tiền ARN thông tin HIF-1 α (yếu tố có thể gây sự giảm oxy huyết 1 α) ở người đã được đánh giá đối với hoạt tính nhảy exon antisense HIF-1 α của chúng trong các tế bào HeLa. Các ví dụ sinh học đối với các ASO HIF-1 α này được cung cấp làm ví dụ để minh họa rằng việc nhảy Exon được gây ra có hiệu lực bởi hợp chất của Công thức I nhằm mục tiêu vào vị trí cắt nối trong tiền ARN thông tin mục tiêu, và do đó không nên hiểu để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với ASO HIF-1 α .

HIF-1 α Ví dụ 1. Nhảy Exon gây ra bởi "HIF-ASO 2".

"HIF-ASO 2" được chỉ rõ trong Bảng 1 là ASO 14 me bổ sung đầy đủ cho một khu vực trong vị trí cắt nối 3' của exon 2 trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin 20 me của [(5' $\rightarrow$ 3') uguuua**aguag** | **GAUAAGUUCU**], trong đó biểu tượng " | " là viết tắt của điểm nối intron-exon. "HIF-ASO 2" có một chồng lắp bổ sung 5 me với intron 1 và một chồng lắp bổ sung 9 me với exon 2.

"HIF-ASO 2" được đánh giá bằng phương pháp PCR lồng của HIF-1 α về khả năng của nó để tạo ra sự nhảy Exon 2 của ARN thông tin HIF-1 α ở người trong các tế bào HeLa. Các quy trình được sử dụng được cung cấp dưới đây.

[Nuôi cấy tế bào & điều trị ASO] Các tế bào HeLa (Cat. Số CCL-2, ATCC) được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa 5 ml môi trường EMEM bổ sung

10% FBS (huyết thanh bào thai bò), 1% streptomycin/penicillin, 1 % L-glutamin và 1% natri pyruvat dưới khí quyển 5% CO₂ ở 37°C. Các tế bào được xử lý bằng "HIF-ASO 2" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM. ASO đã được pha loãng liên tiếp tới nồng độ thích hợp trong DDW và được chia vào các đĩa nuôi cấy.

[Trích xuất ARN] 5 giờ sau đó, toàn bộ ARN đã được trích xuất bằng cách sử dụng bộ Kit chiết tách ARN phổ biến (Cat. Số 9767, Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

[Tổng hợp cADN bằng phương pháp RT-PCR một bước] 200 ng mẫu ARN trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 µL bằng cách sử dụng bộ Kit RT-PCR Một bước Super Script® với Taq polymeraza Platinum® (Cat. Số 10928-042, Invitrogen) với bộ mồi đặc hiệu exon [HIF-exon 1_xuôi: (5' → 3') CTTGCCTTTCCTTCTCTTCT; HIF-exon 8_ngược: (5' → 3') AACCCAGACATATCCACC] theo các điều kiện chu kỳ sau: 50 °C trong 30 phút và 94 °C trong 2 phút, sau đó là 15 chu kỳ 30 giây ở 94 °C, 30 giây ở 55°C và 1 phút ở 7 °C.

[Khuếch đại PCR lồng] 1 µL cADN trải qua phản ứng PCR lồng 20 µL (Cat. Số K2612, Bione) với bộ mồi exon [HIF-exon 1n_xuôi: (5' → 3') TGAAGACATCGCGGGGAC; HIF-exon 5n_ngược: (5' → 3') TTTTTCACAAGG-CCATTTCT] theo các điều kiện chu kỳ sau: 95°C trong 5 phút sau đó là 39 chu kỳ 30 giây ở 95°C, 40 giây ở 50°C và 50 giây ở 72°C.

Các bộ mồi đặc hiệu exon cho phương pháp RT-PCR một bước và khuếch đại PCR lồng được tóm tắt dưới dạng sơ đồ trong Hình 17A.

[Nhận dạng sản phẩm "nhảy Exon 2"] Các sản phẩm PCR được phân tách điện di trên gel agarosa 2% cùng với dung dịch đánh dấu kích thước. Các dải có kích thước mục tiêu được thu thập và phân tích bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Các dải PCR quan sát được tương ứng với ARN thông tin có đủ độ dài (nghĩa là không nhảy Exon) và biến thể cắt nối thiếu exon 2 như được chỉ định trong Hình 17B. Các tế bào được xử lý bằng ASO mang lại một dải PCR mạnh có kích thước có thể gán cho việc nhảy Exon 2. Các tế bào không được xử lý ASO

(nghĩa là đối chứng âm) cũng mang lại sản phẩm PCR tương ứng với việc nhảy Exon 2, cho thấy exon 2 bị xóa một cách tự nhiên ở một mức độ nhất định. Tuy nhiên, cường độ của dải nhảy Exon mạnh hơn nhiều trong các tế bào được điều trị bằng ASO so với trong các tế bào không được xử lý ASO. Do đó, "HIF- ASO 2" đã thúc đẩy việc nhảy Exon 2 trong các tế bào HeLa. Dữ liệu giải trình tự đối với dải nhảy exon được cung cấp trong Hình 17C, biểu hiện trình tự ARN thông tin cho điểm nối của exon 1 và exon 3.

[Số lượng tế bào bị ảnh hưởng bởi một phân tử ASO duy nhất] "HIF-ASO 2" gây ra nhảy exon 2 ngay cả ở 10 zM. Có khoảng 30 phân tử ASO ở nồng độ 10 zM (nghĩa là 10^{-21} M) trong 5 mL môi trường nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm. Cho rằng khoảng 30 phân tử ASO gây ra việc nhảy ở khoảng 100.000 tế bào HeLa trong đĩa nuôi cấy 60 mm, mỗi phân tử ASO được ước tính đã ảnh hưởng hoặc kiểm soát việc nhảy Exon ở khoảng 3.000 tế bào HeLa. Do đó, mỗi phân tử ASO được coi là đã nhanh chóng đảo xung quanh một số lượng lớn các tế bào để thực hiện vai trò định sẵn của nó đối với việc nhảy Exon.

HIF-1 α Ví dụ 2. Ức chế biểu hiện protein HIF-1 α trong các tế bào HeLa bằng "HIF-ASO 2".

"HIF-ASO 2" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế sự biểu hiện của protein HIF-1 α trong các tế bào HeLa như được mô tả dưới đây.

[Nuôi cấy tế bào và điều trị ASO] Các tế bào HeLa được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60mm chứa 5ml môi trường nuôi cấy được điều trị với "HIF-ASO 2" ở 0 zM (đối chứng âm), 10 zM, 100 zM, 1 aM, hoặc 10 aM.

[Điều trị CoCl₂ và phân giải tế bào] 24 giờ sau khi điều trị ASO, các đĩa nuôi cấy ngoại trừ một đĩa không qua xử lý ASO được điều trị với 200 μ M CoCl₂ trong 3 giờ nữa để điều chỉnh tăng mức protein HIF-1 α bằng cách ngăn chặn hoạt tính của các prolylhydroxylaza (PHD). Sau đó, các tế bào được rửa 2 lần với 1 mL PBS lạnh và được ly giải trên đá với 200 μ L dung dịch đệm RIPA một lần (Cat. Number 9806, Cell Signaling Tech) được bổ sung với 1% SDS và dung dịch chất ức chế proteinaza một lần (cOmplete Mini, Roche). Mỗi dịch phân giải được thu thập trong ống điện tử dung tích 1,5 ml, trộn với 100 μ L dung dịch đệm mẫu

5 lần và đun sôi trong 5 phút ở 100°C. Các dịch phân giải đã được phân tách điện di trên gel 8% SDS-PAGE và được chuyển vào màng PVDF 0,45 μm . Màng này đã được thăm dò với một kháng thể kháng HIF-1 α (Cat. Number 610958, BD Biosciatics) và một kháng thể kháng β -actin (Cat. Number sc4778, Santa Cruz).

[Ức chế biểu hiện protein HIF-1 α] Hình 18A cung cấp dữ liệu Western blot HIF-1 α thu được ở các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 2". Trong khi không có dải HIF-1 α được phát hiện với dịch phân giải của các tế bào mà không xử lý CoCl_2 , các dịch phân giải của các tế bào được xử lý bằng CoCl_2 tạo ra một dải mạnh cho HIF-1 α . Hình 18B cung cấp cường độ dải HIF-1 α riêng lẻ được chuẩn hóa theo từng cường độ dải β -actin riêng lẻ bằng phép đo mật độ. Biểu hiện HIF-1 α giảm dần khi nồng độ "HIF-ASO 2" tăng lên. Mức giảm quan sát được là 75% ở mức 10 μM "HIF-ASO 2".

HIF-1 α Ví dụ 3. Phương pháp qPCR bằng SYBR Green đối với ARN thông tin HIF-1 α trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 2".

"HIF-ASO 2" được đánh giá bằng phương pháp qPCR lồng về khả năng của nó để ức chế sự biểu hiện của ARN thông tin HIF-1 α đủ độ dài trong các tế bào HeLa như sau.

[Nuôi cấy tế bào & xử lý ASO] Các tế bào HeLa được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa 5 ml môi trường được xử lý bằng "ASO 2" ở mức 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 μM (2 đĩa nuôi cấy cho mỗi nồng độ ASO).

[Trích xuất ARN] 3 giờ sau khi điều trị ASO, toàn bộ ARN được chiết xuất bằng "Bộ Kit tách chiết ARN phổ quát MiniBEST" (Cat. Số 9767, Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

[Tổng hợp cADN bằng phương pháp RT-PCR một bước] 200 ng mẫu ARN được trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 μL bằng cách sử dụng bộ kit phương pháp RT-PCR Một bước Super Script[®] với polymeraza Taq Platinum[®] (Cat. Số 10928-042, Invitrogen) với bộ mồi đặc hiệu exon [HIF-exon 1_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') CTTGCCTTTCCTTCTCTTCT; HIF-exon 8_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') AACCCAGACATATCCACC] theo các điều kiện chu kỳ sau: 50°C trong 30 phút

và 94°C trong 2 phút, sau đó là 15 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 55°C và 1 phút ở 72°C.

[Phương pháp qPCR lồng] 1 µL cADN được pha loãng 100 lần được trải qua phản ứng PCR thời gian thực 20 µL với các bộ mồi đặc hiệu exon sau: [HIF-exon 2n_xuôi (5' → 3') CTTGCTCATCAGTTGCCACTTC; HIF-exon 2n_ngược (5' → 3') AAGTTTCCT-CACACGCAAATAG; HIF-exon 3n_xuôi (5' → 3') GAAAGCACAGATGAATTGC; HIF-exon 3n_ngược (5' → 3') TCATGTCACCATCATCTGT; HIF-exon 4n_xuôi (5' → 3') CTAAGTGGACACAGTGTGTTTG; HIF-exon 4n_ngược (5' → 3') TCTGTGTGTAAGC-ATTTCTCTC; HIF-exon 5n_xuôi (5' → 3') GCCTTGTGAAAAAGGGTAAAG; HIF-exon 5n_ngược (5' → 3') CCATGTTGCAGACTTTATGT]. Các phản ứng PCR đã được thăm dò với SYBR Green (Takara, Nhật Bản) theo các điều kiện chu kỳ sau: 95°C trong 3 phút sau đó là 40 chu kỳ trong 5 giây ở 95°C và 30 giây ở 60°C.

[Thay đổi về mức độ exon ARN thông tin HIF-1α] Các mức exon riêng lẻ của các mẫu được xử lý ASO đã được chuẩn hóa theo từng mức độ exon riêng lẻ mà không xử lý ASO. Các mức exon riêng lẻ tương đối quan sát được được cung cấp trong Hình 18C. Tất cả các mức exon riêng lẻ giảm đáng kể 60 đến 80% và 50 đến 70% trong các tế bào được xử lý bằng "HIF-ASO 2" ở mức 10 zM và 100 zM, tương ứng. Tuy nhiên, các mức exon riêng lẻ thu được với các tế bào được xử lý bằng "HIF-ASO 2" ở mức 1.000 zM (nghĩa là 1 aM) không khác với các mức exon trong các tế bào mà không xử lý ASO. Mặc dù vẫn còn phải làm rõ tại sao mức exon tăng trở lại mức đối chứng âm khi nồng độ ASO được tăng lên 1.000 zM. Tuy nhiên, mẫu phản ứng liều đảo ngược trong Hình 18C có thể so sánh với mẫu phản ứng liều đảo ngược của nhảy exon trong "HIF-1α Ví dụ 1". (xem Hình 17A)

HIF-1α Ví dụ 4. Phương pháp qPCR bằng đầu dò TaqMan ARN thông tin HIF-1α trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 2".

"HIF-ASO 2" được đánh giá bằng qPCR lồng đôi với khả năng của nó để ức chế sự biểu hiện của ARN thông tin HIF-1 α đủ độ dài trong các tế bào HeLa như mô tả trong "HIF-1 α Ví dụ 3" trừ khi có ghi chú khác.

[Tổng hợp cADN bằng phương pháp RT-PCR một bước] 200 ng mẫu ARN trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 μ L bằng cách sử dụng bộ kit phương pháp RT-PCR Một bước Super Script[®] với polymeraza Taq Platinum[®] (Cat. Số 10928-042, Invitrogen) với một tập hợp các đoạn môi đặc hiệu exon [HIF-exon 1_xuôi(2): (5' $\rightarrow$ 3') CGCGAACGACAAGAAAAA; HIF-exon 8_ngược(2): (5' $\rightarrow$ 3') CTGTGGTGACTTGTCTTT] theo các điều kiện chu kỳ sau: 50 °C trong 30 phút và 94 °C trong 2 phút, sau đó là 20 chu kỳ 30 giây ở 94 °C, 40 giây ở 51 °C và 50 giây ở 72 °C.

[Phương pháp qPCR lồng] 1 μ L cADN được pha loãng 100 lần trải qua phản ứng PCR thời gian thực 20 μ L bằng cách sử dụng đầu dò TaqMan (Hs00936371_m1, Thermo Fisher) được thiết kế để phát hiện điểm nối của exon 1 và exon 2 HIF-1 α ở người theo các điều kiện chu kỳ sau: 95 °C trong 3 phút tiếp theo là 40 chu kỳ 10 giây ở 95 °C, và 30 giây ở 60 °C.

[Thay đổi về mức ARN thông tin HIF-1 α] Mức ARN thông tin đủ độ dài của các mẫu được xử lý ASO đã được chuẩn hóa so với mức ARN thông tin không xử lý ASO. Mức ARN thông tin quan sát được đã được chuẩn hóa được cung cấp trong Hình 18D. Mức ARN thông tin HIF-1 α đủ độ dài giảm đáng kể (bằng thử nghiệm t của sinh viên) là 65% và 55% trong các tế bào được xử lý với "HIF-ASO 2" ở 100 zM và 1.000 zM, tương ứng. Mức ARN thông tin có đủ độ dài không thay đổi trong các tế bào được xử lý bằng "ASO 2" ở mức 10 zM.

HIF-1 α Ví dụ 5. Nhảy Exon gây ra bởi "HIF-ASO 6".

"HIF-ASO 6" được chỉ rõ trong Bảng 1 là ASO 17 me bổ sung đầy đủ cho vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 1 và exon 2 trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" "trong trình tự tiền ARN thông tin 20-mer của [(5' $\rightarrow$ 3') uguuaaguag | GAUAAGUUCU]. "HIF-ASO 6" có một chồng lấp bổ sung 7 me với intron 1 và một chồng lấp bổ sung 10 me với exon 2.

"HIF-ASO 6" được đánh giá bằng PCR lồng HIF-1 α đối với khả năng của nó để tạo ra việc nhảy exon 2 của ARN thông tin HIF-1 α ở người trong các tế bào HeLa theo quy trình được mô tả trong "HIF-1 α Ví dụ 1" trừ khi có ghi chú khác.

Các sản phẩm PCR được phân tách điện di trên gel agarosa 2% và kết quả điện di được cung cấp trong Hình 19A. Việc nhảy Exon 2 là mạnh mẽ ở tất cả các nồng độ điều trị của "HIF-ASO 6". "HIF-ASO 6" tạo ra việc nhảy Exon 2 hiệu quả hơn so với "HIF-ASO 2". Dải PCR cho ARN thông tin HIF-1 α đủ độ dài biến mất gần như hoàn toàn ở tất cả các nồng độ của "HIF-ASO 6". Trong khi đó, có một mức đáng kể của ARN thông tin HIF-1 α đủ độ dài còn lại trong các tế bào được xử lý bằng "HIF-ASO 2" ở mức 10 đến 1.000 zM. [xem Hình 17A]

"HIF-ASO 6" có nhiều chồng lấp bổ sung với vị trí cắt nối 3' của exon 2 hơn so với "HIF-ASO 2", mà sẽ chịu trách nhiệm về hiệu quả nhảy Exon cao hơn quan sát được với "HIF-ASO 6". Gắn kết chặt chẽ hơn của ASO với vị trí cắt nối mục tiêu dường như tạo ra việc nhảy Exon mục tiêu hiệu quả hơn.

HIF-1 α Ví dụ 6. Ước chế biểu hiện protein HIF-1 α trong các tế bào HeLa bằng "HIF-ASO 6".

"HIF-ASO 6" được đánh giá về khả năng của nó để điều chỉnh giảm biểu hiện HIF-1 α trong các tế bào HeLa theo các quy trình được mô tả trong "HIF-1 α Ví dụ 2" trừ khi có ghi chú khác. Hình 19B là dữ liệu Western blot thu được với các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 6" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM trong 24 giờ. Hình 19C cung cấp cường độ dải HIF-1 α riêng lẻ được chuẩn hóa theo từng cường độ dải β -actin riêng lẻ bằng phép đo mật độ. Sự biểu hiện của protein HIF-1 α giảm khoảng 45 ~ 55% trong các tế bào được điều trị bằng "HIF-ASO 6".

HIF-1 α Ví dụ 7. Phương pháp qPCR bằng SYBR Green đối với ARN thông tin HIF-1 α trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 6".

"HIF-ASO 6" được đánh giá về khả năng của nó để tạo ra sự thay đổi trong ARN thông tin HIF-1 α trong các tế bào HeLa bằng phương pháp qPCR lồng theo các quy trình trong "HIF-1 α Ví dụ 4" trừ khi có ghi chú khác.

[Tổng hợp cADN bằng phương pháp RT-PCR một bước] 200 ng mẫu ARN trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 μ L bằng cách sử dụng bộ kit RT-PCR Một bước Super Script[®] với polymeraza Taq Platinum[®] (Cat. Số 10928-042, Invitrogen) với một bộ mồi đặc hiệu exon [HIF-exon 1_xuôi (2): (5' $\rightarrow$ 3') CGCGAACGACAAGAAAAA; HIF-exon 8(2)_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') CTGTGGTGACTTGTCCTTT] theo các điều kiện chu kỳ sau: 50 °C trong 30 phút và 94 °C trong 2 phút, sau đó là 15 chu kỳ 30 giây ở 94 giây °C, 40 giây ở 51 °C và 50 giây ở 72 °C.

[Thay đổi về mức exon ARN thông tin HIF-1 α] Các mức exon riêng lẻ được chuẩn hóa theo các mức exon riêng lẻ mà không xử lý ASO được cung cấp trong Hình 20 (A). Mức exon giảm đáng kể (thử nghiệm t của sinh viên) là 35%, khoảng 30% và khoảng 45% trong các tế bào được xử lý với "HIF-ASO 6" ở 10, 100 và 1.000 zM, tương ứng.

HIF-1 α Ví dụ 8. Phương pháp qPCR bằng đầu dò TaqMan đối với ARN thông tin HIF-1 α trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "ASO 6".

"HIF ASO 6" được đánh giá bằng phương pháp qPCR lồng đối với khả năng của nó để ức chế sự biểu hiện của ARN thông tin HIF-1 α đủ độ dài trong các tế bào HeLa như được mô tả trong "HIF-1 α Ví dụ 4" trừ khi có ghi chú khác.

[Thay đổi về mức ARN thông tin HIF-1 α đủ độ dài] Mức ARN thông tin đủ độ dài của các mẫu được xử lý ASO đã được chuẩn hóa theo mức ARN thông tin mà không xử lý ASO. Các mức ARN thông tin tương đối quan sát được được cung cấp trong Hình 20 (B). Mức ARN thông tin HIF-1 α đủ độ dài giảm đáng kể (thử nghiệm t của sinh viên) là khoảng 60% và 80% trong các tế bào được xử lý với "HIF-ASO 6" ở 100 zM và 1.000 zM (1 aM), tương ứng. Tuy nhiên, mức ARN thông tin đủ độ dài vẫn không thay đổi trong các tế bào được xử lý bằng "HIF-ASO 6" ở mức 10 zM.

HIF-1 α Ví dụ 9. Nhảy Exon gây ra bởi "HIF-ASO 1".

"HIF-ASO 1" là ASO 14-mer bổ sung đầy đủ cho khu vực ở vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 1 và exon 2 trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông

tin 23-mer của [(5' → 3') uguuaaguag | GAUAAGUUCUGAA]. "HIF-ASO 1" có một chồng lấp 3 me với intron 1 và một chồng lấp 11 me với exon 2.

"HIF-ASO 1" được đánh giá về khả năng của nó để gây ra nhảy exon trong ARN thông tin HIF-1 α như được mô tả trong "HIF-1 α Ví dụ 1", trừ khi được ghi khác. Các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 1" ở 0 (đối chứng âm), 1, 3, 10, 30 hoặc 100 aM. 24 giờ sau, toàn bộ ARN được chiết xuất và trải qua phản ứng PCR lồng HIF-1 α để phát hiện nhảy Exon.

[Dữ liệu nhảy Exon] Hình 21A cung cấp dữ liệu điện di thu được với các sản phẩm PCR lồng cùng với dữ liệu giải trình tự Sanger của sản phẩm PCR có thể gán cho nhảy Exon 2-3. Mức ARN thông tin đủ độ dài có xu hướng giảm khi nồng độ ASO tăng từ 1 aM lên 100 aM. Việc nhảy Exon 2 chiếm ưu thế với "HIF-ASO 1" ở mức 3 aM và 10 aM. Tuy nhiên, việc nhảy Exon 2-3 đã trở nên quá sức khi nồng độ ASO được tăng lên 100 aM. Sản phẩm PCR cho sản phẩm nhảy của exon 2-3 đã được xác nhận một cách rõ rệt bằng giải trình tự Sanger. [xem Hình 21A bên phải]

HIF-1 α Ví dụ 10. Ước chế biểu hiện protein HIF-1 α trong các tế bào HeLa bằng "HIF-ASO 1".

"HIF-ASO 1" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế biểu hiện protein HIF-1 α trong các tế bào HeLa theo các quy trình được mô tả trong "HIF-1 α Ví dụ 2" trừ khi có ghi chú khác. Trong ví dụ này, các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 1" ở 0 zM (đối chứng âm), 100 zM, 300 zM, 1 aM, 3 aM, 10 aM, 30 aM, 100 aM hoặc 300 aM trong 72 giờ trước khi ngăn chặn hoạt tính của PHD bằng cách ủ với 200 μ M CoCl₂ trong 3 giờ. Có 4 đĩa nuôi cấy của đối chứng âm, tức là 0 zM "HIF-ASO 1".

Hình 21B cung cấp dữ liệu Western blot HIF-1 α thu được với các dịch phân giải tế bào HeLa. Mức protein HIF-1 α cao hơn đáng kể trong các dịch phân giải của đối chứng âm so với tất cả các dịch phân giải của các tế bào được xử lý bằng "HIF-ASO 1". Hình 21C cung cấp cường độ dải HIF-1 α riêng lẻ được chuẩn hóa theo cường độ dải β -actin bằng phép đo mật độ. Biểu hiện HIF-1 α trong các tế

bào HeLa giảm 40 đến 80% bằng cách ủ 72 giờ với "HIF-ASO 1" ở 0,1 đến 300 aM.

HIF-1 α Ví dụ 11. Nhảy Exon gây ra bởi "HIF-ASO 12".

"HIF-ASO 12" được chỉ rõ trong Bảng 2 là ASO 15-mer bổ sung đầy đủ cho khu vực ở vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 3 và exon 4 trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin 20-mer của [(5' $\rightarrow$ 3') uguuuacag | UUUGAACTAAC]. "HIF-ASO 12" có một chồng lấp 6 me với intron 3 và một chồng lấp 9 me với exon 4.

"HIF-ASO 12" được đánh giá bằng PCR lồng HIF-1 α đối với khả năng của nó để tạo ra sự nhảy exon 4 của ARN thông tin HIF-1 α ở người trong các tế bào HeLa. Các tế bào HeLa được ủ với "HIF-ASO 12" trong 6 giờ và sau đó được chiết tách toàn bộ ARN theo quy trình được mô tả trong "HIF-1 α Ví dụ 1", trừ khi có ghi chú khác.

Hình 22A cung cấp dữ liệu PCR lồng HIF-1 α trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 12". Một dải nhảy Exon có thể gán cho việc nhảy Exon 2-4 đã được phát hiện trong tất cả các sản phẩm PCR của các tế bào được xử lý ASO, trong khi không có trong các tế bào không được xử lý. (xem sơ đồ bên trái) Cường độ của dải nhảy Exon là mạnh nhất ở mức 100 zM "HIF-ASO 12". Cường độ của dải ARN thông tin đủ độ dài giảm nhiều nhất ở 100 zM "HIF-ASO 12". Việc nhảy Exon 2-4 đã được xác nhận bằng giải trình tự Sanger như được cung cấp trong sơ đồ bên phải.

HIF-1 α Ví dụ 12. Ức chế biểu hiện protein HIF-1 α trong các tế bào HeLa bằng "HIF-ASO 12".

"HIF-ASO 12" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế sự biểu hiện của HIF-1 α trong các tế bào HeLa như được mô tả trong "HIF-1 α Ví dụ 2" trừ khi có ghi chú khác.

[Điều trị ASO] Các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 12" ở 0 zM (đối chứng âm), 10 zM, 100 zM hoặc 1 aM. 3 đĩa nuôi cấy cho đối chứng âm. 21 giờ sau, các tế bào được xử lý bằng 200 μ M CoCl₂ ngoại trừ một đĩa đối chứng

âm. 3 giờ sau, tất cả các tế bào đã bị ly giải trên băng như sau. Các tế bào được rửa 2 lần bằng 1 mL PBS lạnh, và sau đó được ly giải với 200 μ L dung dịch đệm mẫu Lammeli hai lần (24 mM Tris-HCl, 20% glyxerol, 0,8% SDS, 0,04% bromophenol màu xanh lam, 2% β -mecaptoetanol) để giảm thiểu sự xuống cấp của HIF-1 α . Mỗi dịch phân giải được thu thập trong ống điện tử dung tích 1,5 ml và đun sôi trong 5 phút. Sau đó, các dịch phân giải trải qua Western blot trên gel 8% SDS-PAGE.

Hình 22B cung cấp dữ liệu Western blot cho thấy cường độ dải HIF-1 α giảm rõ rệt trong các tế bào được xử lý bằng "HIF-ASO 12" ở mức 1 và 10 aM.

HIF-1 α Ví dụ 13. Phương pháp qPCR bằng SYBR Green đối với ARN thông tin HIF-1 α trong các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 12".

"HIF-ASO 12" được đánh giá bằng qPCR lòng HIF-1 α đối với khả năng của nó để tạo ra một sự thay đổi trong ARN thông tin HIF-1 α trong các tế bào HeLa như mô tả trong "HIF-1 α Ví dụ 3", trừ khi có ghi chú khác. Các tế bào HeLa được xử lý bằng "HIF-ASO 12" trong 6 giờ và sau đó được chiết tách toàn bộ ARN.

Hình 22C cung cấp dữ liệu qPCR, trong đó mức ARN thông tin của exon 2 và 3 giảm đáng kể (thử nghiệm t của sinh viên) xuống 70 ~ 80% trong các tế bào được xử lý bằng ASO. Các kết quả của qPCR phù hợp với việc nhảy các exon 2-4 gây ra bởi "HIF-ASO 12" (xem "HIF-1 α Ví dụ 11").

Ví dụ về hoạt tính in vitro và in vivo của các ASO AR

Các dẫn xuất APN của Công thức I nhắm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 5' kéo dài qua điểm nối của exon 5 và intron 5 trong tiền ARN thông tin của thụ thể androgen (AR) đã được đánh giá đối với hoạt tính nhảy exon antisense AR của chúng trong các tế bào cũng như ở chuột. Các ví dụ sinh học cho các ASO AR này được cung cấp làm ví dụ để minh họa rằng việc nhảy Exon được gây ra có hiệu lực bởi hợp chất của Công thức I nhắm mục tiêu vào vị trí cắt nối trong tiền ARN thông tin mục tiêu, và do đó không nên hiểu để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với các ASO AR.

AR Ví dụ 1. Nhảy Exon gây ra bởi "AR-ASO 1".

"AR-ASO 1" được chỉ rõ trong Bảng 3 là ASO 13 me hoàn toàn bổ sung cho khu vực trong vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 5 và intron 5 trong tiền ARN thông tin của thụ thể androgen (AR) ở người. "AR-ASO 1" gắn kết bổ sung với trình tự 13 me như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin 20 me của [(5' → 3') GCCUUGCCUG | guaaggaaaa]. "AR-ASO 1" có một chồng lắp 8 me với exon 5 và một chồng lắp 5 me với intron 5.

"AR-ASO 1" được đánh giá bằng PCR lồng AR đối với khả năng của nó để tạo ra sự nhảy Exon 5 của ARN thông tin AR ở người trong các tế bào MCF7 như sau.

[Nuôi cấy tế bào & điều trị ASO] Các tế bào MCF7 (Cat. Số: HTB-22, ATCC) được duy trì trong môi trường EMEM bổ sung 10% FBS, 1% streptomycin/penicillin và insulin bò 0,01 mg/ml trong môi trường 5% CO₂ ở 37°C. Các tế bào được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm được xử lý bằng "AR-ASO 1" trong 3 giờ ở 0 (đối chứng âm), 3, 30, 300 hoặc 3.000 aM (nghĩa là 3 fM).

[Trích xuất ARN] Toàn bộ ARN được trích xuất bằng cách sử dụng Bộ kit tách chiết ARN phổ quát (Cat. Số 9767, Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất

[Tổng hợp cADN bằng phương pháp RT-PCR một bước] 100 ng mẫu ARN đã được sử dụng trong phản ứng phiên mã ngược 25 µL bằng cách sử dụng bộ kit RT-PCR Một bước Super Script® với polymeraza Taq Platinum® (Cat. Số 10928-042, Invitrogen) và một bộ mồi đặc hiệu exon [AR-exon 3_xuôi: (5' → 3') TGGGTGTCACCTATGGAGC; và AR-exon 9_ngược: (5' → 3') GGGTGTGGAAATAGATGGG] theo các điều kiện chu kỳ sau: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, sau đó là 39 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 55°C và 1 phút ở 72°C.

[Khuếch đại PCR lồng] Trong suốt quá trình khuếch đại, đã sử dụng một kỹ thuật khuếch đại độc đáo (sửa qua khi tăng nhiệt độ ủ trên mỗi chu kỳ) hoạt động hiệu quả và cụ thể trong một phạm vi nhiệt độ, thay vì ở một nhiệt độ ủ cụ thể (ví dụ, phương pháp PCR thông thường). 1 µl cADN được tiếp tục khuếch đại

trong 20 μ L phản ứng PCR lồng bằng cách sử dụng một bộ mồi đặc hiệu exon [AR-exon 3_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') TGGGTGTCACCTATGGAGC; và AR-exon 7n_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') GGGGTGATTTGGAGC-CAT] 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 nhảy Exon] Các sản phẩm PCR đã được phân tách điện di trên gel agarosa 2%. Các dải có kích thước mục tiêu được thu thập và phân tích bởi phương pháp giải trình tự Sanger. Trong Hình 23A, có ba dải sản phẩm PCR liên quan đến điều trị có thể gán cho các biến thể cắt nối ARN thông tin AR thiếu exon 5. "AR-ASO 1" đã được tìm thấy để gây ra nhảy Exon 5, exon 4-5 và exon 4-6, mặc dù tỷ lệ của các sản phẩm nhảy dường như phụ thuộc vào nồng độ ASO. Hình 23B cung cấp dữ liệu giải trình tự thực tế cho dải nhảy của exon 4-5 trong Hình 23A.

AR Ví dụ 2. Ức chế biểu hiện protein AR trong các tế bào MCF7 bằng "AR-ASO 1".

Các tế bào MCF7 trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường nuôi cấy 5 mL được xử lý bằng "AR-ASO 1" ở 0 zM (đối chứng âm) hoặc 10 zM đến 30 aM. 4 đĩa nuôi cấy cho đối chứng âm. 48 giờ sau, các tế bào được rửa 2 lần bằng PBS lạnh, và sau đó được ly giải với 200 μ L dung dịch đệm ly giải tế bào 1 lần (Cat. Số 9803, Công nghệ tín hiệu tế bào) bổ sung các chất ức chế proteaza 1 lần (Cat. Số P8340, Sigma). Các dịch phân giải được thu thập trong ống điện tử dung tích 1,5 ml. 200 μ L mỗi dịch phân giải được trộn với 100 μ L dung dịch đệm mẫu 3 lần và đun sôi trong 5 phút. 20 μ L của mỗi dịch phân giải (4 mẫu đối chứng âm tính và 8 mẫu xử lý ASO) đã được phân tách điện di trên gel 8% SDS-PAGE và được chuyển vào màng PVDF. Màng này được thăm dò với một kháng thể kháng AR (Cat. Số 5153, Công nghệ tín hiệu tế bào) và một kháng thể kháng β -actin (Cat. Number sc4778, Santa Cruz). Hình 23C cung cấp dữ liệu Western blot AR thu được trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "AR-ASO 1" ở 0 zM (4 đối chứng âm) đến 30 aM. Cường độ dải AR (kích thước 120K) của các dịch phân giải được

xử lý bằng ASO yếu hơn cường độ của các dịch phân giải đối chứng âm lân cận của chúng.

AR Ví dụ 3. Phương pháp qPCR bằng SYBR Green đối với ARN thông tin AR trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "AR-ASO 1".

[Điều trị ASO và tách chiết ARN] Các tế bào MCF7 trong môi trường nuôi cấy 5 mL được xử lý bằng "AR-ASO 1" ở 0 zM (đối chứng âm) hoặc 1 zM đến 1 aM. (2 đĩa nuôi cấy cho mỗi nồng độ) 5 giờ sau, toàn bộ ARN được chiết xuất bằng cách sử dụng "Bộ Kít tách chiết ARN phổ quát MiniBEST" theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Cat. Số 9767, Takara).

[Tổng hợp cADN với OligodT] 500 ng mẫu ARN đã được tổng hợp cADN với "oligo-dT" theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Cat. Số 6110A, Takara).

[PCR đầu tiên] cADN sau đó đã được PCR lần thứ nhất với một bộ môi đặc hiệu exon [AR-exon 3_xuôi: (5' → 3') TGGGTGTCACTATGGAGC; và AR-exon 9_ngược: (5' → 3') GGGTGTGGAAATAGATGGG] theo các điều kiện chu kỳ sau: 94°C trong 2 phút sau 15 chu kỳ 15 giây ở 94°C, 30 giây ở 55°C và 2 phút ở 72°C.

PCR lồng] Các sản phẩm PCR lần thứ nhất đã được pha loãng 2.000 lần và 1 µL của mỗi sản phẩm PCR được pha loãng trải qua phản ứng PCR thời gian thực 20 µL với các bộ môi đặc hiệu exon [AR-exon 4_xuôi(q): (5' → 3') GACCATGTTTTGCCCATTTG; AR-exon 4_ngược(q): (5' → 3') GGCTCTTTTGAAGAAGACC; AR-exon 5_xuôi(q): (5' → 3') GAAACAGAAGTACCTGTGC; AR-exon 5_ngược(q): (5' → 3') GTCATCCCTGCTTC-ATAAC; AR-exon 6_xuôi(q): (5' → 3') CGGAAGCTGAAGAAACTTG; AR-exon 6_ngược(q): (5' → 3') CACTTGACCACGTGTACAAG]. Các phản ứng PCR được thăm dò bằng SYBR Green (Takara, Nhật Bản). Điều kiện chu kỳ: 95°C trong 3 phút tiếp theo 40 chu kỳ trong 5 giây ở 95°C và 30 giây ở 60°C. Nồng độ exon giảm dần nhưng giảm đáng kể khi tăng liều từ 1 zM lên 100 zM. Mức giảm là 40 ~ 50% trong các tế bào được xử lý bằng "AR-ASO 1" ở 100 zM. [xem Hình 24A] Tuy nhiên, các

mức exon đã hồi phục gần với mức đối chứng âm trong các tế bào được xử lý bằng "AR-ASO 1" ở mức 1 aM.

AR Ví dụ 4. Phương pháp qPCR bằng SYBR Green đối với ARN thông tin AR trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "AR-ASO 5".

"AR-ASO 5" được chỉ rõ trong Bảng 3 là ASO 12 me bổ sung đầy đủ cho một khu vực trong vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 5 và intron 5 trong tiền ARN thông tin AR ở người. "AR-ASO 5" gắn kết bổ sung với trình tự 12 me như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin 20 me của [(5' → 3') GCCUUGCCUG | guaaggaaaa]. "AR-ASO 5" có một chồng lấp 7 me với exon 5 và một chồng lấp 5 me với intron 5.

"AR-ASO 5" được đánh giá về khả năng của nó để tạo ra những thay đổi về mức exon ARN thông tin AR bằng qPCR theo các phương pháp được mô tả trong "AR Ví dụ 3". Như được cung cấp trong Hình 24B, mức exon AR đã giảm đáng kể (thử nghiệm t của sinh viên) khoảng 60 ~ 80% trong các tế bào được xử lý bằng "AR-ASO 5" ở mức 1 đến 1.000 zM.

Không giống như trường hợp "AR-ASO 1" (xem "AR Ví dụ 3"), không có sự phục hồi nào ở các mức tin nhắn exon ở 1.000 zM "AR-ASO 5".

AR Ví dụ 5. Phương pháp qPCR bằng đầu dò TaqMan đối với ARN thông tin AR trong các tế bào MCF7 được xử lý bằng "AR-ASO 5".

"AR-ASO 5" được đánh giá về khả năng của nó để điều chỉnh giảm ARN thông tin AR ở người bằng qPCR sử dụng đầu dò TaqMan.

Các tế bào MCF7 được xử lý bằng "AR-ASO 5" ở 0 zM (đối chứng âm) đến 1 aM. (2 đĩa cho mỗi nồng độ) 24 giờ sau, toàn bộ ARN được chiết xuất bằng "Bộ Kit tách chiết ARN phổ quát MiniBEST" theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Cat. Số 9767, Takara).

400 ng mẫu ARN đã được tổng hợp cADN với bộ kit RT-PCR một bước (Invitrogen) với một bộ môi đặc hiệu exon [AR-exon 3_xuôi: (5' → 3') TGGGT-GTCACTATGGAGC; và AR-exon 9_ngược: (5' → 3') GGGTGTGGAAATAGATGGG] theo các điều kiện chu kỳ sau: 50°C trong 30

phút và 94°C trong 2 phút, sau đó là 15 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 50°C và 1 phút ở 72°C.

1 µL của mỗi dung dịch cADN được pha loãng 50 lần trải qua phản ứng PCR thời gian thực 20 µL với một bộ mồi đặc hiệu exon của [AR-exon 4_xuôi(q2): (5' → 3') TTGTCCATCTTGTCGTCTT; và AR-exon 5_ngược(q2): (5' → 3') CCTCTCCTTCCTC-CTGTA] theo các điều kiện chu kỳ sau: 95°C trong 3 phút sau 40 chu kỳ 15 giây ở 95°C và 30 giây ở 60°C. Phản ứng qPCR được theo dõi bằng đầu dò TaqMan của [(5' → 3') TTTCTTCAG-ZEN-CTTCCGGGCTC-3IABkFQ]. Đầu dò TaqMan được thiết kế để thăm dò điểm nối của exon 4 và exon 5 trong ARN thông tin AR có đủ độ dài.

Hình 24C cung cấp dữ liệu qPCR bằng đầu dò TaqMan. Biểu hiện tương đối của ARN thông tin AR đủ độ dài đã giảm đáng kể (thử nghiệm t của sinh viên) khoảng 50 đến 70% trong các tế bào được xử lý bằng "AR-ASO 5" ở mức 1 zM đến 1 aM.

AR Ví dụ 6. Ức chế biểu hiện protein AR ở da của chuột được điều trị dưới da bằng "AR-ASO-5".

"AR-ASO 5" nhắm mục tiêu vào trình tự tiền ARN thông tin AR được bảo tồn ở người và chuột. "AR-ASO 5" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế biểu hiện protein AR trên da chuột sau khi tiêm một lần dưới da duy nhất như sau.

[Tẩy lông và phân nhóm] Vào ngày 0, những con chuột đực C57BL/6 được 7 tuần tuổi đã được gây mê bằng zoletil/rompun, và lông ở lưng được cắt bằng kéo xén và loại bỏ bằng cách tẩy lông bằng carbo. Trong ngày thứ 5, những con chuột bị loại bỏ lông hoàn hảo (nghĩa là không tỉ vết) đã được chọn và được phân ngẫu nhiên thành năm nhóm 0 pmol/Kg (chỉ có tá dược lỏng, đối chứng âm), 1 pmol/Kg, 10 pmol/Kg, 100 pmol/Kg, và 1.000 pmol/Kg "AR-ASO 5". (6 con chuột mỗi nhóm).

[Dung dịch tiêm ASO và cách dùng] Dung dịch gốc nước "AR-ASO 5" đã được pha loãng lần lượt trong PBS bổ sung 0,1% Tween 80 để điều chế các dung dịch "AR-ASO 5" 0 nM (chỉ có tá dược lỏng, đối chứng âm), 0,5 nM, 5 nM, 50 nM hoặc 500 nM. Vào ngày thứ 5, từng con chuột trong mỗi nhóm liều được tiêm

dưới da sau gáy (tức là gần cổ) với một mũi tiêm của dung dịch thử nghiệm ở mức 2 mL/Kg.

[Trích xuất các mẫu da] Vào ngày thứ 10, các con chuột đã hy sinh để lấy các mẫu da từ vị trí tiêm và hông là vị trí không tiêm. Các mẫu da được đông lạnh trong nitơ lỏng ngay sau khi lấy mẫu. Mỗi mẫu da được micron hoá trong khi duy trì mẫu đông lạnh bằng nitơ lỏng. Các mẫu được micron hoá đã được phân giải bằng dung dịch đệm RIPA được bổ sung 1% SDS. Các dịch phân giải được trộn với dung dịch đệm mẫu 5 lần và đun sôi trong 5 phút.

[Western blot AR] Các dịch phân giải được trải qua Western blot AR trên màng PVDF. Tổng cộng có 10 dịch phân giải được nạp vào mỗi 10% gel PAGE với hai dịch phân giải riêng lẻ từ mỗi nhóm. Protein AR (120K dalton) đã được thăm dò với một kháng thể AR đa dòng (N-20, sc-816, Santa Cruz).

[Định lượng biểu hiện protein AR] Mỗi dải AR trên một màng PVDF duy nhất được chuẩn hóa theo từng dải β -actin riêng lẻ. Cường độ dải AR trung bình (được chuẩn hóa so với β -actin) của hai mẫu của nhóm đối chứng âm (nghĩa là không xử lý ASO) được sử dụng để chuẩn hóa cường độ dải AR của 8 mẫu khác trên cùng một màng PVDF. Chuẩn hóa kép như vậy đã được áp dụng cho hai màng PVDF khác để định lượng biểu hiện protein AR của các mẫu riêng lẻ bằng phép đo mật độ. Tất cả các mức biểu hiện AR sau khi chuẩn hóa kép các mẫu riêng lẻ được gộp lại để phân tích thống kê bằng thử nghiệm t của sinh viên so với mức biểu hiện mà không xử lý ASO.

[Ước chế biểu hiện protein AR] Hình 25A và 25B là dữ liệu Western blot AR thu được với các mẫu da từ vị trí tiêm và vị trí không tiêm, tương ứng.

Hình 26A cung cấp mức độ biểu hiện protein AR theo nhóm cũng như theo đối tượng. Có một mức độ lớn về sự biến đổi giữa các chủ thể trong biểu hiện protein AR cả ở vị trí tiêm và ở vị trí không tiêm. Tuy nhiên, biểu hiện AR có xu hướng giảm khi tăng liều ASO.

Hình 26B cung cấp mức biểu hiện AR trung bình theo nhóm như được chuẩn hóa so với nhóm đối chứng âm. Ở vị trí tiêm, biểu hiện protein AR giảm đáng kể khoảng 35% trong nhóm 1.000 pmol/Kg "AR-ASO 5". Ở vị trí không

tiêm, biểu hiện protein AR giảm đáng kể khoảng 40% trong các nhóm điều trị 100 và 1.000 pmol/Kg.

Sự ức chế biểu hiện protein AR được quan sát thấy ở vùng da xa vị trí tiêm chứng tỏ rằng ASO có thể dễ dàng phân phối đến các mô ở xa vị trí tiêm thông qua hệ thống tuần hoàn sau khi tiêm dưới da. Các kết quả ex vivo đã được cung cấp để minh họa cho sự tham gia mục tiêu toàn thân sau khi tiêm dưới da của dẫn xuất APN của Công thức I, do đó không nên diễn giải để giới hạn phạm vi của sáng chế.

AR Ví dụ 7. Nhảy Exon gây ra bởi "AR-ASO 1" (2).

Tùy thuộc vào đường di chuyển, mật độ tế bào và điều kiện nuôi cấy, hình thái của các tế bào MCF7 thay đổi. Các tế bào MCF ở các đoạn đầu có xu hướng phát triển tương đối nhanh và hiển thị các khuẩn lạc có hình dạng cumulus. Các tế bào MCF7 ở các đoạn sau có khả năng phát triển chậm và hình thành các khuẩn lạc biểu mô phẳng. Tuy nhiên, việc duy trì các tế bào MCF7 để cho thấy hình thái của hình dạng cumulus là một thách thức.

"AR-ASO 1" được đánh giá về khả năng nhảy Exon của nó trong các tế bào MCF7 cho thấy rõ hình thái của hình dạng cumulus như được mô tả trong "AR Ví dụ 1", trừ khi có ghi chú khác.

[Điều trị ASO] Các tế bào MCF7 được xử lý bằng "AR-ASO 1" trong 3 giờ ở 0 (đối chứng âm), 30, 100 hoặc 1.000 aM (tức là 1 fM). (2 đĩa cho mỗi nồng độ ASO)

[Trích xuất ARN] Toàn bộ ARN được chiết xuất bằng cách sử dụng bộ kit điều chế mini RNeasy (Cat. Số 74104, Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 500 ng mẫu ARN trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 µL.

[Kết quả nhảy Exon] Hình 27A cung cấp dữ liệu điện di thu được với các sản phẩm phương pháp RT-PCR lồng. Việc nhảy Exon 5 (được xác nhận bằng giải trình tự Sanger: xem Hình 27B) chiếm ưu thế rõ rệt trong các tế bào được xử lý bằng ASO, tương phản với trường hợp của "AR Ví dụ 1" (xem Hình 23A).

Ví dụ về Hoạt tính invitro và in vivo của các ASO SCN9A

Các dẫn xuất APN của Công thức I nhằm mục tiêu bổ sung vào nhiều vị trí cắt nối trong tiền ARN thông tin SCN9A (dưới lớp kênh natri 9A) ở người cũng được đánh giá đối với hoạt tính nhảy antisense và exon SCN9A của chúng cả trong tế bào và động vật. Các ví dụ sinh học cho các ASO SCN9A này được cung cấp làm ví dụ để minh họa rằng việc nhảy Exon được gây ra có hiệu lực bởi hợp chất của Công thức I nhằm mục tiêu vào vị trí cắt nối trong một tiền ARN thông tin mục tiêu, do đó không nên hiểu để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với SCN9A ASO.

SCN9A Ví dụ 1. Nhảy Exon gây ra bởi "SCN-ASO 7".

"SCN-ASO 7" được chỉ định rõ tại Bảng 4 là một ASO 16-mer hoàn toàn bổ sung cho một khu vực trong vị trí nối 5' kéo dài qua điểm nối của exon 4 và intron 4 trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người đọc ra từ gen *SCN9A* ở người (được truy cập từ Trình tự tham chiếu NCBI: NC_000002.12). "SCN-ASO 7" gắn kết bổ sung với trình tự 16-mer như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin 20-mer của [(5' → 3') UUGUUUUUGC | gaaaguacuu]. "SCN-ASO 7" có một chồng lắp 10 me với exon 4 và một chồng lắp 6 me với intron 4.

Cho rằng các tế bào PC3 được biết là thể hiện dồi dào tiền ARN thông tin SCN9A ở người [*Br. J. Dược điển*. tập 156, 420-431 (2009)], "SCN-ASO 7" được đánh giá bằng phương pháp PCR lồng của SCN9A về khả năng của nó để tạo ra sự nhảy Exon 4 trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người trong các tế bào PC3 như sau.

[Nuôi cấy tế bào & điều trị ASO] Các tế bào PC3 (Cat. No. CRL-1435, ATCC) được duy trì trong môi trường F-12K Ham bổ sung 10% FBS, 1% streptomycin/penicillin, 1% L-glutamin, và 1% natri pyruvat dưới khí quyển 5% CO₂ ở 37°C.

Các tế bào PC3 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường 5 mL được xử lý bằng "SCN-ASO 7" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM.

[Trích xuất ARN] Sau khi ủ 18 giờ, các tế bào PC3 được xử lý với 100 µg/mL xycloheximit trong 6 giờ nữa để đóng băng dịch mã ribosome. Sau đó,

toàn bộ ARN được chiết xuất từ các tế bào bằng cách sử dụng Bộ Kit tách chiết ARN phổ quát (Cat. Số 9767, Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

[Tổng hợp cADN bằng phương pháp RT-PCR một bước] 200 ng mẫu ARN đã được sử dụng cho phản ứng phiên mã ngược 25 μ L bằng cách sử dụng bộ kit phương pháp RT-PCR Một bước Super Script[®] với polymeraza Taq Platinum[®] (Cat. Số 10928-042, Invitrogen) và một bộ mồi đặc hiệu exon [SCN-exon 2_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') CTTTCTCCTTTCAGTCCTCT và SCN-exon 9_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') CGTCTGTTGGTAAAGGTTTT] theo các điều kiện chu kỳ sau: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, theo sau là 40 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 55°C và 2 phút ở 72°C.

[Khuếch đại PCR lồng] 1 μ L dung dịch cADN (được pha loãng 100 lần) đã được khuếch đại PCR 20 μ L bằng phương pháp PCR lồng (Cat. Số K2612, Tiên phong) với một bộ mồi đặc hiệu exon [SCN-exon 3n_xuôi: 5' $\rightarrow$ 3') GGACCA-AAAATGTCGAGTATTT; và SCN-exon 8_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') GCTAAGAAGGCCAGC-TGAA] theo các điều kiện chu kỳ sau: 95°C trong 5 phút sau đó là 35 chu kỳ 30 giây ở 95°C, 30 giây ở 50°C và 1 phút ở 72°C.

Cần lưu ý rằng đoạn mồi của "SCN-exon 3n_xuôi" nhắm mục tiêu vào điểm nối của exon 3 và exon 5 để thăm dò hiệu quả việc xóa exon 4, mặc dù đoạn mồi 22 me vẫn có một chồng lắp bổ sung 18 me với điểm nối của exon 3 và exon 4. Do đó, "SCN-exon 3n_xuôi" nhận ra "điểm nối của exon 3 và exon 5" có chọn lọc hơn so với "điểm nối của exon 3 và exon 4" được tìm thấy trong ARN thông tin SCN9A đủ độ dài. Trình tự mồi được thiết kế để phát hiện các biến thể cắt nối SCN9A thiếu exon 4 nhạy hơn so với ARN thông tin SCN9A đủ độ dài. Một mồi nhảy Exon như vậy sẽ hữu ích để phát hiện các biến thể cắt nối ARN thông tin có độ ổn định trao đổi chất kém, vì ARN thông tin đủ độ dài có xu hướng cho thấy sự ổn định trao đổi chất tốt đạt được trong quá trình tiến hóa qua hàng tỷ năm.

[Nhận dạng các sản phẩm nhảy Exon] Các sản phẩm PCR lồng đã được phân tách điện di trên gel agarosa 2%. Các dải có kích thước mục tiêu được thu thập và phân tích bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Việc nhảy Exon 4 rất mạnh trong các tế bào PC3 được xử lý bằng 1 μ M "SCN ASO 7", mặc dù việc

nhảy Exon 4 cũng có thể nhìn thấy ở 10 và 100 zM như trong Hình 28A. Dải nhảy Exon được xác nhận rõ ràng bằng giải trình tự Sanger như được cung cấp trong Hình 28B.

SCN9A Ví dụ 2. Phương pháp qPCR bằng SYBR Green đối với ARN thông tin SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 7".

"SCN-ASO 7" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế sự biểu hiện của ARN thông tin SCN9A ở người trong các tế bào PC3 bằng qPCR với một bộ môi đặc hiệu exon như sau.

[Nuôi cấy tế bào & xử lý ASO] Các tế bào PC3 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường nuôi cấy 5 mL được ủ với "SCN-ASO 7" trong 24 giờ ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM. (2 đĩa cho mỗi nồng độ)

[Trích xuất ARN] Toàn bộ ARN được chiết xuất bằng cách sử dụng "Bộ Kit tách chiết ARN phổ quát MiniBEST" (Cat. Số 9767, Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

[Tổng hợp cADN bằng phương pháp RT-PCR một bước] 200 ng mẫu ARN trải qua phản ứng phiên mã ngược 20 μ L bằng cách sử dụng bộ kit phương pháp RT-PCR Một bước Super Script[®] với polymeraza Taq Platinum[®] (Cat. Số 10928-042, Invitrogen) và với một bộ môi đặc hiệu exon [SCN-exon 2_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') CTTTCTCCTTTCAGTCCTCT; và SCN-exon 9_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') TTGCCTGGTTCTGTTCTT]. Điều kiện chu kỳ: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, sau đó là 15 chu kỳ 15 giây ở 94°C, 30 giây ở 55°C và 2 phút ở 72°C.

[Khuếch đại qPCR lồng] 1 μ L của mỗi dung dịch cADN được pha loãng 50 lần trải qua phản ứng PCR thời gian thực 20 μ L với một bộ môi đặc hiệu exon [SCN-exon 4_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') GTACACTTTTACTGGAATATATAC; SCN-exon 4 _ngược: (5' $\rightarrow$ 3') AATGACGACAAAATCCAGC; SCN-exon 5_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') GTATTTAACAGAAT-TTGTAACCT; SCN-exon 5_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') CTGGGATTA-CAGAAATAGTTTTCA; SCN-exon 6_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') GAAGACAATTGTAGGGGC; SCN-exon 6_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') GTCTTCTTCACTCTCTAGGG]. Các phản ứng PCR đã được thăm dò với

SYBR Green (Takara, Nhật Bản). Điều kiện chu kỳ: 95°C trong 30 giây tiếp theo 40 chu kỳ 5 giây ở 95°C và 30 giây ở 60°C.

[Kết quả qPCR] Mức exon riêng lẻ của các tế bào được xử lý ASO đã được chuẩn hóa theo mức exon của các tế bào đối chứng âm (nghĩa là không xử lý ASO). Hình 29 (A) tóm tắt các kết quả qPCR. Các mức biểu hiện của exon 4-6 giảm đáng kể khoảng 70%, 40% và 20 ~ 30% ở mức 10, 100 và 1.000 zM, tương ứng.

SCN9A Ví dụ 3. Phương pháp qPCR bằng SYBR Green đối với ARN thông tin SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 3".

"SCN-ASO 3" được chỉ rõ trong Bảng 4 là ASO 14 me nhắm mục tiêu vào vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 4 và intron 4 trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người. "SCN-ASO 3" gắn kết bổ sung với trình tự 12-mer được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin 20-mer của [(5' → 3') UUGUUUUUGC | gua"ag"uacuu], trong đó hai sự không phù hợp được đánh dấu bằng dấu ngoặc kép (" "). "SCN-ASO 3" có một chồng lấp bổ sung 7 me với exon 4 và một chồng lấp bổ sung 5 me với intron 4.

"SCN-ASO 3" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế sự biểu hiện của ARN thông tin SCN9A đủ độ dài trong các tế bào PC3 theo quy trình được mô tả trong "SCN9A Ví dụ 2", trừ khi có ghi chú khác.

Các kết quả qPCR được cung cấp như được tóm tắt trong Hình 29B. Các mức biểu hiện của exon 4-6 giảm đáng kể > 90%, khoảng 70% và khoảng 80% ở mức 10, 100 và 1.000 zM, tương ứng. Giống như trong trường hợp của "SCN-ASO 7", 10 zM biểu hiện sự ức chế mạnh nhất của ARN thông tin SCN9A đủ độ dài.

SCN9A Ví dụ 4. Phương pháp qPCR bằng SYBR Green đối với ARN thông tin SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 8".

"SCN-ASO 8" được chỉ rõ trong Bảng 4 là ASO 17 me nhắm mục tiêu vào một khu vực trong vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 4 và intron 4 trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người. "SCN-ASO 8" gắn kết bổ sung với trình tự 15 me được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN

thông tin 20 me của [(5' → 3') UUGUUUUUGC | gua"ag"uacuu], trong đó sự không phù hợp được đánh dấu bằng dấu ngoặc kép (" "). "SCN-ASO 8" có một chồng lắp bổ sung 10 me với exon 4 và một chồng lắp bổ sung 5 me với intron 4 trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người.

"SCN-ASO 8" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế sự biểu hiện của ARN thông tin SCN9A đủ độ dài trong các tế bào PC3 theo quy trình được mô tả trong "SCN9A Ví dụ 2", trừ khi có ghi chú khác.

Các kết quả qPCR được cung cấp như được tóm tắt trong Hình 29C. Các mức biểu hiện của exon 4-6 giảm đáng kể lần lượt là 50 ~ 70% và 70 ~ 80% ở mức 10 và 100 zM.

SCN9A Ví dụ 5. Sự ức chế dòng natri bằng xét nghiệm CoroNa trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 7".

Dòng natri tế bào được đo bằng kẹp vá. Khi các ion natri xâm nhập vào tế bào, nồng độ ion natri trong tế bào sẽ tăng lên. Có thể thăm dò nồng độ natri trong tế bào bằng cách sử dụng thuốc nhuộm nhạy với ion natri. "CoroNa Green" là thuốc nhuộm với tác nhân chelat hoá ion natri thuộc loại ete đỉnh vòm. Trong khi chelat hoá với ion natri, "CoroNa Green" phát ra huỳnh quang màu xanh lá cây. "CoroNa Green" đã được sử dụng để đo gián tiếp nồng độ natri trong tế bào. Mức natri được đo bằng "CoroNa Green" được tìm thấy có mối tương quan tốt với dòng ion natri được đo bằng kẹp vá ion natri. (Proc. Natl.Acad. Khoa học Hoa Kỳ tập 106 (38), 16145-16150 (2009))

Các tế bào PC3 được biết là biểu hiện rất nhiều ARN thông tin SCN9A ở người, mặc dù có các dưới lớp SCN khác được biểu hiện đồng thời. [Br. J. Dược điển. vol 156, 420-431 (2009)] Do đó, sự ức chế biểu hiện ARN thông tin SCN9A có thể dẫn đến giảm đáng kể dòng natri trong các tế bào PC3, nếu dòng ion natri bởi dưới lớp kênh natri Na_v1,7 chiếm một phần rõ rệt của tổng dòng ion natri trong các tế bào PC3. Lưu ý rằng ARN thông tin SCN9A mã hóa dưới lớp kênh natri Na_v1,7.

"SCN-ASO 7" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế dòng ion natri trong các tế bào PC3 bằng cách sử dụng "CoroNa Green" như sau.

[Điều trị ASO] Các tế bào PC3 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 35 mm chứa 2 mL môi trường F-12K được xử lý bằng "SCN-ASO 7" ở 0 zM (đối chứng âm), 100 zM hoặc 1 aM.

[Xét nghiệm CoroNa] 30 giờ sau, các tế bào được rửa bằng 2 mL HBSS (Dung dịch muối cân bằng của Hank, Cat. Số 14025-092, Life Technologies), sau đó được bổ sung 2 ml HBSS mới. Sau đó, các tế bào được xử lý với 5 μ M "CoroNa Green" (Cat. Số C36676, Life Technologies) ở 37°C. 30 phút sau, các tế bào được rửa 2 lần bằng 2 mL HBSS và được bổ sung 2 mL HBSS mới. Đĩa nuôi cấy được gắn trên kính hiển vi huỳnh quang Olympus được trang bị máy quay video kỹ thuật số để liên tục chụp được hình ảnh huỳnh quang màu xanh lá cây của các tế bào. Các tế bào được xử lý sâu bằng NaCl 100 mM, và sau đó những thay đổi trong hình ảnh tế bào huỳnh quang được ghi lại bằng kỹ thuật số trong khoảng thời gian 3 phút. Trung bình có khoảng 4 tế bào trên mỗi khung. Cường độ huỳnh quang từ mỗi tế bào riêng lẻ được theo dõi ở độ phân giải của giây. Các dấu vết của cường độ huỳnh quang nội bào từ các tế bào riêng lẻ được phủ lên và tính trung bình tại mỗi thời điểm. Trung bình của các dấu vết từ các tế bào riêng lẻ của từng nồng độ ASO được vẽ như được cung cấp trong Hình 30A bằng chương trình ImageJ (phiên bản 1.50i, NIH). Dấu vết cường độ huỳnh quang trung bình được lấy là dấu vết nồng độ natri trong tế bào riêng lẻ cho các tế bào được điều trị bằng "SCN-ASO 7" ở mức 0 (đối chứng âm), 100 hoặc 1.000 zM.

[Kết quả xét nghiệm CoroNa] Các dấu vết quan sát được của cường độ huỳnh quang nội bào được tóm tắt trong Hình 29B. Dấu vết cường độ huỳnh quang cho các tế bào được xử lý bằng 1.000 zM "SCN-ASO 7" chạy thấp hơn dấu vết cho các tế bào mà không xử lý ASO. Cường độ huỳnh quang trung bình của các tế bào không được xử lý ASO là 81,86 (đơn vị tùy ý) ở 100 giây. Trong khi đó, cường độ huỳnh quang trung bình của các tế bào được xử lý bằng 1.000 zM "SCN-ASO 7" là 51,47 (đơn vị tùy ý) ở 100 giây. Do đó, thời gian ủ 30 giờ với 1.000 zM "SCN-ASO 7" đã làm giảm đáng kể hoạt tính kênh natri khoảng 37% ($p < 0,05$ bằng thử nghiệm t của sinh viên) trong các tế bào PC3. Xem xét rằng các tế bào PC3 biểu hiện các dưới lớp khác nhau của kênh natri điện áp (VGSC),

mức giảm 37% được coi là đánh dấu cho sự ức chế biểu hiện của $\text{Na}_v1,7$ bởi "SCN-ASO 7". Không có sự sụt giảm đáng chú ý nào về dòng natri trong các tế bào được xử lý với 100 μM "SCN-ASO 7".

SCN9A Ví dụ 6. Sự ức chế dòng natri bằng xét nghiệm CoroNa trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 3".

"SCN-ASO 3" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế dòng natri trong các tế bào PC3 bằng cách sử dụng "CoroNa Green" theo quy trình được mô tả trong "Ví dụ 5 SCN9A", trừ khi có ghi chú khác.

Các dấu vết quan sát của cường độ huỳnh quang tế bào được cung cấp trong Hình 30B. Các dấu vết trung bình của cường độ huỳnh quang chạy thấp hơn trong tế bào được điều trị bằng "SCN-ASO 3" so với trong các tế bào mà không điều trị ASO. Cường độ huỳnh quang tế bào trung bình của các tế bào không được xử lý ASO là 89,32 (đơn vị tùy ý) ở 100 giây. Trong khi đó, cường độ huỳnh quang trung bình của các tế bào được xử lý bằng 1.000 μM "SCN-ASO 3" là 61,36 (đơn vị tùy ý) ở 100 giây. Do đó, 1.000 μM "SCN-ASO 3" đã làm giảm đáng kể ($p < 0,01$) khoảng 31% dòng natri trong các tế bào PC3. Mức giảm gây ra bởi 100 μM "SCN-ASO 3" là 18% mặc dù không có ý nghĩa.

SCN9A Ví dụ 7. Sự ức chế dòng natri trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 8".

"SCN-ASO 8" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế dòng natri trong các tế bào PC3 bằng cách sử dụng "CoroNa Green" theo quy trình được mô tả trong "SCN9A Ví dụ 3", trừ khi có ghi chú khác.

Các dấu vết quan sát được của cường độ huỳnh quang tế bào được cung cấp trong Hình 30C. Dấu vết trung bình của cường độ huỳnh quang chạy thấp hơn trong các tế bào được xử lý bằng "SCN-ASO 8" so với trong các tế bào không được xử lý ASO. Cường độ huỳnh quang tế bào trung bình của các tế bào không được xử lý ASO là 130,32 (đơn vị tùy ý) ở 100 giây. Trong khi đó, cường độ huỳnh quang trung bình của các tế bào được xử lý bằng 1.000 μM "SCN-ASO 8" là 89,7 (đơn vị tùy ý) ở 100 giây. Do đó, 1.000 μM "SCN-ASO 8" đã làm giảm

đáng kể ($p < 0,001$) dòng natri khoảng 31% trong các tế bào PC3. Mức giảm gây ra bởi 100 zM "SCN-ASO 8" là 30% ($p < 0,001$).

SCN9A Ví dụ 8. nhảy Exon gây ra bởi "SCN-ASO 27" trong các tế bào PC3 (A).

"SCN-ASO 27" được chỉ rõ trong Bảng 5 là ASO 14 điểm bổ sung đầy đủ cho vị trí cắt nối 3' trải dài qua điểm nối của "intron 3" và "exon 4" trong tiền ARN thông tin của SCN9A ở người. Chuỗi mục tiêu 14 me trong vị trí cắt nối 3' được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong chuỗi tiền ARN thông tin 20-bit SCN9A của [(5' → 3') uugu guuuag | GUACACUU UU]. "SCN-ASO 27" có một chồng lắp 6 me với "intron 3" và một chồng lắp 8 me với "exon 4".

"SCN-ASO 27" được đánh giá về khả năng của nó để tạo ra việc nhảy "exon 4" trong các tế bào PC3 như được mô tả trong "SCN9A Ví dụ 1", trừ khi có ghi chú khác.

[Nuôi cấy tế bào & xử lý ASO] Các tế bào PC3 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường nuôi cấy 5 mL được xử lý bằng "SCN-ASO 27" ở 0 (đối chứng âm), 1, 10 hoặc 100 zM.

[Khuếch đại PCR lồng] 1 μ L cADN được khuếch đại hơn nữa trong phản ứng PCR lồng 20 μ L (Cat. Số K2612, Bione) với một bộ mồi đặc hiệu exon của [SCN-exon 2n_xuôi: (5' → 3') CCACCGGACTGGACCAAAAA; và SCN-exon 9n_ngược: (5' → 3') GCTAAGAAGGCCAGCTGAA] theo các điều kiện chu kỳ sau: 95°C trong 2 phút sau 34 chu kỳ 30 giây ở 95°C, 30 giây ở 55°C và 1 phút ở 72°C.

[Nhận dạng các sản phẩm nhảy Exon] Hình 31A cung cấp dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng, trong đó các tế bào được xử lý bằng "SCN-ASO 27" tạo ra một dải PCR mạnh có thể gán cho việc nhảy Exon 4-5. Tuy nhiên, cường độ dải PCR cho ARN thông tin SCN9A có đủ độ dài mạnh hơn trong các mẫu xử lý 10 zM và 100 zM ASO so với các mẫu đối chứng âm. Kiểu phản ứng liệu lạ trong PCR lồng có thể là do sự điều hòa tăng phiên mã gây ra bởi "ARN vòng tròn exon intron (EICIARN)" được tích lũy trong quá trình nhảy Exon bởi "SCN-ASO 27". [*Nature Struc.Mol. Biol.* vol 22 (3), 256-264 (2015)] Sản phẩm PCR

nhảy Exon được xác nhận bằng giải trình tự Sanger tương ứng với việc nhảy Exon 4-5. (xem Hình 31B)

SCN9A Ví dụ 9. Nhảy Exon gây ra bởi "SCN-ASO 27" trong các tế bào PC3 (B).

"SCN-ASO 27" được đánh giá về khả năng của nó để tạo ra việc nhảy "exon 4" trong các tế bào PC3 như được mô tả trong "SCN9A Ví dụ 8", trừ khi có ghi chú khác. Trong thí nghiệm này, các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 27" ở 0 (đối chứng âm), 1, 10, 100 và 1.000 aM trong 24 giờ.

[Khuếch đại PCR lồng] Phản ứng PCR lồng được thực hiện với một bộ mồi của [SCN-exon 3/6_xuôi: (5' → 3') GGACCAAAAATGTCGAGCCT; và SCN-exon 9n_ngược: (5' → 3') GCTAAGAAGGCCAGCTGAA] được thiết kế để khuếch đại có chọn lọc sản phẩm có trình tự điểm nối của exon 3 và exon 6.

Cần lưu ý rằng trình tự mồi của "SCN-exon 3/6_xuôi" nhắm mục tiêu vào điểm nối của exon 3 và exon 6 để thăm dò nhảy các exon 4-5, mặc dù đoạn mồi 20 me vẫn giữ được một chồng lấp bổ sung 17 me với điểm nối của exon 3 và exon 4. Do đó, trình tự mồi của "SCN-exon 3/6_xuôi" nhận ra "điểm nối của exon 3 và exon 6" có chọn lọc hơn "điểm nối của exon 3 và exon 4" được tìm thấy trong ARN thông tin SCN9A có đủ độ dài. Trình tự mồi được thiết kế để phát hiện biến thể cắt nối SCN9A thiếu exon 4-5 nhảy hơn so với ARN thông tin SCN9A đủ độ dài. Một mồi nhảy Exon như vậy sẽ hữu ích để phát hiện các biến thể cắt nối ARN thông tin với độ ổn định trao đổi chất kém, vì các ARN thông tin đủ độ dài có xu hướng cho thấy sự ổn định trao đổi chất tốt đạt được qua quá trình tiến hoá trong hàng tỷ năm.

Hình 31C cung cấp dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng, trong đó các tế bào được xử lý bằng "SCN-ASO 27" mang lại một dải PCR mạnh có thể gán cho việc nhảy Exon 4-5, được xác nhận bằng giải trình tự Sanger.

SCN9A Ví dụ 10. Phương pháp qPCR bằng Tổng hợp cADN một bước đối với ARN thông tin SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 27".

"SCN-ASO 27" được đánh giá bằng qPCR lồng SCN9A đối với khả năng của nó để tạo ra những thay đổi ở mức ARN thông tin SCN9A ở người trong các tế bào PC3 như được mô tả trong "SCN9A Ví dụ 2" trừ khi có ghi chú khác.

[Điều trị ASO] Các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 27" ở mức 0 (đối chứng âm), 0,1, 1 hoặc 10 aM trong 24 giờ. (2 đĩa cho mỗi nồng độ ASO)

[Tổng hợp cADN bằng phương pháp PCR một bước] 200 ng mẫu ARN trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 μ L bằng cách sử dụng bộ kit RT-PCR một bước (Invitrogen, Hoa Kỳ) với một bộ mồi đặc hiệu exon của [SCN-exon 2_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') CTTTCTCCTTTCAGTCCTCT; và SCN-exon 8/9_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') CGTCTGTTGGTAAAGGTTTT] theo các điều kiện chu kỳ sau: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, sau đó là 15 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 55°C và 2 phút ở 72°C.

[Khuếch đại qPCR lồng] 1 μ L của mỗi dung dịch cADN được pha loãng 100 lần trải qua phản ứng PCR thời gian thực 20 μ L với một bộ mồi đặc hiệu exon của [SCN-exon 3_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') TGACCATGAATAACCCAC; và SCN-exon 4 ngược (2): (5' $\rightarrow$ 3') GCAAGGATTTTTACAAGT] theo các điều kiện chu kỳ sau: 95°C trong 30 giây tiếp theo 40 chu kỳ 5 giây ở 95°C và 30 giây ở 6°C. Phản ứng qPCR được theo dõi với đầu dò TaqMan của [(5' $\rightarrow$ 3') 5,6-FAM-GGACCAAAA-Zen-ATGTCGAGTACAC-3IABkFQ] nhắm mục tiêu vào điểm nối của exon 3 và exon 4 trong ARN thông tin SCN9A có đủ độ dài.

Mức ARN thông tin SCN9A đủ độ dài giảm đáng kể (bằng thử nghiệm t của sinh viên) trong các tế bào được xử lý với "SCN-ASO 27" khoảng 35 đến 45% như được cung cấp trong Hình 32A.

SCN9A Ví dụ 11. Phương pháp qPCR bằng Tổng hợp cADN với các mồi ngẫu nhiên đối với ARN thông tin SCN9A trong các tế bào PC3 được xử lý bằng "SCN-ASO 27".

"SCN-ASO 27" được đánh giá qPCR SCN9A đối với khả năng của nó để tạo ra những thay đổi về mức độ ARN thông tin SCN9A ở người trong các tế bào PC3 như được mô tả trong "Ví dụ 10 SCN9A", trừ khi có ghi chú khác. cADN đã

được tổng hợp bằng cách sử dụng các môi ngẫu nhiên và được trải qua phản ứng qPCR SCN9A bằng cách sử dụng đầu dò TaqMan.

Mức ARN thông tin SCN9A đầy đủ độ dài giảm đáng kể (kiểm định t của sinh viên) trong các tế bào được xử lý bằng "SCN-ASO 27" khoảng 50 đến 60% như được cung cấp trong Hình 32B.

SCN9A Ví dụ 12. Ức chế dòng natri bằng xét nghiệm CoroNa trong các tế bào DRG L5 ở chuột được kích hoạt SNL bằng "SCN-ASO 27".

"SCN-ASO 27" là ASO SCN9A 14-mer bổ sung đầy đủ cho tiền ARN thông tin SCN9A ở người, nhưng có sự không phù hợp duy nhất với tiền ARN thông tin SCN9A ở chuột đọc từ AND bộ gen của chuột [Trình tự đối chứng NCBI: NC_000002.12]. "SCN-ASO 27" có một chồng lấp bổ sung 13 me và một sự không phù hợp duy nhất với tiền ARN thông tin SCN9A ở chuột như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin 20-mer của [(5' → 3') uuuc"cuuuag | GUACACUUUU], trong đó không phù hợp duy nhất được đánh dấu bằng dấu ngoặc kép (" ").

"SCN-ASO 27" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế dòng ion natri trong các tế bào DRG (hạch gốc) ở chuột bằng cách sử dụng "CoroNa Green" như sau.

[Thắt dây thần kinh cột sống] Thắt dây thần kinh cột sống (SNL) gây ra bệnh lý thần kinh ở hạch gốc (DRG) và tủy sống, và đã được sử dụng rộng rãi như là một mô hình cho các cơn đau thần kinh. [*Pain* vol 50 (3), 355-363 (1992)] Tùy thuộc vào cách dây thần kinh cột sống được thắt, tuy nhiên, có thể có một vài biến thể của SNL. Mức độ và thời gian của bệnh lý thần kinh trong DRG dường như thay đổi tùy thuộc vào cách dây thần kinh cột sống được thắt. [*Pain* vol 43 (2), 205-218 (1990)] Việc thắt hai dây thần kinh cột sống L5 và L6 (nghĩa là "thắt L5/L6") gây ra bệnh thần kinh nghiêm trọng hơn và kéo dài hơn so với thắt dây thần kinh cột sống L5 một mình (tức là "thắt L5").

[Phẫu thuật SNL bằng cách thắt L5/L6] Vào ngày 0, những con chuột SD được 6 tuần tuổi được gây mê bằng zoletil/rompun. Sau đó, dây thần kinh cột sống L5 và L6 (phía bên trái) được bộc lộ và thắt chặt. Các cơ và da đã được đóng lại

và cắt bằng quy trình vô trùng. Những con chuột được cảm nhận một cách rời rạc bằng cách chấm điểm von Frey trong khoảng thời gian 4 tuần.

[Chuẩn bị các tế bào thần kinh DRG] Vào ngày 31, một con chuột cho thấy điểm von Frey thấp đã bị chết để trích xuất cả DRG bên trái (bên có dây chằng) và DRG bên phải (bên không có dây chằng). Các DRG được ngâm trong 0,5 mL PBS ngay sau khi chiết. Các tế bào DRG đã được chuẩn bị như sau theo các quy trình được bộc lộ trong tài liệu. [*Phương pháp Mol Biol.* tập 846, 179-187 (2012); *PLOS Một* quyển 8 (4); e60558 (2013)]

① DRG được ngâm trong ống điện tử dung tích 1,5 ml chứa 0,2 ml 0,125% collagenase (Collagenase Type IV, Cat. C5138-100MG, Sigma) trong HBSS (Dung dịch muối cân bằng của Hank, Cat. Số 14025-092, Life Technologies), xắt nhỏ bằng kéo thành từng miếng nhỏ và ủ trong 20 phút trong lồng áp CO₂ ở 37 °C dưới 5% CO₂ và 95% RH; ② 50 µL 0,25% trypsin/EDTA đã được thêm vào ống điện tử, được giữ trong lồng áp thêm 10 phút nữa; ③ ống điện tử được bổ sung 1 mL môi trường DMEM hoàn chỉnh và được lắng đọng ly tâm ở 600g trong 5 phút; ④ viên thu được đã được gây treo trong 4 mL môi trường Neurobasal-A (Neurobasal® Medium, Cat. Số 21103-049, Gibco) bổ sung 2 lần B-27 (B-27® Serum-Free Supplement, Cat. Số 17504-044, Gibco), 1 lần penicillin-streptomycin, 1 lần L-glutamin và 1 mL huyền phù tế bào đã được gieo cẩn thận lên một tấm kính phủ laminin (Cat. Số GG-25-1.5-laminin, Neuvitro) được đặt trong đĩa nuôi cấy 35 mm; ⑤ một ngày sau khi gieo, đĩa được bổ sung cẩn thận 1 ml môi trường Neurobasal-A mới khác; ⑥ Hai ngày sau khi gieo, môi trường được thay thế bằng 2 mL môi trường Neurobasal-A mới được bổ sung 1 µM Ara-C (Cat. Số C1768-100MG, Sigma) để ngăn chặn có chọn lọc sự phát triển của các tế bào ngoài các tế bào thần kinh DRG; ⑦ Bốn ngày sau khi gieo, môi trường được thay thế một lần nữa bằng 2 mL môi trường Neurobasal-A mới được bổ sung 1 µM Ara-C; và ⑧ Năm hoặc sáu ngày sau khi gieo, các tế bào thần kinh DRG được điều trị bằng "SCN-ASO 27".

[Xử lý ASO & Xét nghiệm CoroNa] Các tế bào thần kinh DRG L5 có thất L5/L6 hoặc không thất L5/L6 được xử lý bằng "SCN-ASO 27" ở 0 (đối chứng

âm), 100 hoặc 1.000 zM. 30 giờ sau, các tế bào được rửa bằng 2 mL HBSS, và sau đó được bổ sung bằng 2 mL HBSS mới. Sau đó, các tế bào được xử lý với 5 μ M "CoroNa Green" ở 37°C. 30 phút sau, các tế bào được rửa 2 lần bằng 2 mL HBSS và được bổ sung bằng 2 mL HBSS mới. Đĩa nuôi cấy được gắn trên kính hiển vi huỳnh quang được trang bị camera CCD để liên tục chụp ảnh huỳnh quang màu xanh lá cây của các tế bào. Các tế bào được xử lý sâu bằng NaCl 10 mM, và sau đó những thay đổi về cường độ huỳnh quang của tế bào được ghi lại bằng kỹ thuật số trong khoảng thời gian 300 giây. Có 4 đến 5 tế bào cho mỗi khung hình để chụp ảnh. Cường độ huỳnh quang từ mỗi tế bào riêng lẻ được theo dõi ở độ phân giải của một giây. Các dấu vết của cường độ huỳnh quang nội bào từ các tế bào riêng lẻ được tính trung bình bằng chương trình ImageJ (phiên bản 1.50i, NIH) và các dấu vết trung bình được cung cấp trong Hình 33A và 33B cho các tế bào có "L5/L6" và không có "L5/L6" "thất", tương ứng. Dấu vết cường độ huỳnh quang trung bình được lấy là dấu vết nồng độ natri trong tế bào riêng lẻ cho các tế bào được điều trị bằng "SCN-ASO 27" ở mức 0 (đối chứng âm), 100 hoặc 1.000 zM.

[Kết quả xét nghiệm CoroNa] Trong các tế bào được kích thích bằng cách thất L5/L6 (xem Hình 33A), điều trị 30 giờ với "SCN-ASO 27" ở 100 zM hoặc 1 aM mang lại sự giảm đáng kể (bằng thử nghiệm t của sinh viên) ở cường độ huỳnh quang tế bào trung bình từ 80 đến 85% tại thời điểm 150 giây.

Trong các tế bào không có thất L5/L6 (xem Hình 33B), điều trị 30 giờ với "SCN-ASO 27" ở mức 1 aM mang lại sự giảm khoảng 50% ở cường độ huỳnh quang. Trong trường hợp các tế bào không được kích thích được điều trị bằng "SCN-ASO 27" ở 100 zM, không có sự giảm cường độ huỳnh quang. Cường độ huỳnh quang của các tế bào không có thất L5/L6 nhỏ hơn đáng kể so với các tế bào được kích thích bằng cách thất L5/L6, điều này cho thấy L5/L6 tạo ra sự điều hòa tăng rõ rệt của hoạt tính kênh natri $Na_v1,7$.

Các tế bào thần kinh DRG không có kích thích thần kinh được biết là biểu hiện các dưới lớp khác nhau của VGSC bao gồm $Na_v1,7$, $Na_v1,8$, $Na_v1,2$, v.v. Dưới lớp $Na_v1,7$ cho thấy sự đóng góp hạn chế vào toàn bộ dòng natri trong các

tế bào thần kinh DRG mà không cần kích thích. [*Bản chất tự nhiên*. tập 3, Số bài viết 791: DOI: 10.1038/ncomms1795 (2012)] Các tế bào thần kinh DRG không có thất L5/L6 có thể cho thấy sự đóng góp hạn chế của dòng natri từ dưới lớp $Na_v1,7$.

Trong khi đó, các tế bào thần kinh được biết là điều chỉnh tăng biểu hiện $Na_v1,7$ để đáp ứng với bệnh lý thần kinh dai dẳng. [*J Biol Hóa*. tập 279 (28), 29341-29350 (2004); *J Neurosci*. vol 28 (26), 6652-6658 (2008)] "SCN-ASO 27" ở cả 100 μM và 1 μM đã ức chế dòng natri từ 80 đến 85% trong các tế bào thần kinh được kích thích bởi "thất L5/L6". Sự ức chế cao hơn của dòng natri bởi "SCN-ASO 27" trong các tế bào DRG với "thất L5/L6" phù hợp với sự điều hòa tăng của $Na_v1,7$ trong các tế bào thần kinh do bệnh lý thần kinh mãn tính.

SCN9A Ví dụ 13. Ức chế biểu hiện protein $Na_v1,7$ trong các tế bào thần kinh DRG L5 bằng "SCN-ASO 30".

"SCN-ASO 30" là một ASO 14 me bổ sung đầy đủ cho tiền ARN thông tin của SCN9A ở chuột, trong khi "SCN-ASO 27" là một ASO 14-mer bổ sung đầy đủ cho tiền ARN thông tin SCN9A ở người. "SCN-ASO 30" có một sự không phù hợp duy nhất với "SCN-ASO 27" ở đầu C. "SCN-ASO 30" với tiền ARN thông tin SCN9A ở chuột có thể đóng vai trò là ASO mô hình tốt cho "SCN-ASO 27" với tiền ARN thông tin SCN9A ở người.

"SCN-ASO 30" được đánh giá đối với khả năng của nó để ức chế sự biểu hiện của protein $Na_v1,7$ trong các tế bào thần kinh DRG ở chuột như được mô tả dưới đây.

[Chuẩn bị tế bào thần kinh DRG] Những con chuột SD đực (7 tuần tuổi) đã bị "thất L5/L6" chặt. 7 ngày sau, 4 con chuột đã được gây mê bằng zoletil/rompun để lấy mẫu DRG L5 của bên bị thất. Các DRG được gộp chung và xử lý để chuẩn bị các tế bào thần kinh DRG như được mô tả trong "SCN9A Ví dụ 12".

[Điều trị ASO] Các tế bào thần kinh DRG được điều trị bằng "SCN-ASO 30" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 μM trong 24 giờ, và sau đó được ly giải để làm western blot với kháng thể $Na_v1,7$ (Cat. Số ab85015, Abcam) thăm dò đầu C của protein $Na_v1,7$. β -actin đã được thăm dò để tham khảo.

[Ức chế biểu hiện $\text{Na}_v1,7$] Hình 34A cung cấp dữ liệu Western blot thu được trong các tế bào thần kinh DRG được điều trị bằng "SCN-ASO 30" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM. Tất cả các dịch phân giải mang lại một dải mạnh ở 170K, có thể được chỉ định cho một đoạn hoặc chất chuyển hóa của protein $\text{Na}_v1,7$ có đủ độ dài. Dải protein $\text{Na}_v1,7$ có đủ độ dài được phát hiện ở mức 220 ~ 240K chỉ với các dịch phân giải của đối chứng âm và 10 zM "SCN-ASO 30". Do đó, biểu hiện $\text{Na}_v1,7$ bị ức chế rõ rệt trong các tế bào thần kinh DRG của chuột sau khi ủ 24 giờ với "SCN-ASO 30" ở 100 và 1.000 zM.

SCN9A Ví dụ 14. Ức chế dòng natri trong các tế bào thần kinh DRG L5 ở chuột bằng "SCN-ASO 30".

"SCN-ASO 30" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế dòng natri trong các tế bào thần kinh DRG L5 ở chuột được kích thích bằng cách thắt L5/L6 như được cung cấp dưới đây.

[Chuẩn bị các tế bào thần kinh DRG] Những con chuột SD đực (6 tuần tuổi) đã được "thắt L5/L6" chặt. 7 ngày sau, những con chuột được gây mê bằng zoletil/rompun để chiết xuất DRG L5 của bên bị thắt. Các tế bào thần kinh DRG L5 đã được chuẩn bị như sau: ① DRG được ngâm trong ống điện tử dung tích 1,5 ml chứa 0,2 ml 0,125% collagenase trong HBSS, cắt nhỏ bằng kéo thành từng miếng nhỏ và ủ trong 20 phút trong lồng ấp CO_2 ở 37°C dưới 5% CO_2 và 95% RH; ② 50 μL 0,25% trypsin/EDTA đã được thêm vào ống điện tử và ống điện tử được giữ trong lồng ấp thêm 10 phút nữa; ③ ống điện tử được bổ sung 1 mL môi trường DMEM hoàn chỉnh và được lắng đọng ly tâm ở 600g trong 5 phút; ④ sau đó viên thu được được gây treo trong 4 mL môi trường Neurobasal-A (Neurobasal[®] Medium, Cat. 21103-049, Gibco) được bổ sung 2 lần B-27 (B-27[®] Serum-Free, Cat. Số 17504-044, Gibco), 1 lần penicillin-streptomycin, 1 lần L-glutamin; ⑤ huyền phù của các tế bào DRG đã được vận chuyển trong khoảng một giờ khi được niêm phong trong ống falcon 15 mL chứa khoảng 15 ml môi trường Neurobasal-A; ⑥ 0,5 ml huyền phù tế bào đã được gieo cẩn thận vào một tấm kính được tráng bằng laminin đặt trong giếng của đĩa nuôi cấy 24 giếng; ⑦ các tế bào được gieo vào đĩa nuôi cấy được ủ trong lồng ấp CO_2 ở 37°C trong 2

giờ để gắn các tế bào lên kính, và sau đó được xử lý bằng "SCN-ASO 30" ở 0 (đối chứng âm) hoặc 100 zM trong 4 giờ trong lồng ấp; và ⑧ các tế bào thần kinh DRG đã được đo dòng natri bằng xét nghiệm kẹp vá thủ công trên thiết bị kẹp vá natri (Bộ khuếch đại Axopatch 200B, Dụng cụ Axon).

[Kết quả khảo nghiệm kẹp vá] Hình 34B cung cấp dữ liệu dòng natri được chuẩn hóa theo kích thước tế bào. Sau khi ủ với 100 zM "SCN-ASO 30" trong 4 giờ, dòng natri giảm đáng kể ($p < 0,01$ bằng xét nghiệm t của sinh viên) khoảng 90% trong các tế bào thần kinh DRG biểu hiện các kênh natri nhạy cảm với tetrodotoxin, tức là các tế bào thần kinh có kích thước nhỏ. (N = 4 tế bào mỗi nhóm)

SCN9A Ví dụ 15. Phương pháp qPCR bằng Tổng hợp cADN một bước đối với ARN thông tin SCN9A trong các tế bào DRG ở chuột được xử lý bằng "SCN-ASO 30".

"SCN-ASO 30" được đánh giá bằng qPCR lồng SCN9A về khả năng của nó để ức chế sự biểu hiện của ARN thông tin SCN9A trong các tế bào DRG của chuột như sau.

[Chuẩn bị tế bào DRG L5] Một con chuột SD đực 4 tuần tuổi đã được gây mê bằng zoletil/rompun để trích xuất các DRG L5. Các mẫu DRG được gộp chung và xử lý để chuẩn bị các tế bào DRG L5 như được mô tả trong "SCN9A Ví dụ 12".

[Điều trị ASO] Các tế bào DRG ở chuột được xử lý bằng "SCN-ASO 30" ở 0 (đối chứng âm), 10, 30, 100, 300 hoặc 1.000 zM. (1 đĩa cho mỗi nồng độ ASO)

[Trích xuất ARN & Tổng hợp cADN bằng phương pháp PCR một bước] 24 giờ sau đó, toàn bộ ARN được chiết xuất từ các tế bào bằng cách sử dụng Bộ Kit tách chiết ARN phổ quát (Cat. Số 9767, Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 200 ng mẫu ARN đã được sử dụng cho phản ứng phiên mã ngược 25 μ L bằng cách sử dụng bộ kit RT-PCR một bước (Invitrogen, USA) với một bộ môi đặc hiệu exon [SCN-exon 2(3)_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') CAATCTTCCGTTTCAACGCC; và SCN-exon 10_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') ACCACAGCCAGGATCAAGTT] theo các

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

[Khuếch đại qPCR lồng] 1 μ L mỗi dung dịch cADN (nhân đôi trên mỗi nồng độ) được pha loãng 100 lần trải qua phản ứng PCR thời gian thực 20 μ L với đầu dò TaqMan (Cat. Số Rn01514993_mH, ThermoFisher) nhắm mục tiêu vào điểm nối exon 3 và exon 4 của SCN9A theo các điều kiện chu kỳ sau: 95°C trong 30 giây tiếp theo 40 chu kỳ 5 giây ở 95°C và 30 giây ở 60°C.

Hình 35A cung cấp dữ liệu qPCR. Mức độ biểu hiện ARN thông tin SCN9A đủ độ dài đã giảm đáng kể (bằng thử nghiệm t của sinh viên) trong các tế bào được xử lý bằng "SCN-ASO 30" khoảng 45 ~ 60%, mặc dù có một đĩa nuôi cấy duy nhất cho mỗi nồng độ ASO.

SCN9A Ví dụ 16. Phương pháp qPCR bằng Tổng hợp cADN bằng cách sử dụng môi ngẫu nhiên đối với ARN thông tin SCN9A trong các tế bào DRG của chuột được xử lý bằng "SCN-ASO 30".

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

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

Hình 35B cung cấp dữ liệu qPCR SCN9A được chuẩn hóa theo GAPDH. Mức độ biểu hiện ARN thông tin SCN9A đủ độ dài giảm đáng kể (kiểm định t của sinh viên) trong các tế bào được xử lý với "SCN-ASO 30" khoảng 45 ~ 75%.

SCN9A Ví dụ 17. Sự đảo ngược của Allodynia bởi các ASO SCN9A ở chuột bị đau thần kinh ngoại biên do tiểu đường.

Gen SCN9A mã hóa tiểu đơn vị α của $Na_v1,7$ dưới lớp VGSC. Có một số lượng rất nhỏ các cá nhân không cảm thấy đau nghiêm trọng nhưng là bình thường trong các chức năng cảm giác khác. Những cá nhân như vậy đã được tìm thấy có gen SCN9A bị đột biến để mã hóa dưới lớp $Na_v1,7$ không chức năng. [*Nature* vol 444, 894-898 (2006)] Điều này đã được gọi là "bệnh lý kênh SCN9A". Các kiểu hình hành vi của bệnh lý kênh SCN9A ở người được sao chép khá nhiều ở chuột bị loại bỏ SCN9A. [*PLOS One* 9 (9): e105895 (2014)] Do đó, các ASO SCN9A của Công thức I có thể cho thấy hoạt tính giảm đau trong các mô hình đau ở động vật đi kèm với điều hòa tăng $Na_v1,7$.

"SCN-ASO 7", "SCN-ASO 8", "SCN-ASO 21", "SCN-ASO 35", "SCN-ASO 36" và "SCN-ASO 37" đã được đánh giá về khả năng của chúng để đảo ngược chứng mất ngủ ở chuột bị đau thần kinh ngoại biên do tiểu đường (DPNP). Trong ví dụ này, sáu ASO SCN9A nhắm mục tiêu vào tổng cộng năm vị trí cắt nối được đánh giá về khả năng của chúng để đảo ngược chứng mất ngủ do bệnh thần kinh tiểu đường ở chuột gây ra.

[Cảm ứng DPNP và phân nhóm] Bệnh tiểu đường được gây ra ở chuột bằng cách tiêm streptozotocin trong màng bụng với liều 60 mg/Kg vào ngày 0. Trong ngày 10, chuột bị DPNP được phân ngẫu nhiên vào 6 nhóm đối chứng âm tính (chỉ có tá dược lỏng), "SCN-ASO 7" 100 pmol/Kg, "SCN-ASO 8" 100 pmol/Kg, "SCN-ASO 21" 100 pmol/Kg, "SCN-ASO 35" 100 pmol/Kg, "SCN-ASO 36" 100 pmol/Kg và "SCN-ASO 37" 100 pmol/Kg. Các con chuột được nhóm lại dựa trên điểm số von Frey của từng con chuột trong Ngày 10. (N = 8 ~ 9 con mỗi nhóm) Chứng mất ngủ đã được ghi điểm bằng cách sử dụng một bộ vi chất (Touch Test®) theo phương pháp "Lên & xuống". [*J Neurosci. Phương pháp* vol 53 (1), 55-63 (1994)]

[Điều trị ASO và chấm điểm von Frey] Các dung dịch ASO để tiêm đã được chuẩn bị bằng cách pha loãng liên tiếp các dung dịch gốc nước của các ASO SCN9A thành 100 nM trong PBS (dung dịch muối phosphat). Những con chuột

được tiêm dưới da với ASO ở mức 1 mL/Kg trong các ngày 11, 13, 15, 17 và 19. Ghi điểm Von Frey được thực hiện 2 giờ sau liều trong các ngày 11, 13, 15, 17 và 19. Việc ghi điểm Von Frey được thực hiện bổ sung trong các gày 21 và 23 để đánh giá thời gian của hoạt tính trị liệu sau khi dùng liều cuối cùng. Điểm số von Frey hàng ngày được đánh giá về ý nghĩa thống kê bằng bài kiểm định t của sinh viên đối với nhóm đối chứng âm (chỉ có tá dược lỏng, tức là PBS).

[Hoạt tính trị liệu] Điểm số von Frey quan sát được được tóm tắt trong Hình 36. Chứng mất ngủ đã được đảo ngược đáng kể bởi tất cả các ASO ngoại trừ "SCN-ASO 36" và "SCN-ASO 37", mặc dù "SCN-ASO 37" cho thấy xu hướng rõ ràng của hoạt tính trị liệu (p -value = 0,057 trong ngày 19). Các hoạt tính trị liệu có xu hướng tăng dần khi liều được lặp lại. Hiệu quả điều trị tối đa dựa trên điểm số von Frey trong Ngày 19 là khoảng 76% (đáng kể), 61% (đáng kể), 93% (đáng kể), 52% (đáng kể), 0% và 22% (không đáng kể, giá trị p = 0,05 lần) cho "SCN-ASO 7", "SCN-ASO 8", "SCN-ASO 21", "SCN-ASO 35", "SCN-ASO 36" và "SCN-ASO 37", tương ứng.

"SCN-ASO 7", "SCN-ASO 8", "SCN-ASO 21" và "SCN-ASO 35" có một chồng lấp bổ sung 5 me với intron mục tiêu của chúng. Trong khi đó, "SCN-ASO 36" và "SCN-ASO 37" có một chồng lấp bổ sung 4 me và 3 me với intron mục tiêu của chúng, tương ứng. Mặc dù có một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị, số lượng chồng lấp bổ sung với intron mục tiêu dường như ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị.

Trong ví dụ này, hoạt tính antisense in vivo được quan sát với các ASO SCN9A nhắm mục tiêu vào 4 trên 5 vị trí cắt nối. Tỷ lệ trúng 80% được coi là rất cao, do hoạt tính trị liệu in vivo phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau bao gồm hoạt tính antisense tế bào, làm giàu các phân tử thuốc trong mô đích, thời gian bán hủy dược động học, v.v. Do đó, hợp chất của Công thức I có thể dự đoán điều chỉnh sự biểu hiện của gen đích của nó.

Với trọng lượng phân tử của "SCN-ASO 7" đã cho (xem Bảng 4), 100 pmol/Kg được chuyển thành liều điều trị khoảng 0,53 μ g/Kg. Hiệu lực nhảy exon dưới mức attomol (10^{-18} mol) in vitro của "SCN-ASO 7" được coi là nguyên nhân

chính cho khả năng điều trị in vivo cực mạnh của khoảng 0,53 $\mu\text{g/Kg}$ ở chuột mắc bệnh thần kinh do tiểu đường. Đáng ngạc nhiên hơn nữa, ASO được sử dụng dưới dạng oligonucleotit "nguyên dạng". Một tiềm năng trị liệu in vivo mạnh mẽ như vậy chưa bao giờ được thực hiện với các nhóm oligonucleotit khác bao gồm ADN, ARN, PTO, PTO 2'-OMe, ARN 2'-OMe, ARN 2'-OMOE, LNA, PMO, APN, v.v.

Ví dụ về Hoạt tính in vivo và nex vivo của các ASO DMD

Loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD) là một bệnh hiếm gặp đơn gen đe dọa tính mạng với tình trạng thoái hóa cơ bắp. Bệnh nhân DMD không mã hóa protein dystrophin có đủ độ dài do PTC (codon kết thúc sớm) do đột biến điểm hoặc xóa (các) exon.

Chuột Mdx (C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx}/J, Jackson Lab) là một con chuột đột biến có đột biến điểm ở exon 23 của gen dystrophin, tạo ra PTC. Chuột Mdx mã hóa một dạng dystrophin bị cắt ngắn thiếu phần đầu C. Do phần đầu C gắn kết với ma trận ngoại bào (ECM), dạng cắt ngắn sẽ mất vai trò định sẵn của nó để gắn kết chặt chẽ các sợi cơ với ECM. Do đó, chuột mdx dần mất đi sự toàn vẹn và sức mạnh cơ bắp theo tuổi tác.

Chuột Mdx đã được sử dụng rộng rãi như một mô hình động vật cho DMD ở người. Các ASO Dystrophin nhắm mục tiêu vào exon 23 dystrophin ở chuột đã được nghiên cứu để loại bỏ PTC thông qua việc nhảy Exon 23.

Các dẫn xuất APN của Công thức I nhắm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' hoặc 5' của exon 23 trong tiền ARN thông tin dystrophin của chuột đã được đánh giá về khả năng của chúng để tạo ra sự nhảy của exon 23 dystrophin ở chuột mdx. Các ví dụ sinh học được cung cấp ở đây là để minh họa khả năng nhảy Exon của các ASO dystrophin như các ví dụ cho hợp chất của Công thức I, và do đó không nên diễn giải để giới hạn phạm vi của sáng chế đối với các ASO dystrophin.

DMD Ví dụ 1. Nhảy Exon gây ra bởi "DMD-ASO 1" và "DMD-ASO 4" ở Chuột Mdx (Phương pháp PCR lồng A).

"DMD-ASO 1" được chỉ rõ trong Bảng 7 là ASO 13 me bổ sung đầy đủ cho một khu vực trong vị trí cắt nối 3' trải dài qua điểm nối của intron 22 và exon

23 trong tiền ARN thông tin dystrophin của chuột. "DMD-ASO 1" gắn kết bổ sung với trình tự 13 me như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự 25 me của [(5' → 3') uaauuuugag | GCUCUGCAAAGTTCT]. "DMD-ASO 1" có một chồng lắp 8 me với intron 22 và một chồng lắp 5 me với exon 23.

"DMD-ASO 4" được chỉ rõ trong Bảng 7 là ASO 17 me bổ sung đầy đủ cho một khu vực trong điểm cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 22 và exon 23 trong tiền ARN thông tin dystrophin ở chuột. "DMD-ASO 4" gắn kết bổ sung với trình tự 17 me như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự 25 me của [(5' → 3') uaauuuugag | GCUCUGCAAAGTTCT]. "DMD-ASO 4" có một chồng lắp 5 me với intron 22 và một chồng lắp 12 me với exon 23.

"DMD-ASO 1" và "DMD-ASO 4" được đánh giá về khả năng của chúng để gây ra sự nhảy Exon trong cơ bắp của chuột mdx bằng cách tiêm dưới da như sau.

[Điều trị ASO & Lấy mẫu mô cơ bắp] Các dung dịch tiêm được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch gốc nước "DMD-ASO 1" hoặc "DMD-ASO 4" trong PBS đến 500 nM. Chuột mdx đực được tiêm dưới da chỉ với tá được lỏng (đối chứng âm), "DMD-ASO 1" hoặc "DMD-ASO 4" ở mức 2 mL/Kg, 2 lần mỗi ngày (BID) trong 3 ngày. Một ngày sau liều cuối cùng, chuột mdx được gây mê bằng zoletil/rompun và bị chết để lấy mẫu mô cơ bao gồm tim, cơ hoành, bụng chân, cơ tứ đầu và cơ tam đầu.

[Trích xuất ARN] Các mẫu cơ được đồng nhất hóa bằng cách nghiền trong ống giữ trên đá và được chiết tách toàn bộ ARN với 1 ml thuốc thử trizol (Invitrogen) trên mỗi mô cơ 100 mg.

[Tổng hợp cADN bằng phương pháp RT-PCR một bước] 500 ng mẫu ARN đã được sử dụng trong phản ứng phiên mã ngược 25 µL bằng cách sử dụng bộ kit phương pháp RT-PCR Một bước Super Script® với polymeraza Taq Platinum® (Cat. Số 10928-042, Invitrogen) và một bộ mỗi đặc hiệu exon [DMD-exon 21_xuôi: (5' → 3') CAAAGAGAAAGAGCTACAGACA; và DMD-exon 25_ngược: (5' → 3') CTGGGCTGAATTGTTTGAAT] theo các điều kiện chu kỳ

sau: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, sau đó là 40 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 1 phút ở 58°C và 2 phút ở 72°C.

[Khuếch đại PCR lồng] 1 µL cADN được khuếch đại hơn nữa trong phản ứng PCR lồng 20 µL (Cat. Số K2612, Bione) với một bộ môi [DMD-exon 22n_xuôi: (5' → 3') ATCCAGCAGTCAGAAAGCAAA; và DMD-exon 25n_ngược: (5' → 3') ACTAAAAGTCTGCATTGT] theo các điều kiện chu kỳ sau: 95°C trong 5 phút tiếp theo 39 chu kỳ 30 giây ở 95°C, 40 giây ở 50°C và 50 giây ở 72°C.

[Nhận dạng sản phẩm nhảy Exon] Các sản phẩm PCR được phân tách điện di trên gel agaroza 2% như được cung cấp trong Hình 37A. Việc nhảy Exon 23 chỉ được phát hiện ở những con chuột được điều trị bằng "DMD-ASO 1" và "DMD-ASO 4". Mặc dù việc nhảy Exon 23 chỉ được phát hiện ở cơ tứ đầu và bụng chân, "DMD-ASO 1" dường như hiệu quả hơn "DMD-ASO 4".

Đối tượng của đối chứng âm tính (nghĩa là không điều trị ASO) mang lại một dải PCR được chỉ định cho việc nhảy các exon 22-23 trong cơ tứ đầu. Việc nhảy Exon 22-23 mang lại sự dịch chuyển khung và biến thể cắt nối ARN thông tin dystrophin thiếu exon 22-23 sẽ bị tiêu diệt để mã hóa một dystrophin bị cắt cụt với phần đầu C bị thiếu.

Các dải có kích thước mục tiêu được thu thập và phân tích bằng cách giải trình tự Sanger, và xác nhận sự nhảy Exon 23 gây ra bởi "DMD-ASO 1" và "DMD-ASO 4". (xem Hình 37B) Các dải PCR cho toàn bộ chiều dài (nghĩa là không nhảy) và nhảy Exon 22-23 đã được xác nhận bằng cách giải trình tự, mặc dù dữ liệu giải trình tự cho việc nhảy Exon 22-23 không được cung cấp.

DMD Ví dụ 2. nhảy Exon gây ra bởi "DMD-ASO 1" và "DMD-ASO 4" ở Chuột Mdx (Phương pháp PCR lồng B).

Các mẫu ARN thu được trong "DMD Ví dụ 1" đã được tổng hợp cADN một bước bằng cách sử dụng một bộ các đoạn môi đặc hiệu exon của [DMD-exon 20_xuôi: (5' → 3') CAGAATTCTGCCAATTGCTGAG; và DMD-exon 26_ngược: (5' → 3') TTCTTCAGCTT-GTGTCAATCC]. Các mẫu cADN sau đó

được phân tích bằng PCR lồng với một nhóm các môi đặc hiệu exon khác của [DMD-exon 20n_xuôi: (5' → 3') CCCAGTCTACCACCCTAT-CAGAGC; và DMD-exon 26n_ngược: (5' → 3') CCTGCCTTTAAGGCTTCCTT].

Các kết quả phương pháp RT-PCR lồng được cung cấp như được tóm tắt trong Hình 38A và Hình 38B. Ở những con chuột được xử lý ASO (N = 2 con chuột mỗi nhóm), các lần nhảy của exon 21-23 và exon 22-25 đã được phát hiện. Trong khi nhảy Exon 21-23 là trong khung (nghĩa là không có dịch chuyển khung), việc nhảy Exon 22-25 là ở ngoài khung. Dải PCR được chỉ định cho nhảy Exon 21-23 đã được xác nhận rõ ràng bằng cách giải trình tự Sanger. (xem Hình 38B)

Các hồ sơ nhảy Exon khác nhau tùy thuộc vào phương pháp PCR như được cung cấp ở trên. Do đó, hồ sơ nhảy exon nên được giải thích một cách thận trọng.

DMD Ví dụ 3. Nhảy Exon gây ra bởi "DMD-ASO 1" ở Chuột Mdx (Phương pháp PCR lồng A).

Chuột Mdx được tiêm dưới da với "DMD-ASO 1" ở mức 0 (đối chứng âm) hoặc 10 pmol/Kg, 2 lần mỗi ngày trong 5 ngày. (2 con chuột mỗi nhóm) Một ngày sau liều cuối cùng, các con chuột đã chết để lấy mẫu mô. Các mẫu cơ tam đầu được đánh giá để nhảy Exon 23 theo phương pháp RT-PCR lồng được mô tả trong "DMD Ví dụ 1".

Các kết quả phương pháp RT-PCR lồng được tóm tắt trong Hình 38C. Mặc dù một con chuột trong nhóm đối chứng âm mang lại dải PCR cho việc nhảy Exon 22-23, biến thể cắt nối ARN thông tin thiếu exon 22-23 là ở ngoài khung. Dải PCR cho nhảy Exon 23 chỉ được phát hiện ở một con chuột trong nhóm điều trị ASO. Do đó DM D-ASO 1 đã gây ra việc nhảy Exon 23 như được thiết kế.

DMD Ví dụ 4. Cải thiện chức năng cơ bắp bằng thử nghiệm Rotarod ở chuột Mdx tiêm dưới da với "DMD-ASO 1".

Nhảy exon 23 ở chuột mdx sẽ loại bỏ PTC trong exon 23 và biến thể cắt nối ARN thông tin thiếu exon 23 nằm trong khung và do đó mã hóa một protein biến thể với phần đầu C gắn vào ECM. Do đó, protein dystrophin biến thể đủ độ

dài phục hồi một phần các chức năng sinh lý của dystrophin có đủ độ dài nguyên gốc hoặc tự nhiên.

Với tiềm năng nhảy Exon đã cho, "DMD-ASO 1" đã được đánh giá ở chuột mdx về khả năng của nó để cải thiện chức năng cơ bắp bằng thử nghiệm rotarod như được mô tả dưới đây.

[Phân nhóm] Chuột mdx được 6 tuần tuổi được huấn luyện cho thử nghiệm rotarod trong khoảng thời gian 2 tuần, sau đó được phân ngẫu nhiên thành 3 nhóm 0 (đối chứng âm), 100 và 1.000 pmol/Kg "DMD-ASO 1" dựa trên các điểm số riêng lẻ bằng thử nghiệm rotarod trong Ngày 0, tức là ngày phân nhóm. (N = 10 con chuột mỗi nhóm)

[Điều trị ASO] Các dung dịch tiêm đã được chuẩn bị bằng cách pha loãng ASO thành 20 nM và 200 nM trong PBS. Những con chuột được tiêm dưới da bằng tá được lỏng (PBS, đối chứng âm), 20 nM "DMD-ASO 1" (100 pmol/Kg), hoặc 200 nM "DMD-ASO 1" (1.000 pmol/Kg) ở mức 5 mL/Kg, 3 lần mỗi tuần trong khoảng thời gian từ ngày 0 đến ngày 21.

[Thử nghiệm Rotarod và phân tích thống kê] Chuột đã được thử nghiệm rotarod trên thiết bị rotarod (Model # 47650, Ugo Basile) với lịch trình tăng tốc 4 vòng/phút đến 45 vòng/phút trong 60 giây. Độ trễ giảm (nghĩa là thời gian mà chuột vẫn còn trên rotarod) được tính cho từng con chuột. Ý nghĩa thống kê được đánh giá bằng nghiên cứu t của sinh viên đối với nhóm đối chứng âm.

[Cải thiện chức năng cơ bắp] Hình 39A tóm tắt điểm số rotarod theo nhóm. Điểm số rotarod (nghĩa là độ trễ giảm xuống) vẫn trì trệ ở mức trung bình khoảng 70 đến 120 giây trong nhóm đối chứng âm. Trong khi đó, chức năng cơ của nhóm 1.000 pmol/Kg dần dần được cải thiện rõ rệt cho đến ngày 12, và sau đó vẫn ổn định sau đó với điểm số trung bình là 210 đến 230 giây. Chức năng cơ bắp đã được cải thiện đáng kể trong Ngày 12, 14 và 19 bằng cách điều trị ASO ở mức 1.000 pmol/Kg. Chức năng cơ của nhóm 100 pmol/Kg cho thấy xu hướng cải thiện mạnh mẽ, nhưng không đáng kể.

DMD Ví dụ 5. Cải thiện chức năng cơ bắp bằng cách kiểm tra độ bám và tính toàn vẹn cơ bắp ở chuột Mdx được tiêm thường xuyên với "DMD-ASO 1".

"DMD-ASO 1" được đánh giá bằng cách tiêm thường xuyên cho chuột mdx về khả năng của nó để cải thiện chức năng cơ bắp bằng cách kiểm tra độ bám, để gây ra nhảy, để điều chỉnh tăng biểu hiện dystrophin đủ độ dài (nghĩa là, protein dystrophin với đầu C được mã hóa) bằng IHC và để cải thiện tính toàn vẹn của cơ bắp bằng mô bệnh học với nhuộm H&E như được mô tả dưới đây.

[Phân nhóm & Điều trị ASO] Chuột mdx đực (7 tuần tuổi) được phân ngẫu nhiên vào 4 nhóm 0 (đối chứng âm mdx), 10, 50 và 200 pmol/Kg "DMD-ASO 1" dựa trên các điểm số độ bám của từng cá thể bằng cách kiểm tra độ bám. (N = 12 con chuột mỗi nhóm) Một nhóm vệ tinh gồm 12 con chuột C57BL/6 (7 tuần tuổi) được đưa vào nghiên cứu này làm nhóm đối chứng âm dạng tự nhiên cho mức độ biểu hiện dystrophin toàn chiều dài.

Nhóm 50 và 200 pmol/Kg được tiêm dưới da với "DMD-ASO 1" khi được hoà tan trong PBS, 2 lần mỗi tuần cho đến khi chết cuối cùng trong Tuần 43. Trong khi đó, nhóm 10 pmol/Kg được tiêm dưới da với "DMD-ASO 1" ban đầu 2 lần mỗi tuần trong Tuần 0 đến 8 và 3 lần mỗi tuần sau đó để tăng tiếp xúc với ASO.

[Chức năng cơ bắp bằng cách kiểm tra độ bám] Chức năng cơ bắp được đánh giá hàng tuần bằng lực bám trên máy đo độ bám (Cat. Số 47.200, Ugo Basile) theo tài liệu. [*J. Appl. Vật lý trị liệu*. vol 106 (4), 1311-1324 (2009)] Điểm số độ bám của nhóm được đánh giá có ý nghĩa thống kê bằng nghiên cứu t của sinh viên đối với nhóm đối chứng âm mdx.

Hình 39B tóm tắt các điểm số độ bám quan sát được theo nhóm trong Tuần 0 đến 30. Trong 11 tuần đầu tiên sau liều đầu tiên, không có thay đổi rõ rệt về cường độ bám giữa các nhóm điều trị ASO và nhóm đối chứng âm. Cường độ bám của nhóm đối chứng âm mdx đạt tối đa khoảng 107g trong Tuần 3, dần dần phân rã trong vài tuần, và sau đó duy trì tương đối ổn định ở khoảng 75 đến 95g. Cường độ bám của các nhóm điều trị ASO bắt đầu cải thiện dần từ Tuần 10 trở đi. Trong các nhóm điều trị, cường độ bám có xu hướng tăng 30 ~ 50% so với nhóm đối chứng âm mdx.

Cần lưu ý rằng 2 đến 3 động vật mỗi nhóm được chọn ngẫu nhiên và chết trong Tuần 7, 13, 21 và 30 để đánh giá PCR lồng hoặc IHC. (xem bên dưới)

[Đánh giá IHC về cơ xương với Dystrophin đầy đủ độ dài] Trong tuần 7, 13 và 21, hai động vật trong mỗi nhóm được chọn ngẫu nhiên và chết để trích xuất các mô cơ. Trong tuần 30, 3 con vật đã bị chết ở mỗi nhóm.

Các mô cơ được lấy mẫu trong Tuần 7 được trải qua IHC với dystrophin đầy đủ độ dài bằng cách bảo quản lạnh. Các mô cơ được lấy mẫu trong các tuần 13, 21 và 30 được nhuộm miễn dịch bởi khối parafin. IHC bởi khối parafin mang lại hình ảnh có chất lượng tốt hơn IHC bằng phương pháp bảo quản lạnh.

Các mẫu cơ đã được nhuộm miễn dịch hàng loạt với một kháng thể đầu tiên nhắm mục tiêu vào đầu C của dystrophin ở chuột (Cat. Số sc-816, Santa Cruz) ở tỷ lệ pha loãng 1:100, với kháng thể kháng IgG thứ hai (Cat Number BA-1100, Vector) ở tỷ lệ pha loãng 1:200, và sau đó với Dylight 594-steptavidin (Số Cat SA-5594, Vector, CA, USA) ở tỷ lệ pha loãng 1:200 để gắn thẻ huỳnh quang màu đỏ. Hình ảnh IHC được chụp trên máy quét Zeiss (trong Tuần 13, 21 và 30) hoặc kính hiển vi huỳnh quang Olympus (trong Tuần 7). Nhuộm DAPI cũng được thực hiện.

Hình 40 là một bộ đại diện của các hình ảnh IHC dystrophin có đủ độ dài theo nhóm cho các mẫu cơ được trích xuất trong tuần 30. Nhóm đối chứng âm tính dạng tự nhiên (WT) mang lại các kiểu biểu hiện dystrophin đặc biệt và góc cạnh phản ánh cấu trúc tự nhiên của các bó sợi cơ. Trong nhóm đối chứng âm chuột mdx, không có nhiều sự nhuộm dystrophin có đủ độ dài. Trong khi đó, các kiểu nhuộm dystrophin mạnh mẽ và góc cạnh đã được quan sát thấy trong các cơ xương của nhóm điều trị 200 pmol/Kg. Mặc dù cấu trúc bó sợi cơ bị mờ ở chuột mdx so với chuột WT, biểu hiện dystrophin đủ độ dài tăng rõ rệt ở động vật được điều trị bằng ASO.

Các hình ảnh IHC dystrophin đã được định lượng cho biểu hiện dystrophin có đủ độ dài bằng cách ghi điểm kỹ thuật số cường độ huỳnh quang đỏ trong mỗi hình ảnh IHC riêng lẻ bằng chương trình "ImageJ" (NIH). Điểm huỳnh quang cá

nhân được kết hợp theo nhóm và loại cơ để đánh giá thống kê với nhóm đối chứng âm dạng tự nhiên.

Hình 41 tóm tắt những thay đổi về mức độ biểu hiện tương đối của protein dystrophin có đủ độ dài ở chuột mdx. Sự biểu hiện của dystrophin đủ độ dài có xu hướng tăng nhiều hơn ở liều ASO cao hơn và thời gian điều trị lâu hơn. Trong tuần 30, biểu hiện dystrophin có đủ độ dài trong nhóm 200 pmol/Kg đạt > 80% nhóm đối chứng âm WT, trong khi biểu hiện trong đối chứng âm mdx nhỏ hơn 20% nhóm đối chứng âm tính dạng tự nhiên.

[PCR lồng cho sự nhảy Exon (Phương pháp B)] Các mẫu cơ được đồng nhất hóa bằng cách nghiền trong ống giữ trên đá và được chiết xuất toàn bộ ARN với 1 ml thuốc thử trizol (Invitrogen) trên mỗi 100 mg mô cơ. Toàn bộ các ARN được đánh giá nhảy Exon bằng PCR lồng như được mô tả trong " DMD Ví dụ 2".

Hình 42 cung cấp dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng thu được với các cơ xương được lấy mẫu trong Tuần 7. Các sản phẩm PCR lồng của các exon 21-23 và Δcác exon 21-24 đã được phát hiện trong các mẫu cơ của các nhóm điều trị ASO, nhưng hoàn toàn không có trong các nhóm đối chứng âm mdx.

[Mô bệnh học bằng cách nhuộm H&E] Viêm và thoái hóa cơ là dấu hiệu đặc trưng của triệu chứng DMD. Các mẫu cơ xương đã được đánh giá mô bệnh học bằng cách nhuộm H&E. Hình 43 cung cấp một bộ đại diện các hình ảnh nhuộm H & E cho cơ tam đầu theo nhóm và thời điểm lấy mẫu.

Trong nhóm đối chứng âm WT, cấu trúc cơ dày đặc tại tất cả các thời điểm lấy mẫu. Không có gợi ý nào về tình trạng viêm cơ trong cơ bắp của chuột tự nhiên ở mọi thời điểm.

Trong đối chứng âm mdx, cấu trúc cơ cho thấy một mô hình rõ ràng của sự thoái hóa dần dần theo tuổi tác. Đáng chú ý nhất là trong Tuần 30, các bó cơ không được kết nối với nhau và có xu hướng thoái hóa thành hình tròn. Ngoài ra còn có sự xâm nhập lớn của các tế bào viêm như được đề xuất bởi các vết màu xanh lam, đáng chú ý nhất là trong Tuần 13 và 21.

Trong nhóm 200 pmol/Kg, cấu trúc cơ lỏng lẻo trong Tuần 7 dần dần phục hồi thành cấu trúc dày đặc. Sự xâm nhập rõ rệt của các tế bào viêm trong Tuần 7

dần biến mất theo tuổi tác. Do đó, thoái hóa và viêm cơ ở chuột mdx đã được đảo ngược khi sử dụng ASO thường xuyên ở mức 200 pmol/Kg, phù hợp với sự điều hòa tăng của dystrophin đủ độ dài trong nhóm 200 pmol/Kg.

Mức độ nghiêm trọng của kết quả mô bệnh học ở nhóm 10 và 50 pmol/Kg yếu hơn mức độ nghiêm trọng trong đối chứng âm mdx, nhưng mạnh hơn ở nhóm 200 pmol/Kg. Do đó, sự điều hòa tăng của dystrophin đủ độ dài gây ra bởi sự tiếp xúc ASO phần lớn phù hợp với kết quả mô bệnh học.

[Những phát hiện khác] Có ba trường hợp chết đột xuất (Tuần 26, 39 và 43) trong nhóm đối chứng âm mdx do một khối lượng lớn u lympho cơ bắp phát triển rất có thể do viêm cơ mãn tính. Không có trường hợp ung thư hạch trong tất cả các nhóm điều trị ASO.

[So sánh với ASO Dystrophin khác] Eteplirsen (exondys 51) là một oligonucleotit antisense PMO được thiết kế để tạo ra sự nhảy Exon 51 trong tiền ARN thông tin của dystrophin ở người. Gần đây, FDA Hoa Kỳ đã ban hành một phê duyệt tăng tốc của eteplirsen để sử dụng trong nhóm bệnh nhân DMD cần nhảy Exon 51. Liều khuyến cáo của eteplirsen là tiêm tĩnh mạch 30 mg/Kg mỗi tuần.

Liều tiêm dưới da 200 pmol/Kg "DMD-ASO 1" tương ứng với khoảng 1 μ g/Kg. ASO dystrophin của Công thức I mạnh hơn ASO PMO khoảng 30.000 lần, mặc dù có sự khác biệt về loài và exon giữa hai loại ASO. Khả năng nhảy Exon cực kỳ mạnh mẽ chưa từng thấy của dẫn xuất APN của Công thức I đã được dịch lại thành một tiềm năng trị liệu in vivo cực mạnh cho căn bệnh hiếm gặp khó điều trị này.

DMD Ví dụ 6. Cải thiện chức năng cơ bắp bằng khoảng cách đi bộ ở chuột MDx được tiêm thường xuyên với "DMD-ASO 2".

"DMD ASO 2" được chỉ rõ trong Bảng 7 là một ASO 17 me bổ sung đầy đủ cho một khu vực trong vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 22 và exon 23 trong tiền ARN thông tin dystrophin ở chuột. "DMD-ASO 2" gắn kết bổ sung với trình tự 17 me được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" như trong trình tự

dystrophin 20 me ở chuột của [(5' → 3') uaauuuugag | GCUCUGCAAA]. "DMD-ASO 2" có một chồng lắp 8 me với intron 22 và một chồng lắp bổ sung 9 me với exon 23.

"DMD-ASO 2" được sử dụng thường xuyên cho chuột mdx để đánh giá khả năng của nó để cải thiện chức năng cơ bắp bằng khoảng cách đi bộ trên máy chạy bộ và để ức chế sự thoái hóa cơ bắp do nồng độ creatin kinaza (CK) và myoglobin trong huyết thanh.

[Động vật & Phân nhóm] Chuột mdx đực (6 tuần tuổi) được phân ngẫu nhiên vào ba nhóm đối chứng âm mdx (không điều trị ASO), "DMD-ASO 2" 10 pmol/Kg và "DMD-ASO 2" 30 mg/Kg dựa trên trọng lượng cơ thể. (N = 16 con chuột mỗi nhóm) 12 con chuột đực C57BL/6 (6 tuần tuổi) được chọn làm nhóm đối chứng âm dạng tự nhiên (WT).

[Dung dịch tiêm & điều trị ASO] Dung dịch gốc nước của "DMD-ASO 2" được pha loãng trong PBS hoặc trong PBS bổ sung 0,1% Tween 80 để chuẩn bị dung dịch tiêm 20 và 60 nM "DMD-ASO 2" cho 10 pmol/Kg và 30 pmol/Kg "DMD-ASO 2", tương ứng. Bổ sung dung dịch tiêm PBS với 0,1% Tween 80 được coi là cần thiết để ngăn các phân tử ASO dính vào lọ tiêm nhựa, đầu pipet và ống tiêm.

[Khoảng cách đi bộ trên máy chạy bộ] Trong 30 tuần đầu tiên sau phân nhóm, các động vật được tiêm dung dịch tiêm mà không có Tween 80 2 lần mỗi tuần với 2 ml/Kg. Bắt đầu từ Tuần 7, các con vật đã được đi bộ trên một máy chạy bộ (Model #LE8710, PanLab) trên cơ sở hàng tuần. Tuy nhiên, trong 30 tuần đầu tiên, các nhóm điều trị ASO đã không cho thấy bất kỳ cải thiện đáng kể nào về khoảng cách đi bộ so với nhóm đối chứng âm mdx.

Để tăng liều ASO một cách hiệu quả, động vật được tiêm các dung dịch tiêm bổ sung Tween 80, 2 lần mỗi tuần kể từ Tuần 36. Có một khoảng thời gian rửa trôi (tức là không có liều ASO) trong 5 tuần ở giữa.

Hình 44A tóm tắt khoảng cách đi bộ trên máy chạy bộ theo nhóm trong Tuần 43 đến 48. Khoảng cách đi bộ trung bình của nhóm đối chứng âm mdx giảm dần nhưng giảm nhanh chóng từ khoảng 250 mét trong Tuần 43 đến 130 mét trong

tuần 48. Khoảng cách đi bộ trung bình của các nhóm điều trị ASO là dài hơn rõ rệt khoảng cách của nhóm đối chứng âm mdx.

Trong các tuần từ 46 đến 48, nhóm 10 pmol/Kg cho thấy khoảng cách đi bộ trung bình từ 240 đến 280 mét, dài hơn đáng kể so với khoảng cách của nhóm đối chứng âm mdx. Trong khi đó, nhóm 30 pmol/Kg cho thấy khoảng cách đi bộ từ 180 đến 230 mét trong suốt 46 đến 48 tuần. Có xu hướng khoảng cách đi bộ dài hơn với nhóm 10 pmol/Kg so với nhóm 30 pmol/Kg. Đáp ứng liều ngược của khoảng cách đi bộ sẽ gợi ý tự nhiên lựa chọn các exon khác nhau ở liều ASO cao hơn như được quan sát trong "HIF-1 α Ví dụ 9". Thật thú vị, nhóm đối chứng âm WT và nhóm 30 pmol/Kg cho thấy khoảng cách đi bộ tương đương trong các tuần từ 44 đến 47.

[Con chuột bị chết cuối cùng] Trong tuần 48, các con chuột đã bị chết cuối cùng để lấy mẫu máu. Các mẫu máu đã được phân tích về nồng độ CK trong huyết thanh (Bộ xét nghiệm hoạt tính Creatine Kinase, Cat. Number ab155901, Abcam) để đánh giá mức độ thoái hoá cơ theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mô cơ được phân tích bằng Western blot cho dystrophin đủ độ dài.

[Nồng độ của CK và Myoglobin trong huyết thanh] Hình 44B cung cấp nồng độ CK trong huyết thanh quan sát được theo nhóm. Phản ánh sự mong manh cơ bắp của chuột mdx, tất cả các nhóm chuột mdx mang lại hoạt tính CK trong huyết thanh cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng âm WT. Ví dụ, nồng độ CK trong huyết thanh của nhóm đối chứng âm mdx cao hơn 54 lần so với nồng độ của nhóm đối chứng âm WT. Nồng độ CK trong huyết thanh của nhóm 10 và 30 pmol/Kg là nhỏ hơn so với nồng độ của nhóm đối chứng âm mdx 58% và 38%, tương ứng. Sự khác biệt về nồng độ CK trong huyết thanh giữa nhóm 10 pmol/Kg và nhóm đối chứng âm mdx là rất đáng kể.

Hình 44C cung cấp nồng độ myoglobin huyết thanh quan sát theo nhóm. Phản ánh sự mong manh cơ bắp của chuột mdx, tất cả các nhóm chuột mdx đều mang lại mức myoglobin huyết thanh cao hơn nhiều so với mức của nhóm đối chứng âm WT. Ví dụ, nồng độ myoglobin trong huyết thanh của nhóm đối chứng âm mdx cao hơn 22 lần so với nồng độ của nhóm đối chứng âm WT. Nồng độ

myoglobin trong huyết thanh của nhóm 10 và 30 pmol/Kg nhỏ hơn đáng kể so với nồng độ của nhóm đối chứng âm mdx lần lượt là 67% và 58%.

Dữ liệu quan sát được của các dấu ấn sinh học trong huyết thanh cho sự thoái hóa cơ bắp hoàn toàn phù hợp với sự phụ thuộc liều của khoảng cách đi bộ được cung cấp trong Hình 44A.

[Biểu hiện Dystrophin đầy đủ độ dài trong cơ ba đầu bằng Western blot] Sau khi đồng nhất hóa ở nhiệt độ nitơ lỏng, các mẫu cơ (cơ tam đầu) đã được phân giải trong dung dịch đệm RIPA được bổ sung 1% SDS. Nồng độ protein trong mỗi dịch phân giải được định lượng bằng xét nghiệm BCA với tiêu chuẩn BSA. 50 mg protein của mỗi dịch phân giải đã được phân tách bằng điện di trên gel PAGE 8%. Sau đó, màng PVDF đã được thăm dò với một kháng thể dystrophin nhắm mục tiêu vào đầu cuối C (Cat. Số ab154168, Abcam).

Hình 45A cung cấp dữ liệu Western blot quan sát được. Dystrophin đủ độ dài với kích thước 427K không được phát hiện trong tất cả các mẫu. Thay vào đó, các mẫu cơ WT mang lại protein dystrophin nhỏ hơn có kích thước 170K, 130K và 117K, trong đó dải kích thước 130K được làm giàu nhiều nhất.

Trong trường hợp của các nhóm mdx, ba dải dystrophin đã được phát hiện. Các nhóm điều trị 10 và 30 pmol/Kg mang lại dải 117K mạnh hơn rõ rệt so với nhóm đối chứng âm mdx cũng như nhóm đối chứng WT. Cường độ dải 130K cũng mạnh hơn đáng kể ở nhóm 10 pmol/Kg so với nhóm đối chứng âm mdx.

DMD Ví dụ 7. Đánh giá dài hạn về chuột MDx được tiêm với "DMD-ASO 1", "DMD-ASO 2" hoặc "DMD-ASO 6".

"DMD ASO 6" được chỉ rõ trong Bảng 7 là ASO 18 me bổ sung đầy đủ cho một khu vực trong vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 23 và intron 23 trong tiền ARN thông tin dystrophin ở chuột. "DMD-ASO 6" chồng lấp bổ sung với trình tự 18-mer như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" ở tiền ARN thông tin dystrophin 25-mer chuỗi các [ở chuột của (5' → 3') AAAAAUUUCAG | guaagccgagguuug]. "DMD-ASO 6" có một chồng lấp 8 me với exon 23 và một chồng lấp 10 me với intron 23.

"DMD-ASO 1", "DMD-ASO 2" và "DMD-ASO 6" đã được đánh giá về tác dụng sinh lý của chúng ở chuột đực mdx bằng cách tiêm dưới da dài hạn. Trong đánh giá này, các động vật không phải trải qua các xét nghiệm vật lý đòi hỏi căng thẳng cơ bắp để giữ cho sự phiên mã của gen dystrophin không bị xáo trộn do kích thích cơ bắp quá mức.

[Động vật & Phân nhóm] Chuột mdx đực (6 tuần tuổi) được phân ngẫu nhiên vào 4 nhóm đối chứng âm mdx (không điều trị ASO), "DMD-ASO 1" 50 pmol/Kg, "DMD-ASO 2" 10 mg/Kg và "DMD-ASO 6" 10 mg/Kg dựa trên trọng lượng cơ thể. (N = 12 ~ 13 con chuột mỗi nhóm) 12 con chuột đực C57BL/6 (6 tuần tuổi) được chọn làm nhóm đối chứng âm dạng tự nhiên (WT).

[Dung dịch tiêm & Điều trị ASO] Các dung dịch gốc nước của ASO đã được pha loãng lần lượt trong PBS để chuẩn bị các dung dịch tiêm 25 nM "DMD-ASO 1" cho 50 pmol/Kg "DMD-ASO 1", 5 nM "DMD-ASO 2" cho "DMD-ASO 2" 10 pmol/Kg và 5 nM "DMD-ASO 6" cho "DMD-ASO 6" 10 pmol/Kg. Các động vật được tiêm dưới da với các dung dịch tiêm ở mức 2 mL/Kg, 2 lần mỗi tuần.

[Cái chết không được định trước] Những con chuột mdx được điều trị bằng các ASO có xu hướng cho thấy sự sống lâu hơn so với nhóm đối chứng âm mdx, cho thấy hoạt tính trị liệu của các ASO.

Trong nhóm đối chứng âm mdx, có ba trường hợp chết đột xuất: một trường hợp tại các Tuần 42, 58 và 61. Nhóm điều trị "DMD-ASO 1" cho thấy hai trường hợp chết sớm, một ở Tuần 38 và một ở Tuần 61. Trong trường hợp nhóm điều trị "DMD-ASO 2", một trường hợp chết trong Tuần 56 và một trường hợp khác trong Tuần 62. Có ba trường hợp tử vong sớm trong nhóm điều trị "DMD-ASO 6": một trường hợp tại các tuần 55, 65 và 66.

[Cái chết cuối cùng] Tất cả các động vật sống sót đã được hy sinh để lấy mẫu máu trong Tuần 66 sau phân nhóm. Các mẫu máu đã được xét nghiệm ELISA cho huyết thanh creatin kinaza (CK) và myoglobin trong huyết thanh như được mô tả trong "DMD Ví dụ 6".

[Nồng độ của CK và Myoglobin trong huyết thanh] Hình 45B cung cấp nồng độ CK trong huyết thanh quan sát được theo nhóm. Phản ánh sự mong manh cơ bắp của chuột mdx, tất cả các nhóm chuột mdx mang lại hoạt tính CK trong huyết thanh cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng âm WT. Ví dụ, nồng độ CK trong huyết thanh của nhóm đối chứng âm mdx cao hơn 17 lần so với nồng độ của nhóm đối chứng âm WT. Nồng độ CK trong huyết thanh của nhóm điều trị ASO có xu hướng nhỏ hơn nồng độ của nhóm đối chứng âm mdx, cho thấy hoạt tính trị liệu của các ASO. Tuy nhiên, sự khác biệt là không đáng kể.

Hình 45C cung cấp nồng độ myoglobin trong huyết thanh quan sát được theo nhóm. Phản ánh sự mong manh cơ bắp của chuột mdx, tất cả các nhóm chuột mdx mang lại myoglobin trong huyết thanh cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng âm WT. Ví dụ, nồng độ myoglobin trong huyết thanh của nhóm đối chứng âm mdx cao hơn khoảng 26 lần so với nồng độ của nhóm đối chứng âm WT. Nồng độ myoglobin trong huyết thanh của các nhóm điều trị "DMD-ASO 1", "DMD-ASO 2" và "DMD-ASO 6" nhỏ hơn nồng độ của nhóm đối chứng âm mdx 43%, 49% và 68%, tương ứng. Sự khác biệt giữa nhóm đối chứng âm MDx và nhóm "DMD-ASO 6" là rất đáng kể. Các dấu ấn sinh học trong huyết thanh cho tính toàn vẹn cơ bắp gián tiếp hỗ trợ rằng "DMD-ASO 6" gây ra sự nhảy của exon 23 dystrophin và mang lại (các) dystrophin đầy đủ độ dài hoạt động chức năng ở chuột mdx.

Ví dụ cho các hoạt tính in vitro của các ASO IDO1

Các dẫn xuất APN của Công thức I trong Bảng 8 được thiết kế để nhắm mục tiêu bổ sung cho các vị trí cắt nối khác nhau trong tiền ARN thông tin IDO1 ở người. ASO IDO1 được đánh giá về hoạt tính nhảy Exon trong các tế bào SKOV3. Cho rằng IDO1 xúc tác sự thoái biến của L-tryptophan thành N-focmylkynurenin, ASO IDO1 được đánh giá về khả năng chức năng của chúng để ức chế sản xuất kynurenin. Các ví dụ sinh học được cung cấp ở đây là để minh họa hoạt tính nhảy Exon của ASO IDO1 làm ví dụ cho hợp chất của Công thức I, và do đó không nên diễn giải để giới hạn phạm vi của sáng chế này đối với ASO IDO1.

IDO1 Ví dụ 1. Nhảy Exon gây ra bởi "IDO-ASO 1".

"IDO-ASO 1" được chỉ rõ trong Bảng 8 là ASO 13 me bổ sung đầy đủ cho một khu vực trong vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 6 và exon 7 trong tiền ARN thông tin IDO1 ở người. "IDO-ASO 1" nhắm mục tiêu bổ sung cho trình tự 13-mer như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin 20-mer IDO1 ở người của [(5' → 3') uuuguuuuag | GUAAUCCUA]. "IDO-ASO 1" có một chồng lấp 5 me với intron 6 và một chồng lấp 8 me với exon 7.

"IDO-ASO 1" được đánh giá về khả năng của nó để tạo ra nhảy exon trong các tế bào SKOV3 (Cat. Số HTB-77, ATCC) bằng phương pháp PCR lồng IDO1 như sau.

[Nuôi cấy tế bào & điều trị ASO] Tế bào SKOV3 (ung thư biểu mô buồng trứng ở người) được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa 5 mL môi trường được biến đổi McCoy 5A được bổ sung 10% FBS, 1% streptomycin/penicillin, 1% L-glutamin, và 1% natri pyruvat dưới 5% CO₂ tại 37°C và được xử lý bằng "IDO-ASO 1" trong 48 giờ ở 0 zM (đối chứng âm), 10 zM, 100 zM hoặc 1 aM.

[Trích xuất ARN & Tổng hợp cADN bằng phương pháp RT-PCR một bước] Toàn bộ ARN được chiết xuất từ các tế bào bằng cách sử dụng Bộ kit tách chiết ARN phổ quát (Cat. Số 9767, Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu ARN 200 ng trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 µL bằng cách sử dụng bộ kit phương pháp RT-PCR một bước Super Script® với polymeraza Taq Platinum® (Cat. Số 10928-042, Invitrogen) với một bộ môi đặc hiệu exon [IDO-exon 2_xuôi: (5' → 3') TTCATTGCTAAACATCTGCC; và IDO-exon 10 ngược: (5' → 3') TGAAAGGACAAACTCACGGA] theo các điều kiện chu trình sau: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, sau đó là 40 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 50°C và 1 phút ở 72°C.

[Khuếch đại PCR lồng] 1 µL cADN được khuếch đại hơn nữa trong phản ứng PCR lồng 20 µL (Cat. Số K2612, Người tiên phong) với một bộ môi đặc hiệu exon [IDO-exon 4_xuôi: (5' → 3') CCTTACTGCCAACTCTCC; và IDO-exon 9_ngược: (5' → 3') CTGCTTTGGCCTGCACTG] theo các điều kiện chu kỳ sau:

95°C trong 5 phút sau đó là 30 chu kỳ 30 giây ở 95°C, 30 giây ở 50°C và 1 phút ở 72°C.

[Nhận dạng sản phẩm nhảy Exon] Các sản phẩm PCR được phân tách điện di trên gel agarosa 2%. Các dải có kích thước mục tiêu được thu thập và phân tích bằng phương pháp giải trình tự Sanger.

Hình 46A cung cấp dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng (sơ đồ bên trái) và dữ liệu giải trình tự Sanger của dải PCR được chỉ định để nhảy Exon 6-7 (phải). Việc nhảy Exon 6-7 đã được phát hiện trong chiết xuất ARN của các tế bào được xử lý với 100 zM "IDO-ASO 1". Dải nhảy Exon không được phát hiện trong chiết xuất ARN của các tế bào được xử lý bằng ASO ở mức 10 zM hoặc 1 aM rất có thể do độ ổn định kém của biến thể cắt nối ARN thông tin IDO1 thiếu exon 6-7. Mặc dù cường độ của ARN thông tin IDO-1 đủ độ dài đã giảm trong các tế bào được điều trị bằng ASO ở mức 10 hoặc 100 zM, cường độ của PCR ARN thông tin đủ độ dài đã tăng lên trong các tế bào được điều trị bằng ASO ở mức 1 aM. Sự gia tăng quan sát được của nồng độ ARN thông tin đầy đủ độ dài ở mức 1 aM vẫn chưa được làm rõ. Nó có thể là một yếu tố giả trong các phản ứng PCR, hoặc có thể là do sự điều hòa tăng phiên mã (thoáng qua) bởi "ARN vòng tròn exon intron (EICIARN)" được tích lũy trong quá trình nhảy Exon bởi "IDO-ASO 1". [*Cấu trúc tự nhiên. Mol. Biol.* vol 22 (3), 256-264 (2015)] Dữ liệu giải trình tự Sanger (sơ đồ bên phải) đã chứng minh một cách rõ rệt việc nhảy các exon 6-7 gây ra bởi "IDO-ASO 1" trong các tế bào SKOV3.

IDO1 Ví dụ 2. Hoạt tính chức năng antisense của "IDO-ASO 1".

Hoạt tính chức năng của "IDO-ASO 1" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế bài tiết kynurenin trong các tế bào SKOV3 như sau.

[xét nghiệm bài tiết Kynurenin] Các tế bào SKOV3 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường nuôi cấy 5 mL được xử lý bằng "IDO-ASO 1" ở 0 zM (đối chứng âm) hoặc 10 zM đến 1 fM. (3 đĩa mỗi nồng độ) Các tế bào được điều trị bằng các ASO cùng với 10 ng/mL γ -interferon để tăng sự bài tiết kynurenin. 24 giờ sau, 200 μ L môi trường nuôi cấy được lấy mẫu từ mỗi đĩa nuôi cấy và trộn với axit trichloroacetic 100 μ L 30%. Hỗn hợp đã được tạo xoáy và được

ly tâm ở mức 8.000g trong 5 phút. 75 μ L của phần nổi phía trên bề mặt thu được được trộn với 75 μ L thuốc thử Ehrlich (0,8% p-dimethylamino-benzaldehyt trong axit axetic), và hỗn hợp đã được định lượng cho kynurenin tại 490nm trên một đầu đọc ELISA. [PLoS One 5(8): e63301 (2013)].

Hình 46B cung cấp kết quả xét nghiệm kynurenin. Ngoại trừ các tế bào được điều trị bằng 1 aM "IDO-ASO 1", sự bài tiết của kynurenin giảm đáng kể (xét nghiệm t của sinh viên) trong các tế bào được điều trị bằng ASO ở mức 10 zM đến 1 fM. Sự bài tiết Kynurenin giảm khoảng 40% trong các tế bào được điều trị bằng 1 fM "IDO-ASO 1".

IDO1 Ví dụ 3. Nhảy Exon gây ra bởi "IDO-ASO 5".

"IDO-ASO 5" được chỉ rõ trong Bảng 8 là ASO 13 me bổ sung đầy đủ cho một khu vực trong vị trí cắt nối 5' (5' SS), kéo dài qua điểm nối của exon 3 và intron 3 trong tiền ARN thông tin IDO1 ở người. "IDO-ASO 5" chồng lấp bổ sung với trình tự 13 me như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin IDO1 20 me ở người của [5' $\rightarrow$ 3') UGUCCGUAAG | guuuggagau]. "IDO-ASO 5" có một chồng lấp bổ sung 8 me với exon 3 và một chồng lấp bổ sung 5 me với intron 3.

"IDO-ASO 5" được đánh giá về khả năng của nó để tạo ra sự nhảy Exon trong các tế bào SKOV3 bằng phương pháp RT-PCR lồng IDO1 như được mô tả trong "IDO1 Ví dụ 1" trừ khi có ghi chú khác.

[Điều trị ASO] Các tế bào SKOV3 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm được xử lý bằng "IDO-ASO 5" ở 0 (đối chứng âm), 1, 3, 10, 30 hoặc 100 aM trong 48 giờ.

[Tổng hợp cADN bằng phương pháp PCR một bước] 200 ng mẫu ARN trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 μ l bằng bộ kit phương pháp RT-PCR một bước Super Script® với Taq polymeraza platinum® (Cat. Số 10928-042, Invitrogen) với một bộ mồi đặc hiệu exon [IDO-exon 1_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') AAAACTCCTGGACAATCAGT; và IDO-exon 8_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') ACTTGAAGGGCTTTCTCC] theo các điều kiện chu trình sau: 50°C trong 30

phút và 94°C trong 2 phút, sau đó là 40 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 52°C và 40 giây ở 72°C.

[Khuếch đại PCR lồng] 1 µL cADN đã được khuếch đại hơn nữa trong phản ứng PCR lồng 20 µL (Cat. Số K2612, Bione) bằng cách sử dụng một bộ mồi đặc hiệu exon [IDO-exon 1n_xuôi: (5' → 3') ; và IDO-exon 8n ngược: (5' → 3') GTTCACATGATCGTGGATTTG] theo các điều kiện chu kỳ sau: 95°C trong 5 phút sau đó là 30 chu kỳ 30 giây ở 95°C, 40 giây ở 52°C và 40 giây ở 72°C.

[Dữ liệu sản phẩm PCR lồng] Hình 47A cung cấp dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng. Các tế bào được xử lý bằng "IDO-ASO 5" ở 30 và 100 aM rõ ràng mang lại các biến thể cắt nối ARN thông tin thiếu exon 2-4 và exon 2-6. Cường độ của ARN thông tin đủ độ dài giảm trong các tế bào được xử lý ASO, mặc dù cường độ hơi tăng lên trong các tế bào được điều trị bằng ASO ở mức 10 aM. Hình 47B cung cấp dữ liệu giải trình tự Sanger của các biến thể cắt nối ARN thông tin thiếu exon 2-4 và exon 2-6.

IDO1 Ví dụ 4. Nhảy Exon gây ra bởi "IDO-ASO 6".

"IDO-ASO 6" được chỉ rõ trong Bảng 8 là ASO 13 me bổ sung đầy đủ cho một khu vực trong vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 3 và exon 4 trong tiền ARN thông tin IDO1 ở người. "IDO-ASO 6" nhằm mục tiêu bổ sung vào vào trình tự 13 me như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin IDO1 20 me ở người của [(5' → 3') uuuuu**aucag** | **GUCUUGCCAA**]. "IDO-ASO 6" có một chồng lắp bổ sung 5 me với intron 3 và một chồng lắp bổ sung 8-mer với exon 4.

"IDO-ASO 6" được đánh giá về khả năng của nó để tạo ra nhảy exon trong các tế bào SKOV3 bằng PCR lồng IDO1 như được mô tả trong "IDO1 Ví dụ 3" trừ khi có ghi chú khác.

[Dữ liệu sản phẩm PCR lồng] Hình 47C cung cấp dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR lồng (sơ đồ bên trái) cùng với dữ liệu giải trình tự Sanger của dải PCR có thể gán cho nhảy exon (sơ đồ bên phải). Các tế bào được xử lý bằng "IDO-ASO 6" ở mức 1 đến 30 aM rõ ràng mang lại một biến thể cắt nối ARN thông tin duy nhất thiếu exon 2-5, mặc dù dải nhảy Exon không được phát hiện trong các

tế bào được xử lý với ASO ở 100 aM. Cường độ ARN thông tin đủ độ dài mạnh hơn trong các tế bào được xử lý ASO so với các tế bào không được xử lý ASO, điều này có thể là do sự điều hòa tăng phiên mã bởi "ARN vòng tròn exon intron (EiciARN)" được tích lũy trong quá trình nhảy Exon bởi "IDO-ASO 1". [*Cấu trúc tự nhiên. Mol. Biol.* vol 22 (3), 256-264 (2015).

Ví dụ về các hoạt tính in vitro và ex vivo của các ASO SNAP25

SNAP25 (protein gắn kết synaposome 25 kDa) là một protein SNARE liên quan sự xuất bào của các chất dẫn truyền thần kinh trong các tế bào thần kinh vận động. Botulinum toxin A (Botox™) tách SNAP25 cho hoạt tính chống nhăn nổi tiếng của nó. Các dẫn xuất APN của Công thức I trong Bảng 9 được thiết kế để nhắm mục tiêu bổ sung vào vị trí cắt nối 3' của exon 7 trong tiền ARN thông tin SNAP25 ở người. ASO SNAP25 được đánh giá về hoạt tính antisense SNAP25 trong các tế bào SiMa (u nguyên bào thần kinh ở người) và các tế bào PC12 có nguồn gốc từ chuột, cũng như khả năng của chúng để ức chế biểu hiện SNAP25 trên da của chuột khi sử dụng tại chỗ. Các ví dụ sinh học được cung cấp ở đây là để minh họa hoạt động nhảy Exon của ASO SNAP25 làm ví dụ cho hợp chất của Công thức I, và do đó không nên diễn giải để giới hạn phạm vi của sáng chế này đối với ASO SNAP25.

SNAP25 Ví dụ 1. Nhảy Exon trong các tế bào PC12 được xử lý bằng "SNAP-ASO 3".

"SNAP-ASO 3" được chỉ rõ trong Bảng 9 là ASO 14-mer bổ sung đầy đủ cho trình tự 14-mer trong vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của "intron 6" và "exon 7" trong tiền ARN thông tin SNAP25 ở người. "SNAP-ASO 3" chồng lấp bổ sung với trình tự tiền ARN thông tin 14-mer như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin 30-mer của [(5' → 3') cucuuugg**aucccg** | **GGUAACAA**AUGAUGC]. "SNAP-ASO 3" có một chồng lấp 7 me với "intron 6" và một chồng lấp 7 me khác với "exon 7".

"SNAP-ASO 3" được đánh giá về khả năng của nó để tạo ra nhảy exon trong các tế bào PC12 (Cat. Số CRL-1721, ATCC), mặc dù "SNAP-ASO 3" có một sự không phù hợp duy nhất với vị trí cắt nối 3' của "exon 7" trong tiền ARN

thông tin SNAP25 của chuột đọc từ ADN bộ gen của chuột [được truy cập từ Trình tự tham chiếu NCBI: NC_005012]. ASO 14-mer có một chồng lắp bổ sung 13-mer với tiền ARN thông tin SNAP25 ở chuột như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin 25-mer của [(5' → 3') ugg"cg"ucccag | GGUAACAAACGAUGC], trong đó sự không phù hợp duy nhất được đánh dấu bằng dấu ngoặc kép (" ").

[Nuôi cấy tế bào & Điều trị ASO] Các tế bào PC12 đã được duy trì trong môi trường nuôi cấy RPMI 1640 bổ sung 5% FBS, 10% huyết thanh ngựa, 1% streptomycin/penicillin, 1% L-glutamin, và 1% natri pyruvat dưới khí quyển 5% CO₂ tại 37°C. Các tế bào được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường nuôi cấy 5 mL được xử lý bằng "SNAP-ASO 3" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM.

[Trích xuất ARN & Tổng hợp cADN bằng PCR một bước] Sau khi ủ với "SNAP-ASO 3" trong 42 giờ, các tế bào được xử lý với 100 µg/mL cycloheximide trong 6 giờ nữa để đóng băng dịch mã ribosome. Sau đó, toàn bộ ARN đã được trích xuất bằng cách sử dụng Bộ kit chiết tách ARN phổ quát (Cat. Số 9767, Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 200 ng mẫu ARN trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 µL bằng cách sử dụng bộ kit phương pháp RT-PCR một bước Super Script® với polymeraza Taq Platinum® (Cat. Số 10928-042, Invitrogen) với một bộ mỗi đặc hiệu exon của [SNAP-exon 1_xuôi: (5' → 3') ATGGCCGAGGACGCAGACA; và SNAP-exon 14_ngược: (5' → 3') AGCATCTTT-GTTGCACGTTG] theo các điều kiện chu kỳ sau: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, sau đó là 40 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 50°C và 1 phút ở 72°C.

[Khuếch đại PCR lồng] 1 µL cADN trải qua phản ứng PCR lồng 20 µL (Cat. Số K2612, Bioneer) với một bộ mỗi đặc hiệu exon của [SNAP-exon 1_xuôi: (5' → 3') ATGGCCGAGGACGCAGACA; SNAP-exon 14n_ngược: (5' → 3') TTGTTGGAGTCAGCGCCT] theo các điều kiện chu kỳ sau: 95°C trong 2 phút tiếp theo 34 chu kỳ 30 giây ở 95°C, 30 giây ở 55°C và 1 phút tại 72°C.

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

Hình 48A cung cấp dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR, trong đó mẫu xử lý ASO 10 zM mang lại một dải PCR mờ có thể gán cho việc nhảy Exon 5-7 (xem sơ đồ bên trái). Ngay cả khi các tế bào được xử lý bằng cycloheximide để làm mất ổn định ARN thông tin đủ độ dài bằng cách đóng băng dịch mã ribosome, dải nhảy Exon chỉ được phát hiện mờ nhạt. Do đó, biến thể cắt nối ARN thông tin SNAP25 có thể gán cho việc nhảy Exon 5-7 có khả năng cho thấy sự ổn định trao đổi chất kém trong các tế bào so với ARN thông tin đủ độ dài. Sản phẩm PCR nhảy Exon được giải trình tự là nhảy Exon (5-7) như trong Hình 48A. (xem sơ đồ bên phải) Cho rằng sản phẩm PCR có thể gán cho việc nhảy Exon 6 đã được quan sát bất kể nồng độ ASO, việc nhảy Exon 6 được coi là xảy ra tự phát.

Cường độ của ARN thông tin SNAP25 đủ độ dài giảm nhiều nhất trong các tế bào được xử lý với 10 zM "SNAP-ASO 3". Cường độ ARN thông tin đủ độ dài tăng dần đến mức của đối chứng âm (nghĩa là không xử lý ASO), khi nồng độ ASO đã tăng từ 10 đến 1.000 zM. Mẫu phản ứng liều đảo ngược trong dữ liệu PCR lỏng có thể là do sự điều hòa tăng phiên mã bởi "ARN vòng tròn exon intron (EiciARN)" được tích lũy trong quá trình nhảy Exon với "SNAP- ASO 3". [Nature Struc. Mol. Biol. vol 22 (3), 256-264 (2015)]

SNAP25 Ví dụ 2. Phương pháp qPCR đối với ARN thông tin SNAP25 trong các tế bào PC12 được xử lý bằng "SNAP-ASO 3".

"SNAP-ASO 3" được đánh giá bằng qPCR lỏng SNAP25 đối với khả năng của nó để tạo ra những thay đổi về nồng độ ARN thông tin SNAP25 ở chuột trong các tế bào PC12 như sau.

[Nuôi cấy tế bào & điều trị ASO] Các tế bào PC12 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường nuôi cấy 5 mL được xử lý bằng "SNAP-ASO 3" ở 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 zM. (2 đĩa cho mỗi nồng độ ASO)

[Trích xuất ARN & Tổng hợp cADN bằng phương pháp RT-PCR một bước] Sau khi ủ với "SNAP-ASO 3" trong 42 giờ, các tế bào được xử lý 100

µg/mL xycloheximit trong 6 giờ nữa để đóng băng dịch mã ribosome. Sau đó, toàn bộ ARN được chiết xuất từ các tế bào bằng cách sử dụng Bộ kit tách chiết ARN phổ quát (Cat. Số 9767, Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu ARN 200 ng trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 µL bằng cách sử dụng bộ kit phương pháp RT-PCR một bước (Invitrogen, Hoa Kỳ) với một bộ các môi đặc hiệu exon của [SNAP-exon 1_xuôi: (5' → 3') ATGGCCGAGGACGCACA; và SNAP-exon 14_ngược: (5' → 3') AGCATCTTTGTTGCACGTTG] theo các điều kiện chu kỳ sau: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, sau đó là 20 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 55°C và 1 phút ở 72°C.

[Khuếch đại qPCR lồng] 1 µL của mỗi dung dịch cADN được pha loãng 100 lần trải qua phản ứng PCR thời gian thực 20 µL với một tập hợp các môi đặc hiệu exon của [SNAP-exon 7q_xuôi: (5' → 3') ATGGATGAAAACCTAGAGC; và SNAP-exon 8q_ngược: (5' → 3') CTTCCCAGCATCTTTGTT] theo các điều kiện chu kỳ sau: 95°C trong 3 phút sau đó là 40 chu kỳ 10 giây ở 95°C và 30 giây ở 60 °C. Phản ứng qPCR được theo dõi với đầu dò Taqman của [(5' → 3') 5,6-FAM-CAGCCTTCT-ZEN-CCATGATCCT-3IABkFQ] nhắm mục tiêu vào điểm nối của exon 7 và exon 8 để định lượng ARN thông tin SNAP25 đủ độ dài.

Hình 48B cung cấp dữ liệu qPCR, trong đó mức ARN thông tin có đủ độ dài giảm đáng kể (kiểm định t của sinh viên) trong các tế bào được xử lý với "SNAP-ASO 3" ở mức 10 zM và 100 zM tương ứng khoảng 50% và 20%. Tuy nhiên, mức độ ARN thông tin đủ độ dài trong các tế bào được xử lý bằng 1.000 zM " SNAP-ASO 3" cao hơn một chút so với mức độ của các tế bào không được xử lý ASO (nghĩa là đối chứng âm).

Mẫu phản ứng liệu đảo ngược của dữ liệu qPCR tương đối phù hợp với mẫu phản ứng liệu của mức ARN thông tin có đủ độ dài trong quá trình nhảy Exon được mô tả trong "SNAP25 Ví dụ 1", cho thấy việc điều hòa tăng phiên mã khi liều ASO tăng từ 10 đến 1.000 zM. Do đó, một chồng lấp bổ sung 13 me với tiền ARN thông tin SNAP25 của chuột sẽ không đủ để đánh bại sự điều hòa tăng phiên mã gây ra bởi (các) ElciARN tích lũy trong quá trình nhảy Exon.

SNAP25 Ví dụ 3. Phương pháp qPCR cho ARN thông tin SNAP25 trong các tế bào PC12 được xử lý bằng "SNAP-ASO 1".

"SNAP-ASO 1" được chỉ rõ trong Bảng 8 là ASO 16 me hoàn toàn bổ sung cho trình tự 16 me của vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 6 và exon 7 trong tiền ARN thông tin SNAP25 ở người. "SNAP-ASO 1" chồng lấp bổ sung với trình tự mục tiêu 16-mer như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin 30-mer ở người của [(5' → 3') cucuuuggaucccag | GGUAACAAAGAUGC]. "SNAP-ASO 1" có một chồng lấp 6 me với intron 6 và một chồng lấp 10 me với exon 7. Tuy nhiên, ASO có một sự không phù hợp duy nhất với tiền ARN thông tin SNAP25 ở chuột như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin 25-mer của [(5' → 3') uggcucccag | GGUAACAAA"C"GAUGC], trong đó với một sự không phù hợp duy nhất được đánh dấu bằng dấu ngoặc kép (" ").

"SNAP-ASO 1" được đánh giá bằng qPCR lồng SNAP25 về khả năng của nó để tạo ra những thay đổi về mức độ ARN thông tin SNAP25 ở chuột trong các tế bào PC12 như được mô tả trong "SNAP25 Ví dụ 2", trừ khi có ghi chú khác.

Hình 48C cung cấp dữ liệu qPCR, trong đó mức ARN thông tin có đủ độ dài giảm đáng kể (thử nghiệm t của sinh viên) trong các tế bào được xử lý với "SNAP-ASO 1" ở 10 zM, 100 zM và 1.000 zM khoảng 50%, 40% và 70%, tương ứng.

Giống như trong trường hợp "SNAP-ASO 3", mẫu phản ứng liều ngược được sao chép một phần với "SNAP-ASO 1" khi liều được tăng từ 10 đến 100 zM. Do mức ARN thông tin đủ độ dài giảm hơn nữa khi nồng độ ASO tăng lên 1.000 zM, tuy nhiên, hiệu quả nhảy Exon của "SNAP-ASO 1" dường như mạnh hơn so với "SNAP-ASO 3". Một chồng lấp bổ sung 15 me của "SNAP-ASO 1" với tiền ARN thông tin của chuột sẽ chịu trách nhiệm cho hiệu quả nhảy Exon cao hơn này.

SNAP25 Ví dụ 4. Ước chế biểu hiện protein SNAP25 trong các tế bào PC12 bằng "SNAP-ASO 3".

"SNAP-ASO 3" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế sự biểu hiện của protein SNAP25 trong các tế bào PC12 như sau.

Các tế bào PC12 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường nuôi cấy 5 mL và được xử lý bằng "SNAP-ASO 3" ở 0 zM (đối chứng âm), 1 zM, 10 zM, 30 zM, 100 zM, 300 zM, 1 aM, 3 aM hoặc 10 aM trong 48 giờ. Có 4 đĩa nuôi cấy của đối chứng âm để bù đắp cho các yếu tố giả kỹ thuật tiềm tàng trong phân tích western blot.

[Ly giải tế bào] Sau đó, các tế bào được phân giải trên đá với 200 μ L 1 lần dung dịch đệm RIPA (Cat. Number 9806, Cell Signaling Tech) bổ sung 1% SDS và 1 lần dung dịch chất ức chế proteinaza (cOmplete Mini, Roche). Các dịch phân giải được thu thập trong ống điện tử dung tích 1,5 ml, trộn với dung dịch đệm mẫu 100 μ L 5 lần và đun sôi trong 5 phút.

[Western blot] Các dịch phân giải đã được phân tách điện di trên gel gradient 4-15% TGX-PAGE (Cat. Số 456-1086, Bio-Rad) và sau đó được chuyển vào màng PVDF 0,45 μ m. Màng này được thăm dò với một kháng thể kháng SNAP25 (Cat. Số S9684, Sigma) và một kháng thể kháng β -actin (Cat. Số A3845, Sigma).

Hình 49A cung cấp dữ liệu Western blot SNAP25 thu được với các dịch phân giải tế bào PC12 (sơ đồ trên cùng) cùng với các mức độ biểu hiện SNAP25 tương đối được chuẩn hóa so với β -actin bằng phép đo mật độ (sơ đồ dưới cùng). Mức protein SNAP25 giảm từ 10 đến 60% trong các tế bào được điều trị bằng "SNAP-ASO 3". Mức biểu hiện của đối chứng âm (nghĩa là 0 zM "SNAP-ASO 3") là mức biểu hiện trung bình của 4 mẫu.

SNAP25 Ví dụ 5. Ức chế biểu hiện protein SNAP25 trong các tế bào PC12 bằng "SNAP-ASO 1"

"SNAP-ASO 1" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế biểu hiện protein SNAP25 trong các tế bào PC12 như được mô tả trong "SNAP25 Ví dụ 4", trừ khi có ghi chú khác. Các tế bào PC12 được xử lý bằng "SNAP-ASO 1" ở mức 0 (đối chứng âm), 100 hoặc 1.000 zM trong 48 giờ hoặc trong 72 giờ. (Một đĩa nuôi cấy cho mỗi nồng độ ASO)

Hình 49B cung cấp dữ liệu Western blot cho điều trị ASO 48 giờ (trái) và 72 giờ (phải). "SNAP-ASO 1" đã ức chế đáng kể sự biểu hiện của protein SNAP25 trong các tế bào PC12 ở cả hai thời điểm.

SNAP25 Ví dụ 6. Ức chế biểu hiện protein SNAP25 trong tế bào SiMa bằng "SNAP-ASO 3".

"SNAP-ASO 3" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế sự biểu hiện của protein SNAP25 trong các tế bào u nguyên bào thần kinh SiMa ở người như sau.

[Nuôi cấy tế bào và điều trị ASO] Các tế bào SiMa (Cat. Số ACC164, DSMZ) được duy trì trong môi trường RPMI 1640 bổ sung 10% FBS, 1% streptomycin/penicillin, 1% L-glutamin và 1% natri pyruvat dưới không khí 5% CO₂ ở 37°C. Các tế bào SiMa được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường nuôi cấy 5 ml và được xử lý trong 48 giờ với "SNAP-ASO 3" ở 0 zM (đối chứng âm), 1 zM đến 100 aM. Có 3 đĩa nuôi cấy cho đối chứng âm để bù đắp cho các yếu tố giả kỹ thuật tiềm tàng trong phân tích western blot.

[Ly giải] Các tế bào đã được ly giải trên đá với dung dịch đệm RIPA 200 µL (Cat. Số 9806, Công nghệ tín hiệu tế bào) được bổ sung với 0,1% SDS và dung dịch ức chế protein 1 lần (cOmplete Mini, Roche). Sau đó, các dịch phân giải được thu thập trong ống điện tử dung tích 1,5 ml, trộn với dung dịch đệm mẫu 100 µL 5 lần và đun sôi trong 5 phút.

[Western blot] Các dịch phân giải đã được phân tách điện di trên gel 12% SDS-PAGE và được chuyển vào màng polyvinyliden diflorua (PVDF) 0,2 µm. Màng này đã được thăm dò với một kháng thể kháng SNAP25 (Cat. Số ab41455, Sigma) và một kháng thể kháng β-actin (Cat. Số A3845, Sigma).

Hình 50A cung cấp dữ liệu Western blot SNAP25 thu được với các dịch phân giải tế bào SiMa (sơ đồ trên cùng) cùng với mức độ biểu hiện SNAP25 tương đối được chuẩn hóa so với β-actin bằng phép đo mật độ (sơ đồ dưới cùng). Mức protein SNAP25 giảm từ 40 đến 50% trong các tế bào được điều trị bằng "SNAP-ASO 3".

SNAP25 Ví dụ 7. Phương pháp qPCR cho ARN thông tin SNAP25 trong các tế bào SiMa được xử lý bằng "SNAP-ASO 3".

"SNAP-ASO 3" được đánh giá bằng qPCR lồng SNAP25 về khả năng của nó để tạo ra những thay đổi về mức độ ARN thông tin SNAP25 ở người trong các tế bào SiMa như sau.

[Nuôi cấy tế bào & điều trị ASO] Các tế bào SiMa được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường nuôi cấy 5 mL và được xử lý bằng "SNAP-ASO 3" ở 0 zM (đối chứng âm), 1 zM, 10 zM, 100 zM hoặc 1 aM, 10 aM hoặc 100 aM. (2 đĩa cho mỗi nồng độ ASO)

[Trích xuất ARN & Tổng hợp cADN] Toàn bộ ARN được chiết xuất từ các tế bào bằng cách sử dụng "RNeasy Mini Kit" (Cat. Số 74106, Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 200 ng của mẫu ARN trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 µl bằng cách sử dụng bộ Kit tổng hợp cADN sợi PrimeScript 1st (Cat. No. 6110B, Takara) với các đoạn môi ngẫu nhiên.

[Khuếch đại qPCR] Các phản ứng PCR được theo dõi bằng đầu dò Taqman [(5' → 3') 56-FAM-CGGCTTCAT-ZEN-CCGCAGGGTAACAA-3IABkFQ] nhằm mục tiêu vào điểm nối của exon 6 và exon 7 với một bộ môi đặc hiệu exon [SNAP-exon 6_xuôi: (5' → 3') GACGAACGGGAGCAGATG; và SNAP-exon 8_ngược (2): (5' → 3') ATCTCATTGCCC-ATATCCAGG]. Điều kiện chu kỳ: 95°C trong 3 phút tiếp theo 40 chu kỳ 15 giây ở 95°C và 30 giây ở 60°C.

Hình 50B cung cấp dữ liệu qPCR, trong đó mức độ ARN thông tin SNAP25 đủ độ dài ở người giảm đáng kể (kiểm định t của sinh viên) trong các tế bào được xử lý bằng "SNAP-ASO 3" ở 1 zM, 100 zM, 1 aM và 100 aM từ 20 đến 40%. Các tế bào được điều trị bằng ASO ở 100 aM cho thấy sự ức chế mạnh nhất 40%.

SNAP25 Ví dụ 8. Ức chế biểu hiện protein SNAP25 trên da chuột được tiêm tại chỗ với "SNAP-ASO 1".

"SNAP-ASO 1" là một ASO 16 me hoàn toàn bổ sung cho vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 6 và exon 7 trong tiền ARN thông tin SNAP25 ở chuột đọc từ ADN bộ gen của chuột [được truy cập từ trình tự tham khảo NCBI:

NC_000068]. "SNAP-ASO 1" được đánh giá về khả năng ức chế sự biểu hiện của protein SNAP25 trên da khi sử dụng tại chỗ như sau.

[Cắt lông và phân nhóm] Vào ngày 0, 8 con chuột cái C57BL/6 (5 tuần tuổi) đã được gây mê bằng zoletil/rompun, và lông ở lưng (khoảng 3 cm x 4 cm) đã được cắt bằng kẹp. Những con chuột được phân ngẫu nhiên thành 4 nhóm, tức là không có nhóm điều trị ASO (đối chứng âm) và 3 nhóm điều trị 1 fM, 10 fM và 100 fM "SNAP-ASO 1". (2 con mỗi nhóm)

[Tiêm tại chỗ] Các dung dịch dùng tại chỗ đã được chuẩn bị bằng cách pha loãng lần lượt dung dịch gốc nước của "SNAP-ASO 1" trong 30% (theo thể tích) ethanol trong nước được bổ sung 3% (theo thể tích) glyxerin thành 0, 1, 10 và 100 fM "SNAP-ASO 1". Mỗi con chuột được tiêm tại chỗ với khoảng 100 μ L dung dịch tại chỗ ở da lưng đã tẩy lông bằng cách sử dụng một quả bóng bông hai lần mỗi ngày trong các ngày từ 0 đến 4.

[Lấy mẫu da] Vào chiều ngày 4, các con chuột được gây mê bằng zoletil/rompun để lấy mẫu phần da được xử lý tại chỗ bằng ASO. Các mẫu da sau đó được IHC với protein SNAP25 như được mô tả dưới đây.

[IHC SNAP25] Các mẫu da được cắt cryo và nhuộm miễn dịch một loạt với kháng thể kháng SNAP25 đầu tiên (Cat. Number ab41455, Abcam) ở độ pha loãng 1:200, với kháng thể kháng IgG thứ hai (Cat Number BA-1100, Vector) ở độ pha loãng 1:200 dilution và sau đó với Dylight 594-steptavidin (Cat Number SA-5594, Vector, CA, USA) ở độ pha loãng 1: 200 để gắn thể huỳnh quang màu đỏ. Kháng thể kháng SNAP25 thăm dò đầu C của protein SNAP25. Hình ảnh IHC được chụp trên máy quét slide Zeiss để đánh giá biểu hiện của protein SANP25. Nhuộm DAPI được thực hiện để hình dung cấu trúc vi mô của da.

Hình 51 cung cấp một bộ ảnh đại diện IHC SNAP25 theo nhóm. Trong nhóm đối chứng âm tính, biểu hiện protein SNAP25 cao ở lớp cơ ngay bên dưới lớp hạ bì. Biểu hiện protein SNAP25 trong lớp cơ được coi là bắt nguồn từ biểu hiện protein SNAP25 trong các sợi trục thần kinh vận động được nhúng trong lớp cơ. Các biểu hiện protein SNAP25 trong lớp cơ bắt giảm dần dần khi liều được tăng lên. Sự giảm đáng chú ý nhất được quan sát thấy trong nhóm điều trị 100 fM.

Sự ức chế biểu hiện protein SNAP25 đầy đủ độ dài ở da bởi IHC dường như mạnh hơn sự ức chế bởi Western blot quan sát được trong các tế bào PC12 (xem "SNAP25 Ví dụ 5"). Sự điều hòa tăng sao chép bởi (các) EiciARN trong các tế bào sơ cấp, nếu có, dường như không được đánh dấu bằng sự điều hòa lên liên quan đến các tế bào ung thư bao gồm các tế bào PC12 và SiMa.

Ví dụ cho hoạt tính in vitro của các ASO TYR

Tyrosinaza (TYR) là một enzyme liên quan đến sự hình thành hắc tố hoặc sắc tố da. Các dẫn xuất APN của Công thức I trong Bảng 10 được thiết kế để nhắm bổ sung vào vị trí cắt nối 3' của exon 2 trong tiền ARN thông tin TYR ở người hoặc chuột. ASO TYR được đánh giá về hoạt tính nhảy Exon antisense TYR trong các tế bào hắc tố ở người cũng như trong các tế bào B16F10 (u ác tính ở chuột). Các ví dụ sinh học được cung cấp ở đây là để minh họa hoạt tính nhảy Exon của ASO TYR làm ví dụ cho hợp chất của Công thức I, và do đó không nên diễn giải để giới hạn phạm vi của sáng chế này đối với ASO TYR.

TYR Ví dụ 1. Nhảy Exon gây ra bởi "TYR-ASO 4" trong các tế bào B16F10.

"TYR-ASO 4" được chỉ rõ trong Bảng 10 là ASO TYR 13 me bổ sung đầy đủ cho vị trí cắt nối 3' kéo dài qua đường nối của intron 1 và exon 2 trong TYR ở chuột như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin TYR 30 me ở chuột của [(5' → 3') aauuguuuuucacag | AUCAUUUGUAGCAGA]. Trong khi đó, "TYR-ASO 4" có 4 sự không khớp với vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 1 và exon 2 trong tiền ARN thông tin TYR ở người như được đánh dấu bằng dấu ngoặc kép (" ") trong trình tự tiền ARN thông tin 30 me của [(5' → 3') ggguguuuug"u"acag | AU"UG"U"C"UGUAGCCGA].

"TYR-ASO 4" được đánh giá về khả năng của nó để tạo ra sự nhảy của exon 2 TYR ở chuột trong các tế bào khối u ác tính B16F10 như sau. "TYR-ASO 4" có thể đóng vai trò là hợp chất thay thế tốt cho "TYR-ASO 1", bổ sung đầy đủ cho tiền ARN thông tin TYR ở người.

[Nuôi cấy tế bào & Điều trị ASO] Các tế bào u ác tính ở chuột B16F10 (Cat. Số CRL-6485, ATCC) được duy trì trong DMEM (môi trường tối thiểu cần thiết Eagle của Dulbecco) được bổ sung 10% FBS, 1% streptomycin/penicillin và 0,01 mg/ml insulin bò. Các tế bào B16F10 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa 5 mL DMEM được ủ trong 5 giờ với "TYR-ASO 4" ở 0 (đối chứng âm), 1, 10, 100 hoặc 1000 aM.

[Trích xuất ARN & Tổng hợp cADN bằng phương pháp PCR một bước] Toàn bộ ARN được chiết xuất bằng cách sử dụng Bộ Kit tách chiết ARN phổ quát (Cat. Số 9767, Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu ARN 200 ng đã được sử dụng cho phản ứng phiên mã ngược 25 μ L bằng cách sử dụng bộ kit phương pháp RT-PCR một bước Super Script[®] với polymeraza Taq Platinum[®] (Cat. Số 10928-042, Invitrogen) với một bộ môi đặc hiệu exon của [TYR-exon 1_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') GTAAGTTTGGATTTGGGG; và TYR-exon 4_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') AGAGCGGTATGAAAGGAA] theo các điều kiện chu trình sau: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, sau đó là 15 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 52°C và 40 giây ở 72°C.

[Khuếch đại PCR lồng] 1 μ L cADN đã được khuếch đại hơn nữa trong phản ứng PCR lồng 20 μ L (Cat. Số K2612, Người tiên phong) với một bộ môi đặc hiệu exon của [TYR-exon 1n_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') GAGAACTAACTGGGGATGA; và TYR-exon 4n_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') CGATAGGTGCATTGGCTT] theo các điều kiện chu kỳ phát triển: 95°C trong 5 phút sau đó là 30 chu kỳ 30 giây ở 95°C, 30 giây ở 52°C và 40 giây ở 72°C.

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

Hình 52A cung cấp dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR. Các tế bào không được xử lý ASO mang lại hai dải PCR, một cho ARN thông tin TYR đủ độ dài và một cho biến thể ARN thông tin TYR không có exon 2 và 3, cho thấy việc nhảy các exon tự phát 2-3. Tuy nhiên, các tế bào được xử lý với "TYR-ASO 4" ở mức 1 đến 1.000 aM, về cơ bản chỉ mang lại biến thể cắt nối ARN thông tin TYR thiếu

exon 2 và 3. Do đó, "TYR-ASO 4" làm tăng xu hướng nhảy Exon 2-3 trong các tế bào u ác tính B16F10.

Sản phẩm PCR cho nhảy Exon được giải trình tự là biến thể cắt nối ARN thông tin thiếu exon 2-3 như trong Hình 52B.

TYR Ví dụ 2. Phương pháp qPCR cho ARN thông tin TYR trong các tế bào B16F10 được xử lý bằng "TYR-ASO 4".

"TYR-ASO 4" được đánh giá bằng qPCR lồng TYR về khả năng của nó để tạo ra những thay đổi ở mức độ ARN thông tin TYR ở chuột trong các tế bào B16F10 như sau.

[Nuôi cấy tế bào & xử lý ASO] Các tế bào B16F10 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường nuôi cấy 5 mL được xử lý bằng "TYR-ASO 4" ở 0 (đối chứng âm), 1, 10, 100 hoặc 1000 aM. (2 đĩa mỗi liều)

[Trích xuất ARN & Tổng hợp cADN bằng PCR một bước] Toàn bộ ARN được chiết xuất và trải qua tổng hợp cADN như được mô tả trong "Ví dụ TYR 1".

[Khuếch đại qPCR lồng] 1 μ L của mỗi dung dịch cADN được pha loãng 100 lần trải qua phản ứng PCR thời gian thực 20 μ L với đầu dò Taqman nhắm mục tiêu vào điểm nối của exon 2 và exon 3 (Cat. Số Mm00495818_m1, Thermo Fisher Scientific) theo các điều kiện chu trình sau: 95°C trong 3 phút tiếp theo 30 chu kỳ 10 giây ở 95°C và 30 giây ở 60°C.

[Phân tích thống kê] Thí nghiệm qPCR lồng được lặp lại độc lập bốn lần và các mức ARN thông tin riêng lẻ từ mỗi thí nghiệm được chuẩn hóa theo mức ARN thông tin mà không xử lý ASO. Các mức ARN thông tin thu được từ tất cả 4 thí nghiệm riêng biệt được gộp lại để phân tích thống kê bằng kiểm định t của sinh viên. Do đó, số lượng mẫu ARN là 8 trên mỗi nồng độ ASO.

Hình 52C cung cấp dữ liệu qPCR được gộp lại, trong đó mức ARN thông tin có đủ độ dài giảm đáng kể (kiểm định t của sinh viên) khoảng 40% trong các tế bào được xử lý bằng "TYR-ASO 4" ở mức 1 đến 1.000 aM.

TYR Ví dụ 3. Ức chế biểu hiện protein TYR bằng "TYR-ASO 4" trong các tế bào B16F10.

"TYR-ASO 4" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế sự biểu hiện của protein TYR trong các tế bào B16F10 như được mô tả dưới đây.

Các tế bào B16F10 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường nuôi cấy 5 mL được xử lý bằng "TYR-ASO 4" trong 24 giờ ở 0 zM (đối chứng âm), 10 zM, 100 zM, 1 aM hoặc 10 aM và được ly giải với dung dịch đệm ly giải tế bào 200 μ L 1 lần (Cat. Số 9803, Công nghệ tín hiệu tế bào) bổ sung dung dịch ức chế proteaza 1 lần (Cat. Số P8340, Sigma). 200 μ L mỗi dịch phân giải được trộn với dung dịch đệm mẫu 100 μ L 5 lần và đun sôi ở 100°C trong 5 phút. 20 μ L của mỗi dịch phân giải đã được phân tách điện di trên gel TGX gradient 4-15% (Cat số 456-1086, Bio-Rad) và chuyển protein vào màng PVDF 0,45 μ m. Màng này được thăm dò với một kháng thể kháng TYR (Cat. Số 9319, Công nghệ tín hiệu tế bào) và một kháng thể kháng β -actin (Cat. Số a3845, Sigma).

Hình 53A cung cấp dữ liệu Western blot TYR thu được với các dịch phân giải tế bào B16F10. Mức protein TYR cao hơn đáng kể trong các dung dịch đối chứng âm so với các dịch phân giải của các tế bào được xử lý bằng "TYR-ASO 4".

TYR Ví dụ 4. Ức chế sự hình thành hắc tố bằng "TYR-ASO 4" trong các tế bào B16F10.

"TYR-ASO 4" được đánh giá về khả năng của nó để ức chế sự hình thành hắc tố trong các tế bào B16F10 như được mô tả dưới đây.

Các tế bào B16F10 được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường nuôi cấy 5 mL được xử lý bằng "TYR-ASO 4" ở 0 (đối chứng âm) hoặc 1 đến 1.000 aM, hoặc với arbutin 10 hoặc 100 μ g/mL làm đối chứng dương. (2 đĩa nuôi cấy mỗi liều) 24 giờ sau đó, các tế bào được ly giải với 200 μ L NaOH 1N. Mỗi dịch phân giải được thu thập trong ống điện tử dung tích 1,5 ml và được giữ qua đêm ở nhiệt độ phòng. Hàm lượng melanin trong mỗi dịch phân giải được xác định bằng độ hấp thụ ở bước sóng 475nm trên máy đọc ELISA. Thí nghiệm được lặp lại bốn lần bằng cách sử dụng các tế bào ở các đoạn khác nhau. Bốn bộ dữ liệu hàm lượng melanin được gộp lại để phân tích thống kê bằng xét nghiệm t của sinh viên đối với hàm lượng melanin mà không điều trị (đối chứng âm).

Hình 53B tóm tắt những thay đổi về hàm lượng melanin trong các tế bào B16F10 sau khi ủ 24 giờ với "TYR ASO 4" hoặc với arbutin. Hàm lượng melanin giảm đáng kể khoảng 15% và 25% trong các tế bào được điều trị với 10 µg/mL và 100 µg/mL arbutin, tương ứng. Trong trường hợp các tế bào được điều trị bằng "TYR-ASO 4", hàm lượng melanin giảm đáng kể khoảng 15% mà không phụ thuộc nhiều vào liều. Hoạt tính ức chế của "TYR-ASO 4" tương đương với hoạt tính của 10 µg/mL arbutin.

TYR Ví dụ 5. Phương pháp qPCR cho ARN thông tin TYR trong tế bào hắc tố ở người được điều trị bằng "TYR-ASO 1".

"TYR-ASO 1" được chỉ rõ trong Bảng 10 là ASO TYR 13 me bổ sung đầy đủ cho vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 1 và exon 2 trong TYR ở người như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự ARN thông tin TYR ở người của [(5' → 3') ggguguuuguacag | AUUGUCUGUAGCCGA].

"TYR-ASO 1" được đánh giá bằng qPCR lồng TYR về khả năng của nó để tạo ra những thay đổi về mức độ ARN thông tin TYR trong các tế bào hắc tố biểu bì nguyên phát ở người như sau.

[Nuôi cấy tế bào & Điều trị ASO] Các tế bào hắc tố biểu bì nguyên phát (Cat. Số PCS-200-013, ATCC) được duy trì trong Môi trường cơ sở tế bào Dermal (Cat Number PCS-200-030, ATCC) được bổ sung Thành phần Bộ Kit tăng trưởng tế bào hắc tố trưởng thành (Cat Số PCS-200-042, ATCC). Các tế bào hắc tố được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường nuôi cấy 5 mL được xử lý bằng "TYR-ASO 1" ở 0 zM (đối chứng âm), 1 zM, 100 zM hoặc 10 aM. (3 đĩa cho mỗi nồng độ)

[Trích xuất ARN & Tổng hợp cADN bằng phương pháp PCR một bước] Sau khi ủ với "TYR-ASO 1" trong 5 giờ, toàn bộ ARN đã được trích xuất bằng cách sử dụng RNeasy Mini Kit (Cat. Số 74106, Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu ARN 200 ng trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 µL bằng cách sử dụng bộ kit phương pháp RT-PCR một bước Super Script® với polymeraza Taq Platinum® (Cat. Số 10928-042, Invitrogen) với một bộ môi đặc hiệu exon của [TYR-exon 1_xuôi(2): (5' → 3') CTCTTTGTCTGGATGCATT; và TYR-

exon 5_ngược: (5' → 3') CTGTGGTAATCCTCTTTCT] theo các điều kiện chu kỳ sau được chỉ định: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, sau đó là 15 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 50°C và 1 phút ở 72°C.

[Khuếch đại PCR lồng] 1 µL cADN được khuếch đại hơn nữa trong phản ứng PCR lồng 20 µL (Cat. Số K2612, Người tiên phong) với một bộ môi đặc hiệu exon của [TYR-exon 2n_xuôi: (5' → 3') GATAAAGCTGCCAATTTC; và TYR-exon 3n_ngược: (5' → 3') TTGTGCATGCTGCTTTGA] với đầu dò Taqman [(5' → 3') 5,6-FAM-CACTGG-ZEN-AAGGATTTGCTAGTCCAC-3IABkFQ]. Điều kiện chu kỳ: 95°C trong 3 phút tiếp theo 40 chu kỳ 10 giây ở 95°C và 30 giây ở 60°C.

Hình 53C cung cấp dữ liệu qPCR, trong đó mức ARN thông tin TYR đủ độ dài giảm khoảng 30% trong các tế bào hắc tố ở người được điều trị bằng "TYR-ASO 1" ở mức 1 zM xuống còn 10 aM. Sự giảm quan sát được có ý nghĩa (kiểm định t của sinh viên) trong các tế bào được xử lý bằng "TYR-ASO 1" ở mức 1 zM và 10 aM.

Ví dụ cho các hoạt tính sinh học của các ASO PD-1

PD-1, còn được gọi là protein chết tế bào được lập trình 1 hoặc CD279, là một thụ thể bề mặt tế bào biểu hiện trong các tế bào miễn dịch. PD-1 là một protein điểm kiểm tra miễn dịch liên quan đến việc điều chỉnh giảm phản ứng miễn dịch. Các kháng thể đơn dòng PD-1 như nivolumab và pembrolizumab đã được sử dụng để điều trị khối u rắn bằng cách tăng đáp ứng miễn dịch.

Các ASO PD-1 của Công thức I trong Bảng 11 được thiết kế để nhắm bổ sung vào vị trí cắt nối 3' hoặc vị trí cắt nối 5' của exon 2 trong tiền ARN thông tin PD-1 ở người hoặc chuột. Các ASO PD-1 đã được đánh giá về hoạt tính nhảy Exon antisense trong các tế bào Jurkat, và cũng về hoạt tính chống ung thư ở chuột hoang dã có khối u tổng hợp. Các ví dụ sinh học được cung cấp ở đây là để minh họa hoạt tính nhảy Exon của các ASO PD-1 như các ví dụ cho hợp chất của Công thức I, và do đó không nên diễn giải để giới hạn phạm vi của sáng chế này đối với các ASO PD-1.

PD-1 Ví dụ 1. Nhảy Exon gây ra bởi "PD-ASO 3" trong các Tế bào Jurkat.

"PD-ASO 3" được chỉ rõ trong Bảng 11 là ASO PD-1 14 me bổ sung đầy đủ cho vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 2 và intron 2 trong tiền ARN thông tin PD-1 ở người được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin PD-1 30 me ở người của [(5' → 3') AGCUCAGGGGUGACAG | gugcggccucggagg]. "PD-ASO 3" có một chồng lắp 9 me với exon 2 và một chồng lắp 5 me với intron 2.

"PD-ASO 3" được đánh giá về khả năng của nó để tạo ra sự nhảy của exon 2 PD-1 ở người trong các tế bào Jurkat như sau.

[Nuôi cấy tế bào & điều trị ASO] Các tế bào Jurkat (Cat. Số TIB-152, ATCC) được duy trì trong RPMI-1640 bổ sung 10% FBS và 1% streptomycin/penicillin. Các tế bào Jurkat được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm chứa môi trường nuôi cấy 5 mL được xử lý trong 5 giờ với "PD-ASO 5" ở mức 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 aM.

[Trích xuất ARN và Tổng hợp cADN bằng phương pháp RT-PCR một bước] Toàn bộ ARN được chiết xuất bằng bộ kit chuẩn bị mini ARNeasy (Qiagen, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu ARN 500 ng trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 µL sử dụng bộ kit phương pháp RT-PCR một bước (Invitrogen, Hoa Kỳ) với một bộ môi đặc hiệu exon [PD-exon 1_xuôi: (5' → 3') GTCGTCTGGGCGGTGCTCAAC; và PD-exon 5_ngược: (5' → 3') GGGTGTGGAA-ATAGATGGG]. Điều kiện chu kỳ: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 53°C và 1 phút ở 72°C.

[Khuếch đại PCR lồng] 1 µL cADN đã pha loãng 100 lần được khuếch đại thêm trong PCR lồng 20 µL (L (Invitrogen, Hoa Kỳ) bằng cách sử dụng các điều kiện chu kỳ sau: 20 giây ở 95°C, 30 giây ở 56°C và 40 giây ở 72°C trong 40 chu kỳ với một bộ môi đặc hiệu exon [PD-exon 1n_xuôi: (5' → 3') GGCTGGCGGCCAGGATGGTTC; và PD-exon 5n_ngược: (5' → 3') GAAAGACAATGGTGGCATACTCC].

[Nhận dạng sản phẩm nhảy Exon] Các sản phẩm PCR lồng được thiết kế đã được tách điện di trên gel agarosa 2%. Các dải có kích thước mục tiêu được thu thập và phân tích bởi phương pháp giải trình tự Sanger.

Hình 54A cung cấp dữ liệu điện di của các sản phẩm PCR. Các tế bào không được xử lý ASO chỉ mang lại dải sản phẩm PCR của ARN thông tin đủ độ dài. Trong khi đó, có ba dải sản phẩm PCR mới được hình thành trong các tế bào được xử lý bằng ASO PD-1. Trong ba dải sản phẩm PCR, dải có kích thước khoảng 470 bp (được đánh dấu là "không đặc hiệu" trong Hình 54A) không phải là biến thể cắt nối ARN thông tin PD-1 với nhảy exon theo phân tích giải trình tự Sanger.

Các tế bào được xử lý bằng "PD-ASO 3" ở mức 10 và 100 aM mang lại một dải sản phẩm PCR tương ứng với việc nhảy Exon 2 bằng cách giải trình tự Sanger. Tuy nhiên, trong các tế bào được xử lý bằng 1.000 aM "PD-ASO 3", sản phẩm PCR của nhảy exon 2 đã biến mất và mức ARN thông tin đủ độ dài là cao hơn mức đủ độ dài trong các tế bào được xử lý ở nồng độ ASO thấp hơn. Hai sản phẩm PCR được chỉ định cho nhảy Exon 2 và exon 3 đã được xác nhận bằng giải trình tự Sanger. (xem Hình 54B) Kiểu phản ứng liều ngược trong dữ liệu PCR lồng có thể là do sự điều hòa tăng phiên mã bởi "ARN vòng tròn exon intron (ElciARN)" được tích lũy trong quá trình nhảy Exon với "PD-ASO 3". [*Nature Struc. Mol. Biol.* vol 22 (3), 256-264 (2015)]

PD-1 Ví dụ 2. Phương pháp qPCR cho ARN thông tin PD-1 trong các tế bào Jurkat được xử lý bằng "PD-ASO 3".

"PD-ASO 3" được đánh giá bằng qPCR lồng PD-1 về khả năng của nó để tạo ra những thay đổi về mức độ ARN thông tin PD-1 ở người trong các tế bào Jurkat như sau.

[Nuôi cấy tế bào & Điều trị ASO] Các tế bào Jurkat được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm đã được kích hoạt bằng kháng thể kháng CD3 (Cat. Số 16-0037, eBioscience) ở mức 1 µg/mL và kháng thể kháng CD28 (Cat. Số 16-0289, eBioscience) ở mức 0,5 µg/mL trong 48 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy được

thay thế bằng môi trường mới và được xử lý bằng "PD-ASO 3" ở mức 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 aM trong 24 giờ. (4 đĩa cho mỗi nồng độ ASO)

[Trích xuất ARN và Tổng hợp cADN bằng phương pháp RT-PCR một bước] Toàn bộ ARN được chiết xuất bằng bộ kit chuẩn bị mini ARNeasy (Qiagen, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu ARN 500 ng trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 μ L bằng cách sử dụng bộ kit phương pháp RT-PCR một bước (Invitrogen, Hoa Kỳ) với một bộ mồi đặc hiệu exon [PD-exon 1_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') GTCGTCTGGGCGGTGGCTACAAC; và PD-exon 5_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') GGGTGTGGAA-ATAGATGGG]. Điều kiện chu kỳ: 50°C trong 30 phút và 94°C trong 2 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 53°C và 1 phút ở 72°C.

[Phương pháp qPCR lồng bằng SYBR] 1 μ L của mỗi dung dịch cADN đã pha loãng 100 lần trải qua khuếch đại qPCR lồng 20 μ L với một bộ mồi đặc hiệu exon [PD-exon 2_xuôi: (5' $\rightarrow$ 3') ACAACGCCACCTTCACCTGC; và PD-exon 2_ngược: (5' $\rightarrow$ 3') GCCAGCTTGTCCGTCTGGTTG] theo các điều kiện chu kỳ sau: 20 giây ở 95°C, 30 giây ở 56°C và 40 giây ở 72°C trong 40 chu kỳ. Phản ứng qPCR đã được thăm dò với SYBR (Bio-Rad, USA).

Hình 55A cung cấp dữ liệu qPCR, trong đó mức ARN thông tin PD-1 giảm đáng kể (kiểm định t của sinh viên) khoảng > 80% trong các tế bào được xử lý bằng "PD-ASO 3" ở mức 10 và 100 aM. Trong trường hợp các tế bào được xử lý bằng ASO ở mức 1.000 aM, mức ARN thông tin PD-1 đã tăng trở lại khoảng 55% mức đối chứng âm. Sự phục hồi của mức ARN thông tin ở mức 1.000 aM phù hợp với mô hình đáp ứng liều đảo ngược được quan sát thấy trong "PD-1 Ví dụ 1". (xem Hình 54A)

PD-1 Ví dụ 3. Phương pháp qPCR cho ARN thông tin IL-2 trong các tế bào Jurkat được xử lý bằng "PD-ASO 3".

Việc điều chỉnh giảm hoạt tính PD-1 đã được biết là điều chỉnh tăng mức biểu hiện của interleukin 2 (IL-2). [*Am. J. Lâm sàng. Oncol.*, 12(4), 480-489, 1990. Tập 39 (1), 98-106 (2016)] "PD-ASO 3" được đánh giá bằng qPCR lồng

IL-2 về khả năng của nó để tạo ra những thay đổi về mức độ ARN thông tin IL-2 ở người trong các tế bào Jurkat như sau.

[Nuôi cấy tế bào & Điều trị ASO] Các tế bào Jurkat được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 60 mm đã được kích hoạt bằng kháng thể kháng CD3 (Cat. Số 16-0037, eBioscience) ở mức 1 µg/mL và kháng thể kháng CD28 (Cat. Số 16-0289, eBioscience) ở mức 0,5 µg/mL trong 48 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy được thay thế bằng môi trường mới và được xử lý bằng "PD-ASO 3" ở mức 0 (đối chứng âm), 10, 100 hoặc 1.000 aM trong 24 giờ. (4 đĩa cho mỗi nồng độ ASO)

[Trích xuất ARN và tổng hợp cADN] Toàn bộ ARN được chiết xuất bằng bộ kit chuẩn bị mini RNeasy (Qiagen, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 500 ng của mẫu ARN được trải qua phản ứng phiên mã ngược 25 µl bằng cách sử dụng kit tổng hợp cADN sợi PrimeScript™ 1st kit (Takara, Nhật Bản) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

[Phương pháp qPCR bằng SYBR] 1 µL của mỗi dung dịch cADN được trải qua khuếch đại qPCR lỏng 20 µL với một bộ mồi nhắm mục tiêu vào ARN thông tin IL-2 [IL-2_xuôi: (5' → 3') GTCACAAACAGTGCACCTAC; và IL-2_Ngược: (5' → 3') GGTGAGTTTGGGATT-CTTGTA] theo các điều kiện chu kỳ sau: 20 giây ở 95°C, 30 giây ở 56°C và 40 giây ở 72°C trong 40 chu kỳ. Phản ứng qPCR đã được thăm dò với SYBR (Bio-Rad, USA).

Hình 55B cung cấp dữ liệu qPCR IL-2, trong đó mức ARN thông tin IL-2 tăng đáng kể (kiểm định t của sinh viên) khoảng 140%, 120% và 40% trong các tế bào được xử lý bằng "PD-ASO 3" ở mức 10, 100 và 1.000 aM, tương ứng. Mẫu phản ứng liều đảo ngược phù hợp với mẫu phản ứng liều đảo ngược được quan sát trong "PD-1 Ví dụ 1" và "PD-1 Ví dụ 2". (xem Hình 54A và Hình 55A)

PD-1 Ví dụ 4. Phương pháp qPCR cho ARN thông tin PD-1 trong các tế bào Jurkat được xử lý bằng "PD-ASO 1".

"PD-ASO 1" được chỉ rõ trong Bảng 11 là ASO PD-1 14 me bổ sung đầy đủ cho vị trí cắt nối 3' kéo dài qua điểm nối của intron 1 và exon 2 trong tiền ARN thông tin PD-1 ở người được đánh dấu là "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin PD-1 30 me ở người của [5' → 3']

cucuccaucucucag | ACUCCCCAGACAGGC]. "PD-ASO 1" có một chồng lắp 5 me với intron 1 và một chồng lắp 9 me với exon 2.

"PD-ASO 1" được đánh giá bằng qPCR lồng của PD-1 về khả năng của nó để tạo ra những thay đổi về mức độ ARN thông tin PD-1 ở người trong các tế bào Jurkat như được mô tả trong "PD-1 Ví dụ 2", trừ khi có ghi chú khác.

Hình 56A cung cấp dữ liệu qPCR, trong đó mức ARN thông tin PD-1 (kiểm định t của sinh viên) giảm đáng kể khoảng 60% trong các tế bào được xử lý với "PD-ASO 1" ở mức 100 và 1.000 aM. Không giống như trường hợp với "PD-ASO 3", "PD-ASO 1" cho thấy không có gợi ý rõ ràng nào về kiểu phản ứng liều ngược.

PD-1 Ví dụ 5. Hoạt tính chống ung thư của "PD-ASO 2" chống lại khối u ác tính B16F10 ở Chuột C57BL/6.

"PD-ASO 2" được chỉ rõ trong Bảng 11 là ASO PD-1 16 me bổ sung đầy đủ cho vị trí cắt nối 5' (5' SS) kéo dài qua điểm nối của exon 2 và intron 2 trong tiền ARN thông tin PD-1 ở chuột được đánh dấu là "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin PD-1 30 me ở chuột của [(5' → 3') AGCUCGUGGUAACAG | gugaggcuaguagaa]. "PD-ASO 2" có một chồng lắp 10 me với exon 2 và một chồng lắp 6 me với intron 2.

Trong khi đó, "PD-ASO 2" có bốn sự không phù hợp với tiền ARN thông tin PD-1 ở người như được đánh dấu "đậm" và "gạch chân" trong trình tự tiền ARN thông tin PD-1 30 me ở người của [[5' → 3') AGCUC"AG"GGU"G"ACAG | gug"c"ggccucggagg], trong đó bốn sự không phù hợp được đánh dấu bằng dấu ngoặc kép (" "). "PD-ASO 2" có thể được coi là ASO thay thế của "PD-ASO 3" cho tiền ARN thông tin PD-1 ở người.

"PD-ASO 2" được đánh giá về hoạt tính chống khối u của nó ở chuột C57BL/6 (4 tuần tuổi) được tiêm tế bào u ác tính B16F10 như được cung cấp dưới đây.

[Vô hiệu hóa các tế bào u ác tính B16F10] Các tế bào u ác tính B16F10 ở chuột (Cat. Số CRL-6485, ATCC) được duy trì trong đĩa nuôi cấy 150 mm có DMEM bổ sung 10% FBS, 1% streptomycin/penicillin và 0,01 mg/ml insulin bò.

Trong ngày 0, khoảng 1×10^5 tế bào B16F10 được hòa tan trong 50 μL PBS đã được tiêm vào từng con vật ở sườn phía sau bên phải.

[Phân nhóm & Điều trị ASO] Trong Ngày 3, các con vật được phân ngẫu nhiên theo trọng lượng vào 4 nhóm 0 (đối chứng âm), 2, 10 và 50 pmol/Kg "PD-ASO 2". (N = 15 con mỗi nhóm)

Các dung dịch tiêm được chuẩn bị bằng cách pha loãng lần lượt dung dịch gốc nước của "PD-ASO 2" trong PBS thành 0 nM (chỉ PBS), 0,4 nM, 2 nM và 12,5 nM "PD-ASO 2" cho nhóm đối chứng âm, 2, 10 và 50 pmol/Kg "PD-ASO 2", tương ứng.

Các động vật được tiêm dưới da bằng dung dịch tiêm với liều 5 ml/Kg, 2 lần mỗi tuần trong thời gian Ngày 3 đến Ngày 17.

[Hoạt tính chống khối u] Hoạt tính động chống khối u được đánh giá bằng sự thay đổi thể tích khối u giữa mỗi nhóm điều trị ASO và nhóm đối chứng âm.

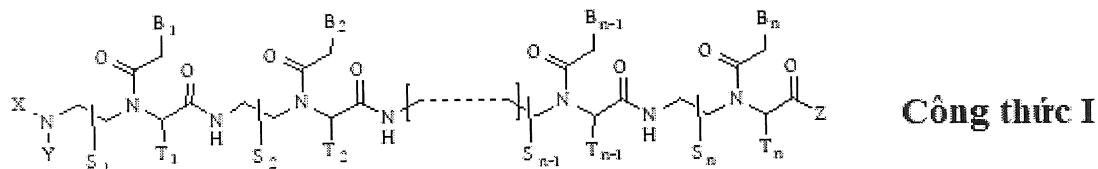
Hình 56B cung cấp thể tích khối u quan sát được theo nhóm trong Ngày 0 đến Ngày 19. Sự phát triển khối u ở mức 2 pmol/Kg đã bị ức chế đáng kể trong Ngày 10 đến Ngày 19. Sự ức chế quan sát được trong Ngày 19 là khoảng 55% (khoảng 375 mm^3 và 850 mm^3 với nhóm 2 pmol/Kg và nhóm đối chứng âm tương ứng). Hoạt tính chống ung thư của nhóm 50 pmol/Kg tương đương với hoạt tính của nhóm 2 pmol/Kg trong ngày 10 đến ngày 17. Tuy nhiên, hoạt tính chống ung thư của nhóm 50 pmol/Kg đã biến mất trong Ngày 19. Hoạt tính chống ung thư của nhóm 10 pmol/Kg là không đáng kể trong toàn bộ thời gian.

Kiểu phản ứng liều lạ có thể là do sự điều hòa tăng phiên mã bởi "ARN vòng tròn exon intron (EIciARN)" được tích lũy trong quá trình nhảy Exon với "PD-ASO 2". [*Nature Struc.Mol. Biol.* vol 22 (3), 256-264 (2015)] Cho rằng nivolumab, một loại thuốc kháng thể đơn dòng PD-1 được FDA Hoa Kỳ phê duyệt, cho thấy mô hình phản ứng liều có dạng hình chuông ở bệnh nhân có khối u [*J. Clin.Oncol.*, 12(4), 480-489, 1990. Tập 33 (18), 2013-2020 (2015)], tuy nhiên, kiểu phản ứng liều lạ của "PD-ASO 2" có thể là do dược lý nội tại của sự ức chế PD-1.

Vào ngày 19, các con vật đã bị chế để đo trọng lượng khối u theo nhóm. Trọng lượng khối u trung bình lần lượt là khoảng 0,35 g và 1,20 g đối với nhóm 2 pmol/Kg và nhóm đối chứng âm. Do đó, sự tăng trưởng khối u theo trọng lượng đã bị ức chế đáng kể trong nhóm 2 pmol/Kg khoảng 70%. ($p < 0,01$ bằng kiểm định t của sinh viên).

Yêu cầu bảo hộ

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



trong đó:

n là một số nguyên nằm giữa 10 và 25;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lấp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong một tiền ARN thông tin mục tiêu;

hợp chất của Công thức I hoàn toàn bổ sung cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu, hoặc bổ sung một phần cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu với một hoặc hai sự không phù hợp;

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

X và Y độc lập là gốc hydrido, formyl [HC(=O)-], aminocarbonyl [NH₂-C(=O)-], aminothiocarbonyl [NH₂-C(=S)-], alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxycarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminothiocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminothiocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkyloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, arylsulfonyl được thế hoặc không được thế,

alkylphosphonyl được thế hoặc không được thế hoặc gốc arylphosphonyl được thế hoặc không được thế;

Z là gốc hydrido, hydroxy, alkyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, amino $[-NH_2]$ không được thế, alkylamino được thế hoặc không được thế, arylamino được thế hoặc không được thế, alkyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn 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 gắn 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 giữa 10 và 25;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lắp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong một tiền ARN thông tin mục tiêu;

hợp chất của Công thức I hoàn toàn bổ sung cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu, hoặc bổ sung một phần cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu với một hoặc hai sự không phù hợp;

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

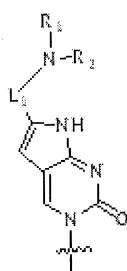
X và Y độc lập là gốc hydrido, formyl, aminocarbonyl, aminothiocabonyl, alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxyacarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, arylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminothiocabonyl được thế hoặc không được thế, arylaminothiocabonyl được thế hoặc không được thế,

alkyloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế, aryloxythiocarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylsulfonyl được thế hoặc không được thế, arylsulfonyl được thế hoặc không được thế, gốc alkylphosphonyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc arylphosphonyl được thế hoặc không được thế;

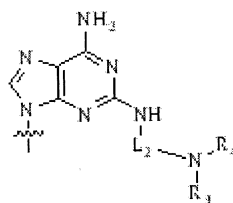
Z là gốc hydrido, hydroxy, alkyloxy được thế hoặc không được thế, aryloxy được thế hoặc không được thế, amino không được thế, alkylamino được thế hoặc không được thế, arylamino được thế hoặc không được thế, alkyl được thế hoặc không được thế hoặc gốc aryl được thế hoặc không được thế;

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

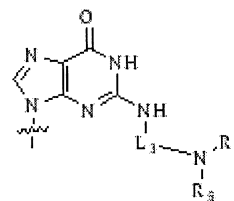
ít nhất bốn trong số $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$ và B_n được chọn độc lập từ các nucleobazơ không tự nhiên được biểu diễn bởi Công thức II, Công thức III hoặc Công thức IV;



Công thức II



Công thức III

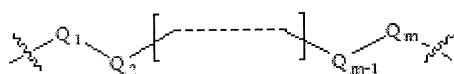


Công thức IV

trong đó:

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

L_1, L_2 và L_3 là một mối liên kết cộng hóa trị được biểu diễn bởi Công thức V liên kết cộng hóa trị nhóm amin bazơ với gốc nucleobazơ:



Công thức V

trong đó:

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

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

m là một số nguyên nằm giữa 1 và 15.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm giữa 11 và 23;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lắp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong một tiền ARN thông tin mục tiêu;

hợp chất của Công thức I hoàn toàn bổ sung cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu, hoặc bổ sung một phần cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu với một hoặc hai sự không phù hợp;

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

X và Y độc lập là gốc hydrido, aminocacbonyl, alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxyacacbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc arylsulfonyl được thế hoặc không được thế;

Z là gốc amino không được thế, hoặc gốc alkylamino 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 gốc alkyl được thế hoặc không được thế;

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

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

m là một số nguyên nằm giữa 1 và 11.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm giữa 11 và 21;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lắp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong một tiền ARN thông tin mục tiêu;

hợp chất của Công thức I hoàn toàn bổ sung cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu, hoặc bổ sung một phần cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu với một hoặc hai sự không phù hợp;

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

X và Y độc lập là gốc hydrido, alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc arylsulfonyl được thế hoặc không được thế;

Z là amino không được thế, hoặc gốc alkylamino 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 gốc alkyl được thế hoặc không được thế;

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

$Q_2, Q_3, \dots$ và Q_{m-1} được chọn độc lập từ gốc metylen, oxy và amino; và m là một số nguyên nằm giữa 1 và 11.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm giữa 11 và 19;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lắp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong một tiền ARN thông tin mục tiêu;

hợp chất của Công thức I hoàn toàn bổ sung cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu;

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

X và Y độc lập là gốc hydrido, alkyl được thế hoặc không được thế, aryl được thế hoặc không được thế, alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, alkyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế, alkylaminocarbonyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc arylsulfonyl được thế hoặc không được thế;

Z là gốc amino không được thế, hoặc gốc alkylamino 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_3 và R_5 là gốc hydrido và R_2, R_4 và R_6 độc lập là gốc hydrido, hoặc gốc alkyl được thế hoặc không được thế;

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

$Q_2, Q_3, \dots$, và Q_{m-1} được chọn độc lập từ gốc metylen và oxy; và m là một số nguyên nằm giữa 1 và 9.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm giữa 12 và 19;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lắp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong một tiền ARN thông tin mục tiêu;

hợp chất của Công thức I hoàn toàn bổ sung cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu;

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

X và Y độc lập là gốc alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, hoặc gốc alkyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế;

Z là gốc amino không được thế, hoặc gốc alkylamino 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 gắn kết trực tiếp với nhóm amino bazơ;

$Q_2, Q_3, \dots$, và Q_{m-1} được chọn độc lập từ gốc metylen và oxy; và m là một số nguyên nằm giữa 1 và 9.

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

trong đó:

n là một số nguyên nằm giữa 12 và 18;

hợp chất của Công thức I có ít nhất một chồng lấp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong một tiền ARN thông tin mục tiêu;

hợp chất của Công thức I hoàn toàn bổ sung cho trình tự tiền ARN thông tin mục tiêu;

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

x là gốc hydrido;

Y là gốc alkylaxyl được thế hoặc không được thế, arylaxyl được thế hoặc không được thế, hoặc alkyloxycarbonyl được thế hoặc không được thế;

Z là gốc amino không được thế, hoặc gốc alkylamino 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 là $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$, $-CH_2-O-(CH_2)_2-$, $-CH_2-O-(CH_2)_3-$, $-CH_2-O-(CH_2)_4-$, $-CH_2-O-(CH_2)_5-$, $-CH_2-O-(CH_2)_6-$, hoặc $-CH_2-O-(CH_2)_7-$ với đầu bên phải được gắn kết trực tiếp với nhóm amino bazơ; và

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

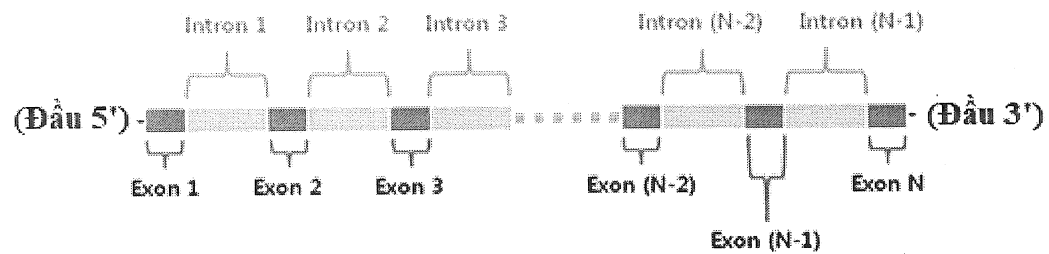
8. Phương pháp gây ra sự nhảy exon đích trong tiền ARN thông tin mục tiêu trong các tế bào in vitro, phương pháp này bao gồm bước cho các tế bào này tiếp xúc với dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

9. Phương pháp điều biến hoạt tính chức năng của gen mục tiêu trong các tế bào in vitro, phương pháp này bao gồm bước cho các tế bào này tiếp xúc với dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

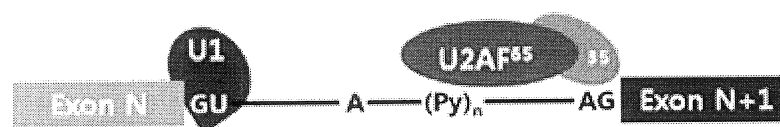
10. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó hợp chất này có ít nhất một chồng lấp bổ sung 10 me với trình tự vị trí cắt nối mục tiêu 14 me bao gồm 7 me từ intron và 7 me từ exon trong một tiền ARN thông tin mục tiêu, trong đó trình tự vị trí cắt nối mục tiêu không phải là [(5' → 3') UUGCCUGGUAAGGA] trong tiền ARN thông tin của thụ thể androgen ở người, [(5' → 3') UUUUUGCGUAAGUA] trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người, [(5' → 3') UAAGUAGGAUAAGU] trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người, [(5' → 3') AUCCCAGGGUAACA] trong tiền ARN thông tin SNAP25 ở người, [(5' → 3') UGUUUAGGUACACU] trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người, hoặc [(5' → 3') UGUACAGAUUGUCU] trong tiền ARN thông tin tyrosinaza ở người.

11. Dẫn xuất axit nucleic peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó hợp chất này có ít nhất một chồng lấp bổ sung 10 me với vị trí cắt nối mục tiêu trong một tiền ARN thông tin mục tiêu, trong đó trình tự vị trí cắt nối mục tiêu không bao gồm [(5' → 3') UUGCCUGGUAAGGA] trong tiền ARN thông tin của thụ thể androgen ở người, [(5' → 3') UUUUUGCGUAAGUA] trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người, [(5' → 3') UAAGUAGGAUAAGU] trong tiền ARN thông tin HIF-1 α ở người, [(5' → 3') AUCCCAGGGUAACA] trong tiền ARN thông tin SNAP25 ở người, [(5' → 3') UGUUUAGGUACACU] trong tiền ARN thông tin SCN9A ở người hoặc [(5' → 3') UGUACAGAUUGUCU] trong tiền ARN thông tin tyrosinaza ở người.

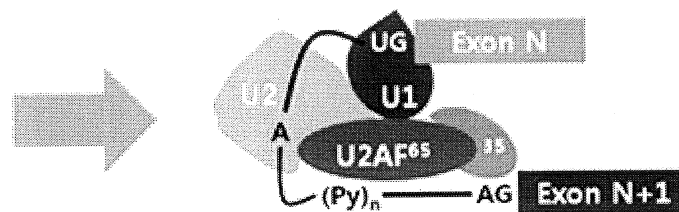
Hình 1A



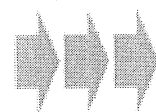
Hình 1B



"Phức hợp Spliceosome E"



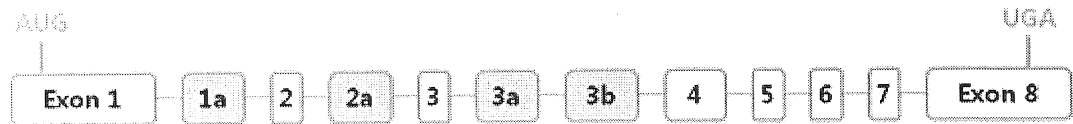
"Phức hợp Spliceosome A"



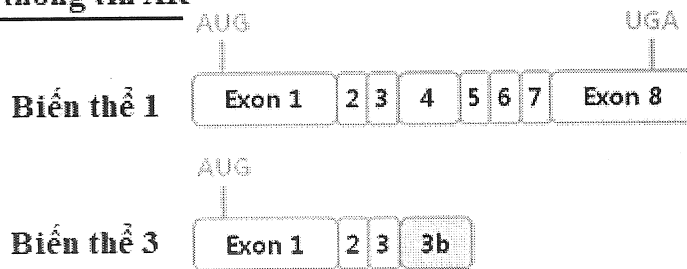
"ARN thông tin"

Hình 2A

Tiền ARN thông tin AR



ARN thông tin AR

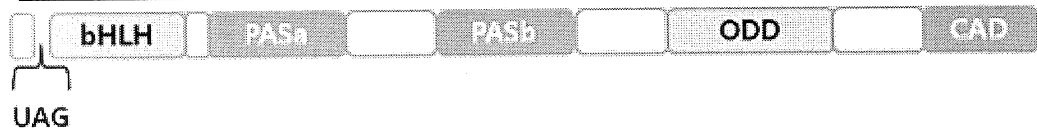


Hình 2B

ARN thông tin HIF-1 α^{mt} (mã hóa axit amin 826)



ARN thông tin HIF-1 α^{FL} (mã hóa axit amin 827)



ARN thông tin HIF-1 α^{736} (mã hóa axit amin 736)



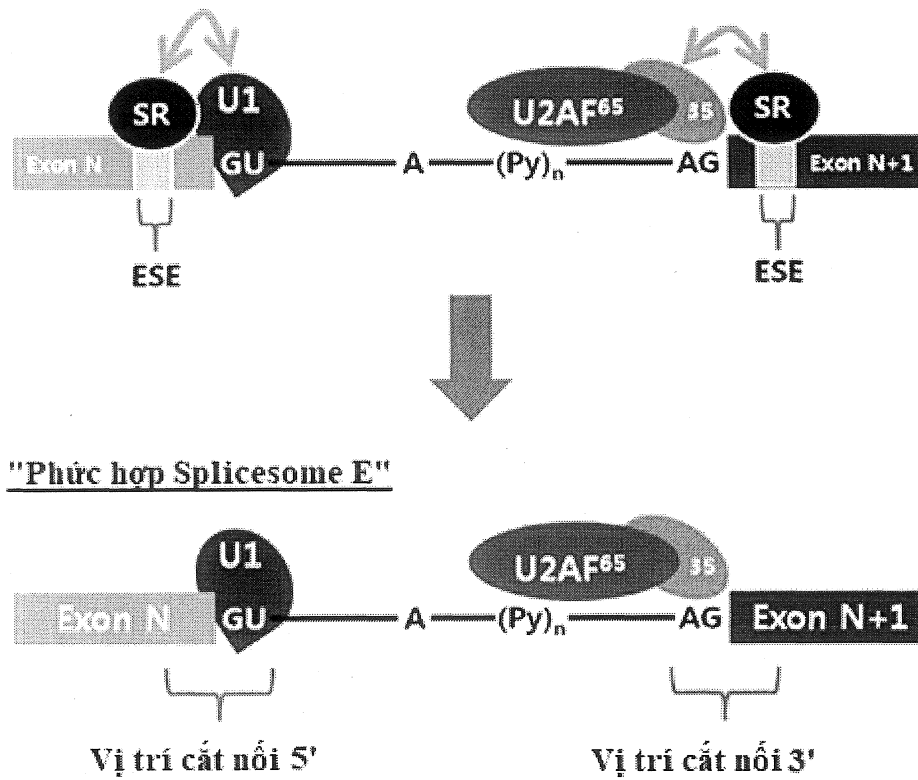
ARN thông tin HIF-1 α^Z (mã hóa axit amin 557)



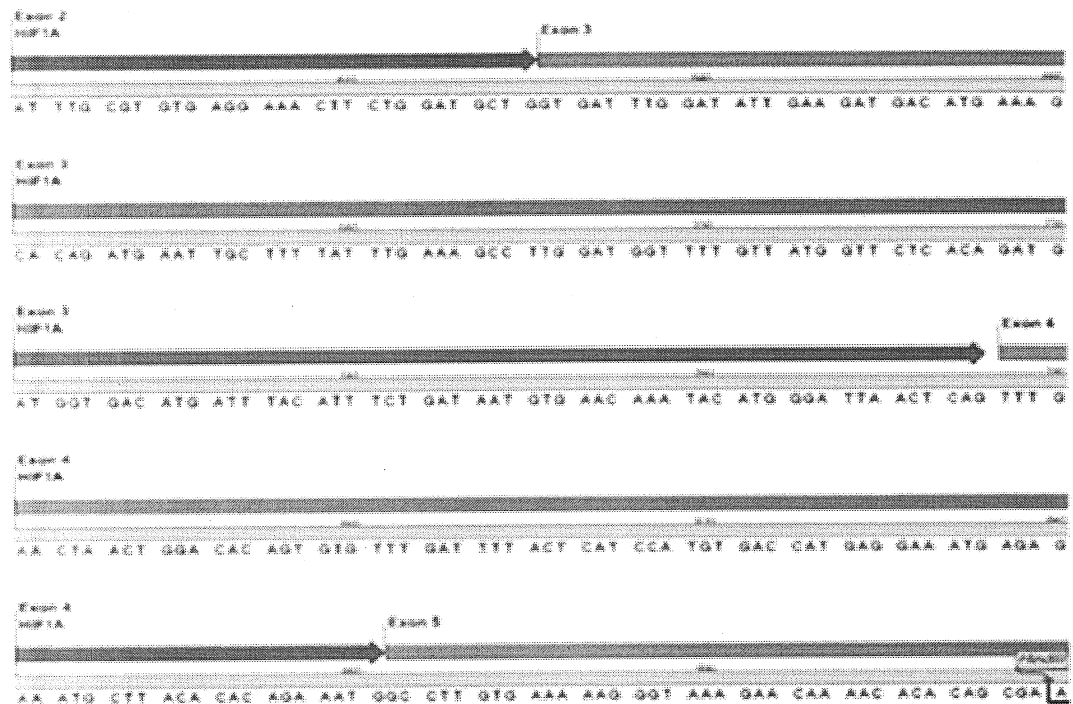
ARN thông tin HIF-1 α^{516} (mã hóa axit amin 516)



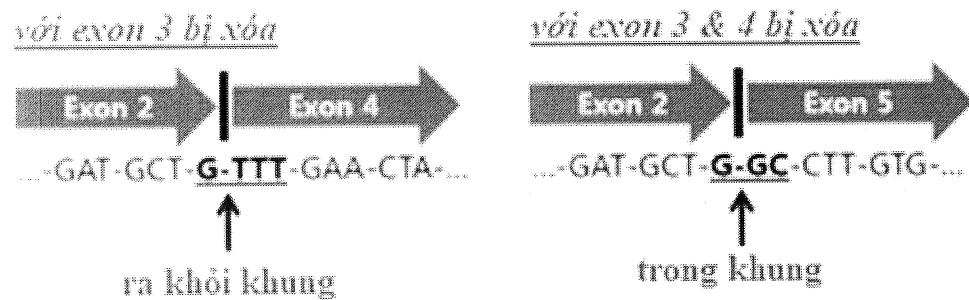
Hình 3



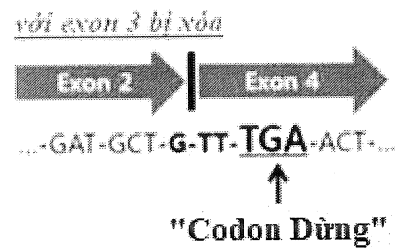
Hình 4A



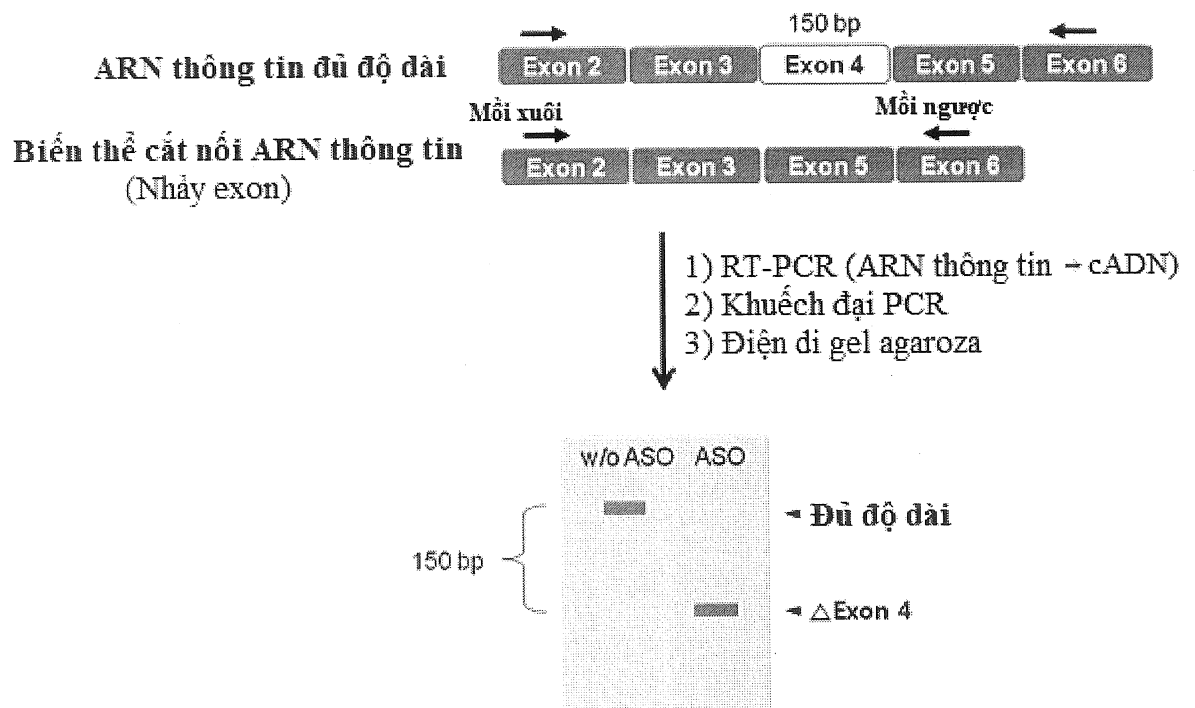
Hình 4B



Hình 4C

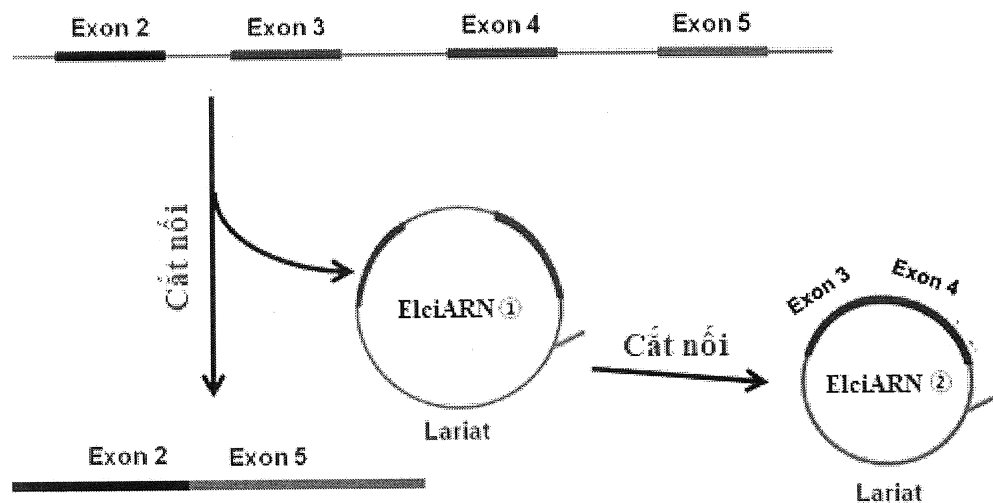


Hình 5A



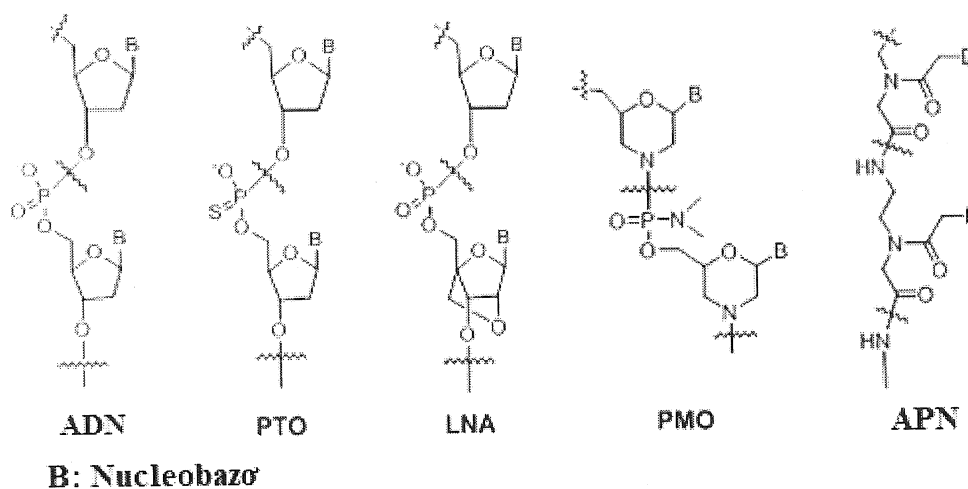
Hình 5B

Tiền ARN thông tin

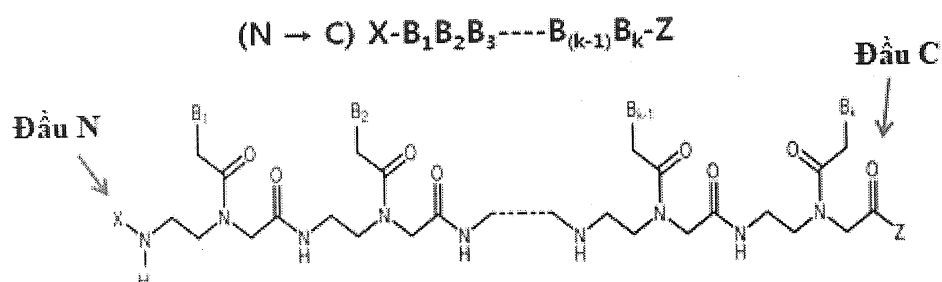


Biến thể cắt nối ARN thông tin

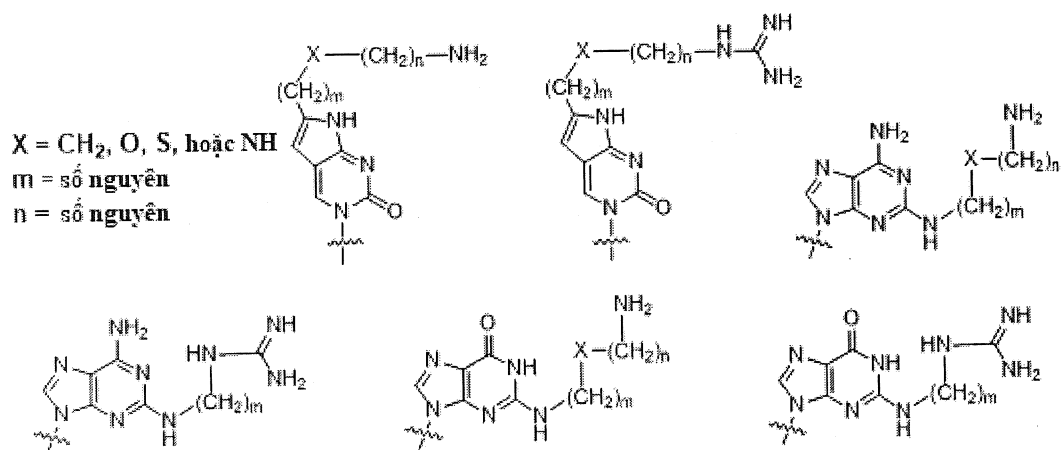
Hình 6A



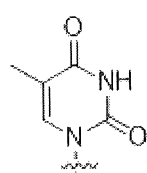
Hình 6B



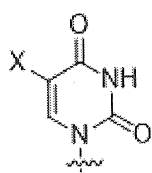
Hình 6C



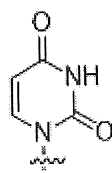
Hình 7



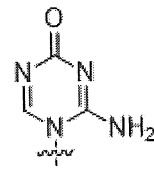
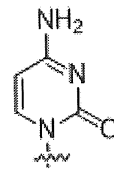
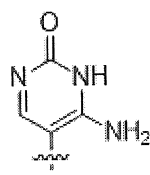
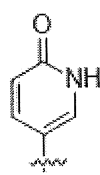
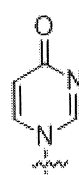
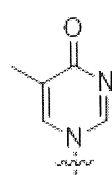
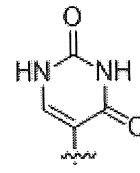
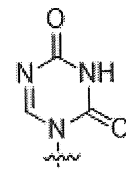
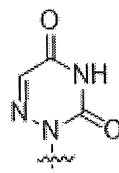
Thimin



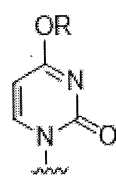
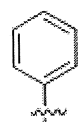
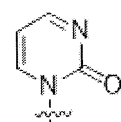
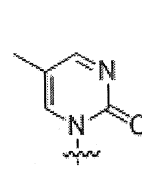
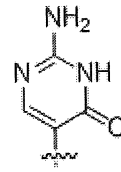
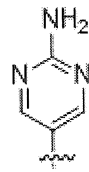
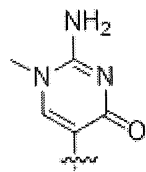
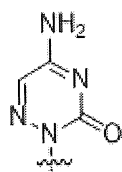
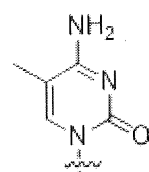
X = F, Cl, Br, hoặc I



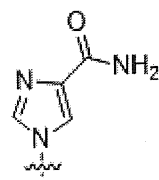
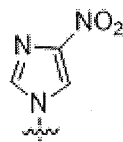
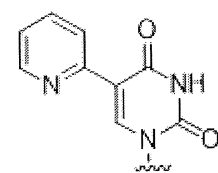
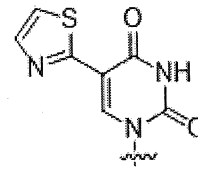
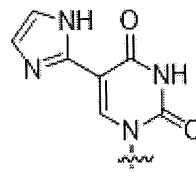
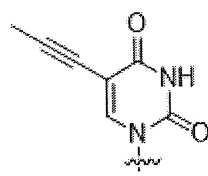
Uracin



Xytosin

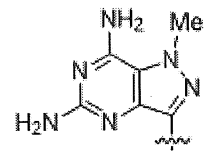
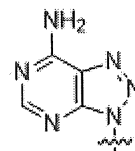
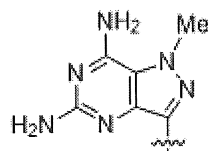
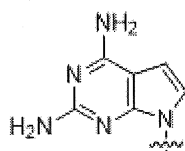
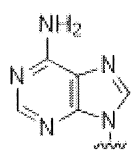


R = alkyl

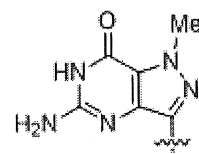
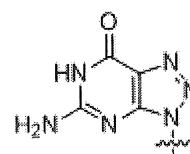
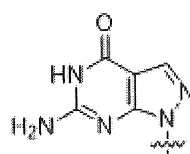
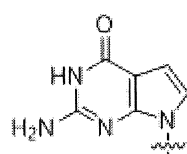
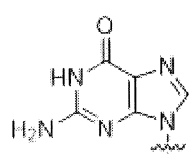


Hình 7

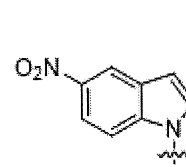
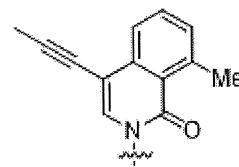
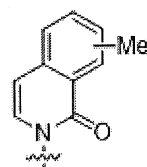
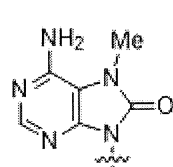
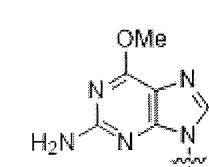
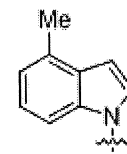
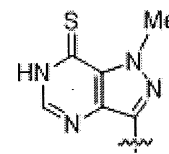
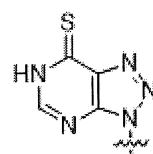
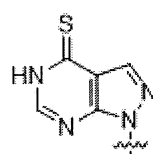
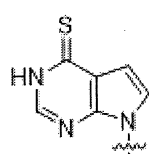
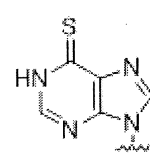
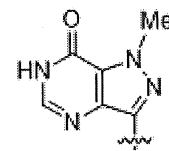
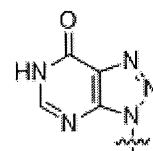
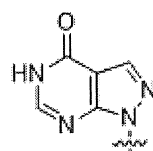
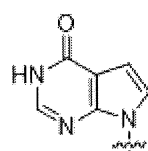
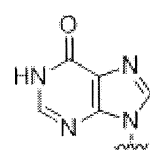
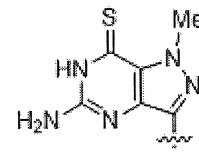
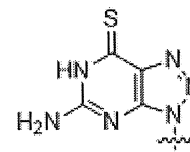
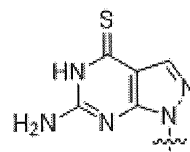
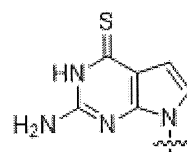
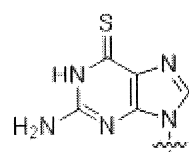
(Tiếp tục từ trang trước)



Adenin



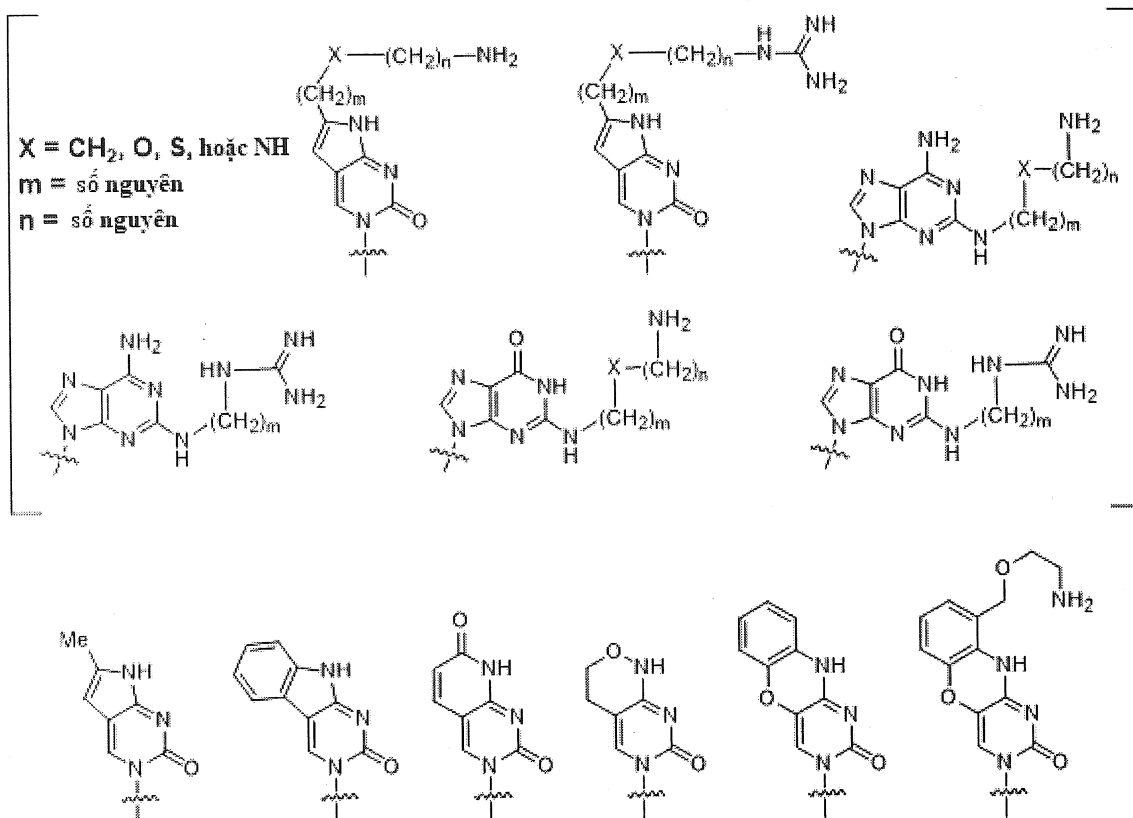
Guanin



6-O-metylguanin

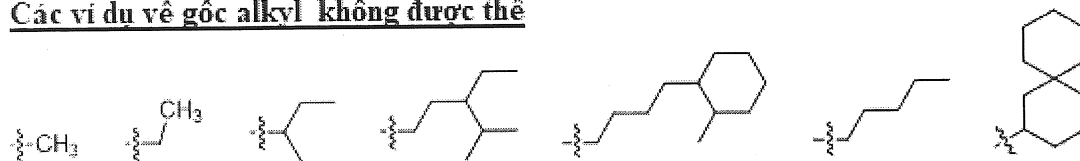
Hình 7

(Tiếp tục từ trang trước)

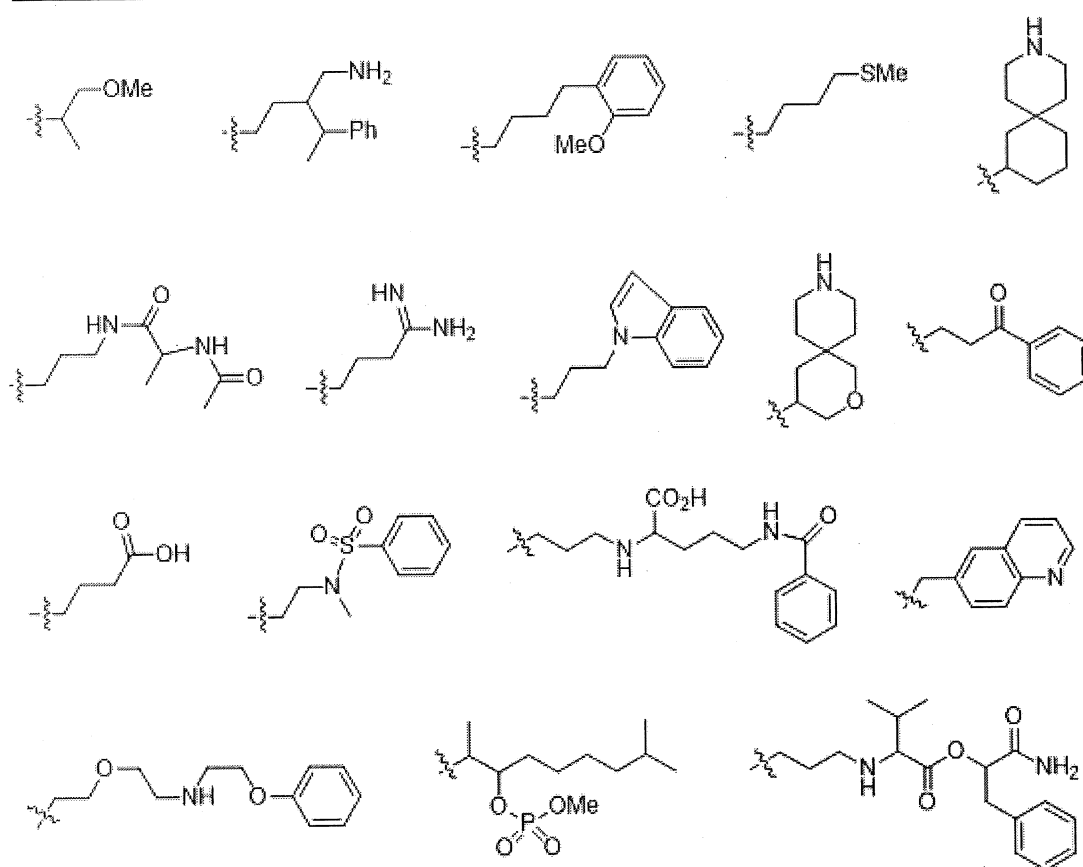


Hình 8A

Các ví dụ về gốc alkyl không được thể

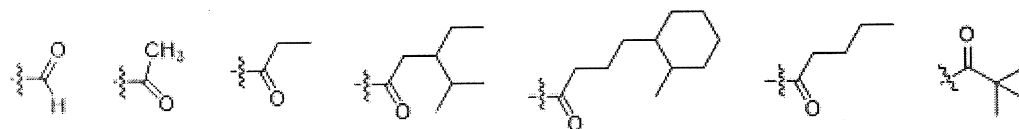


Các ví dụ về gốc alkyl được thể

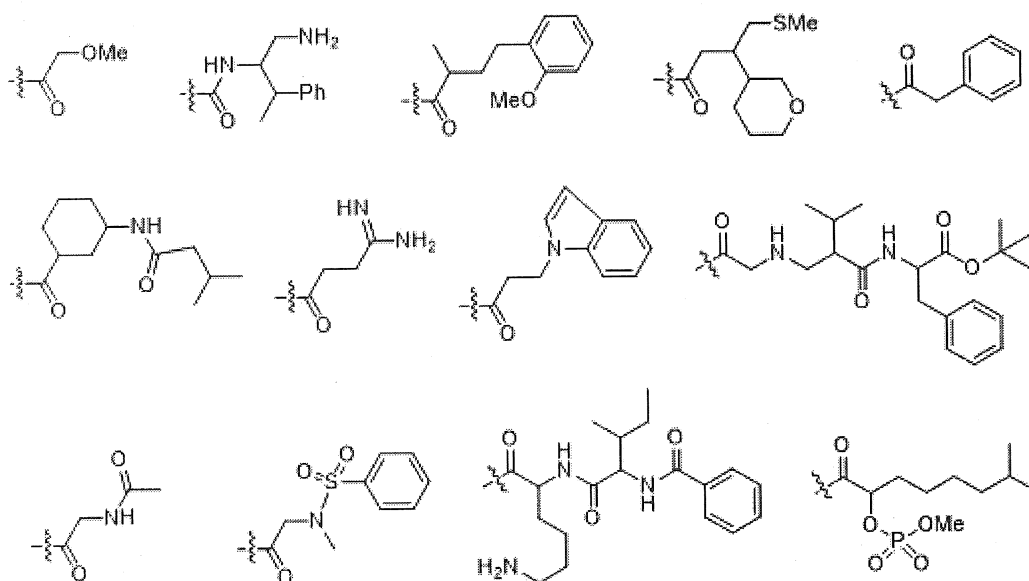


Hình 8B

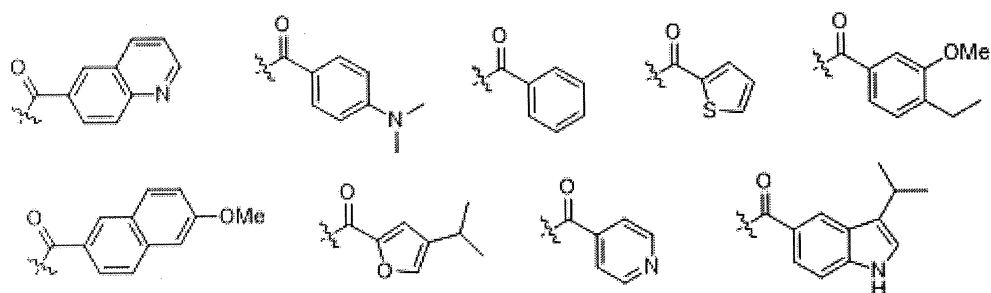
Các ví dụ về gốc alkylaxyl không được thể



Các ví dụ về gốc alkylaxyl được thể

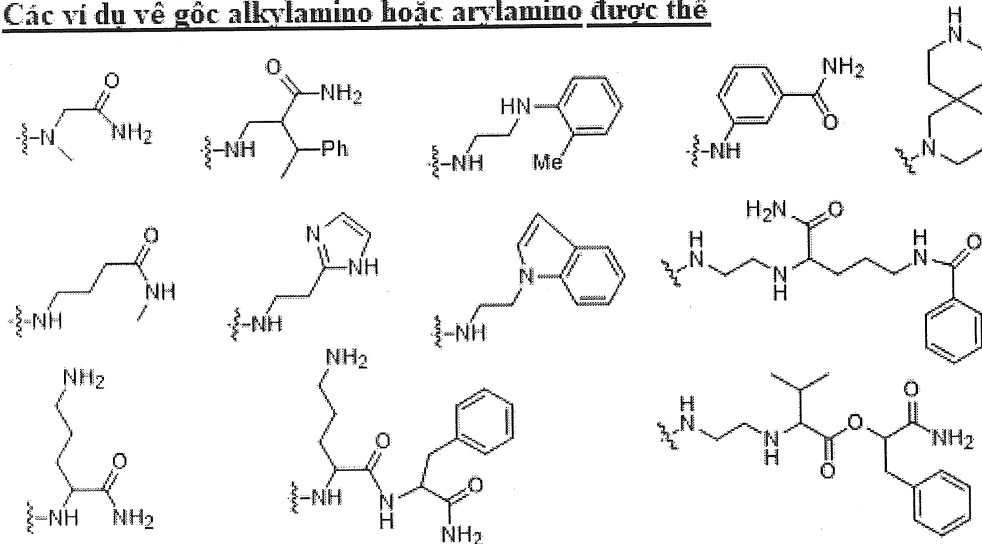


Các ví dụ về gốc arylaxyl được thể hoặc không được thể

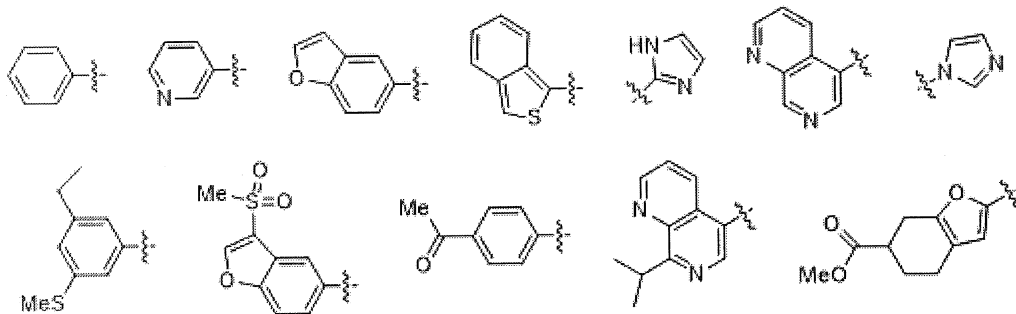


Hình 8C

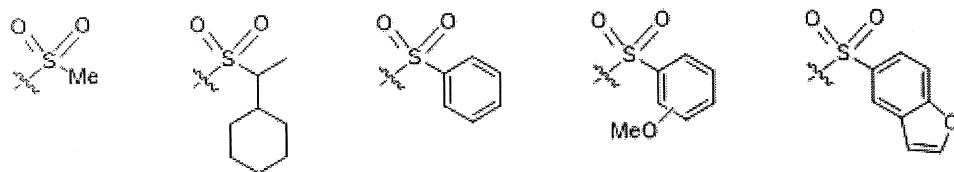
Các ví dụ về gốc alkylamino hoặc arylamino được thể



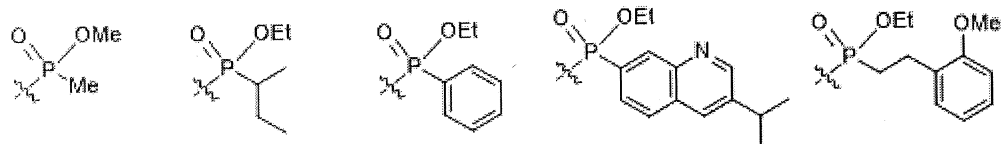
Các ví dụ về gốc aryl được thế hoặc không được thế



Các ví dụ về gốc alkylsulfonyl hoặc arylsulfonyl được thể hoặc không được thể

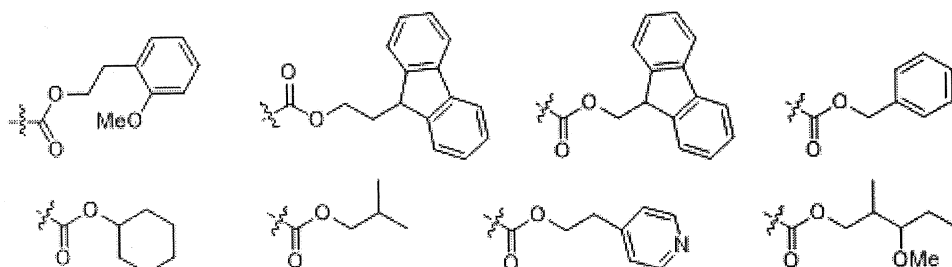


Các ví dụ về gốc alkyl- hoặc aryl-phosphonyl được thể hoặc không được thể

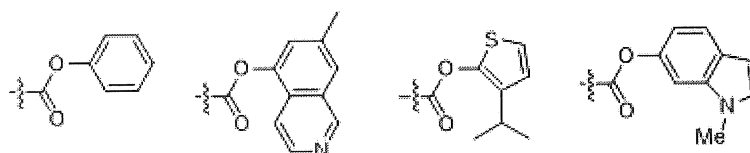


Hình 8D

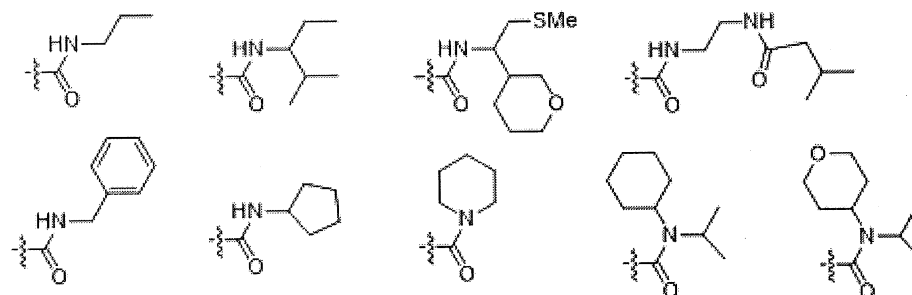
Các ví dụ về gốc alkyloxyacbonyl được thế hoặc không được thế



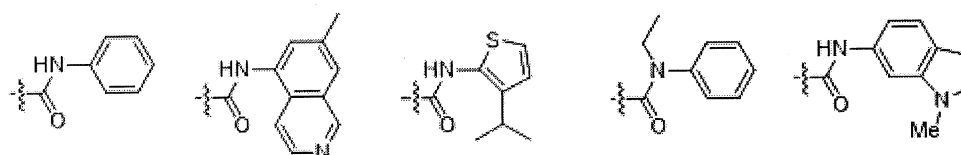
Các ví dụ về gốc aryloxyacbonyl được thế hoặc không được thế



Các ví dụ về gốc alkylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế

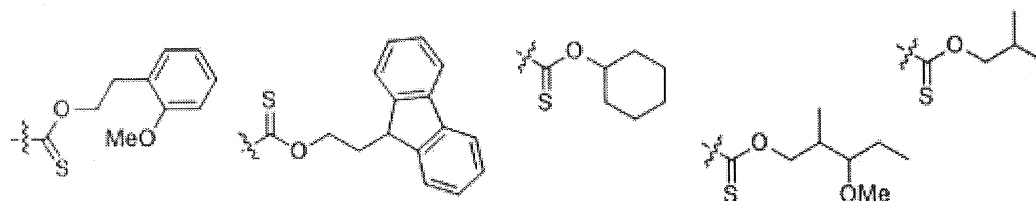


Các ví dụ về gốc arylaminocacbonyl được thế hoặc không được thế

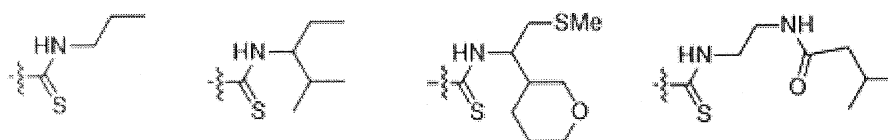


Hình 8E

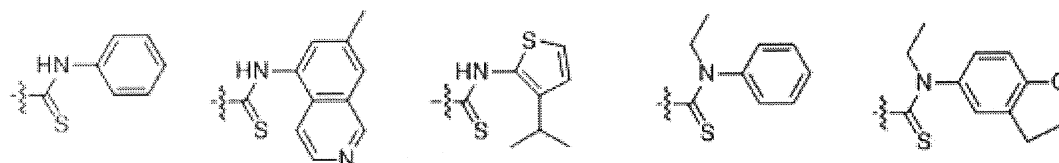
Các ví dụ về gốc alkyloxythiocarbonyl được thể hoặc không được thể



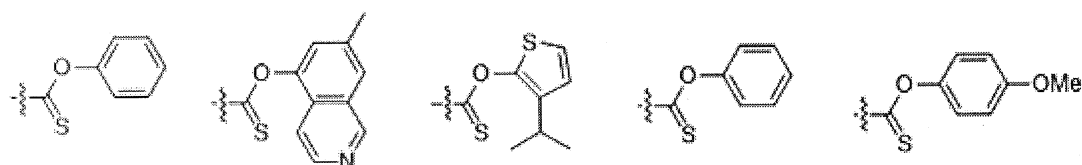
Các ví dụ về gốc alkylaminothiocarbonyl được thể hoặc không được thể



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

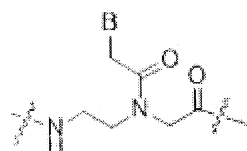


Các ví dụ về gốc aryloxythiocarbonyl được thể hoặc không được thể



Hình 9

Monome APN

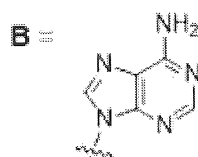


B: Nucleobazo

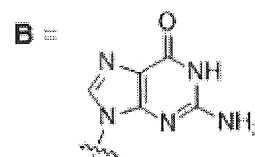
p: Số nguyên

q: Số nguyên

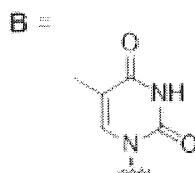
Adenin



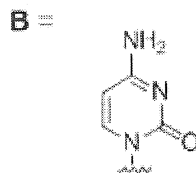
Guanin



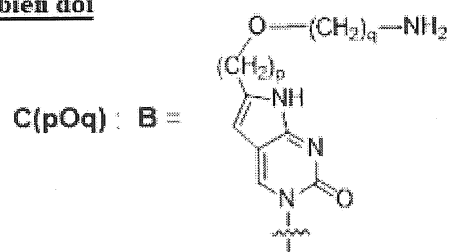
Timin



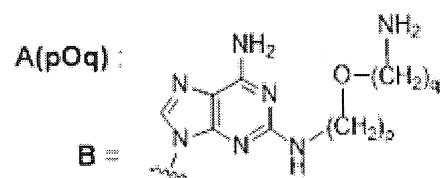
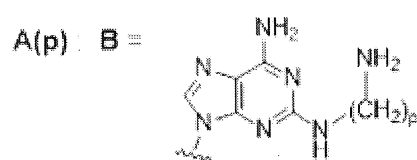
Xytosin



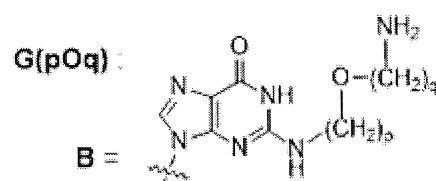
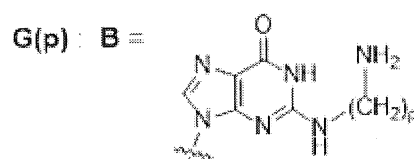
Xytosin biến đổi



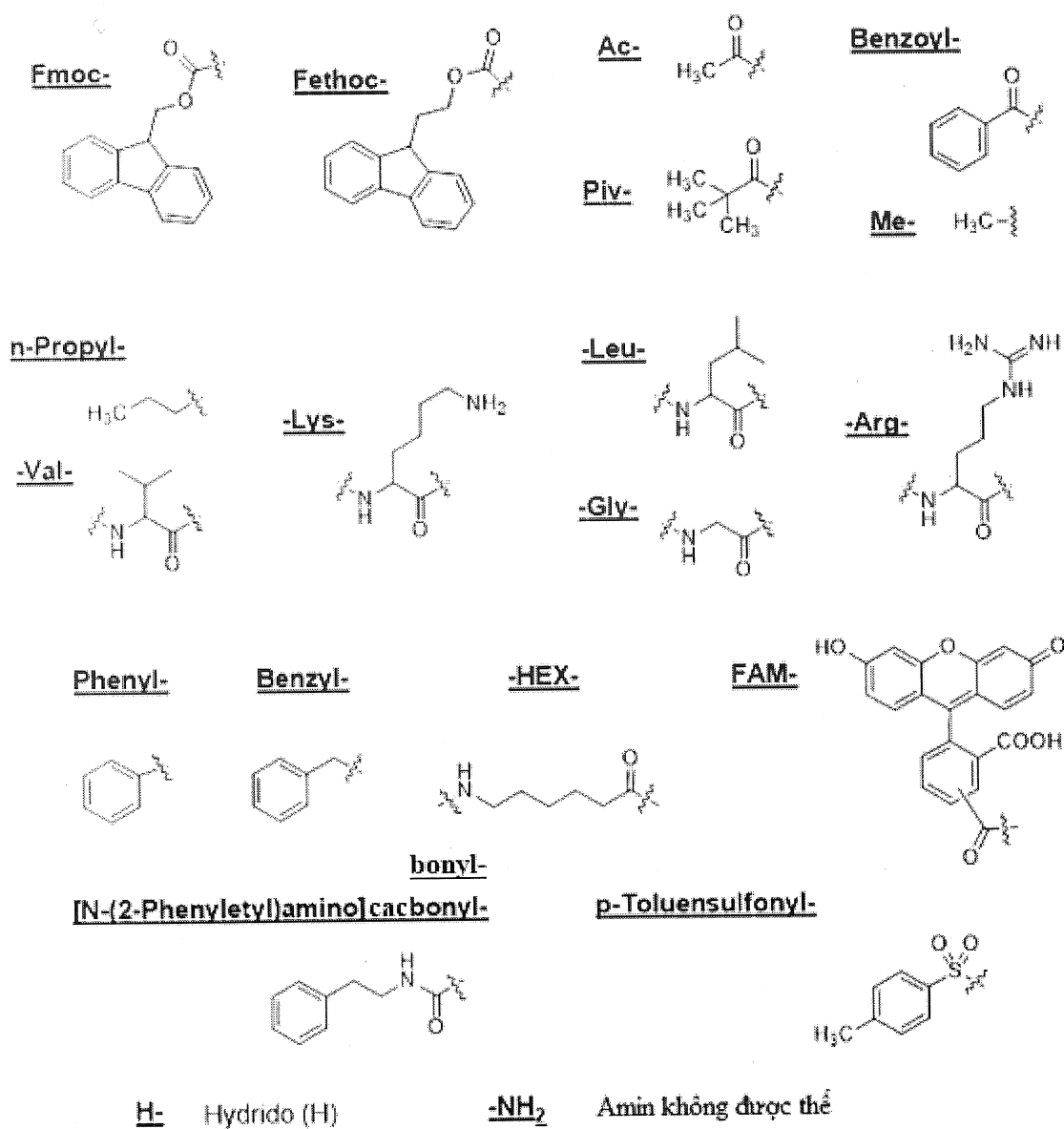
Adenin biến đổi

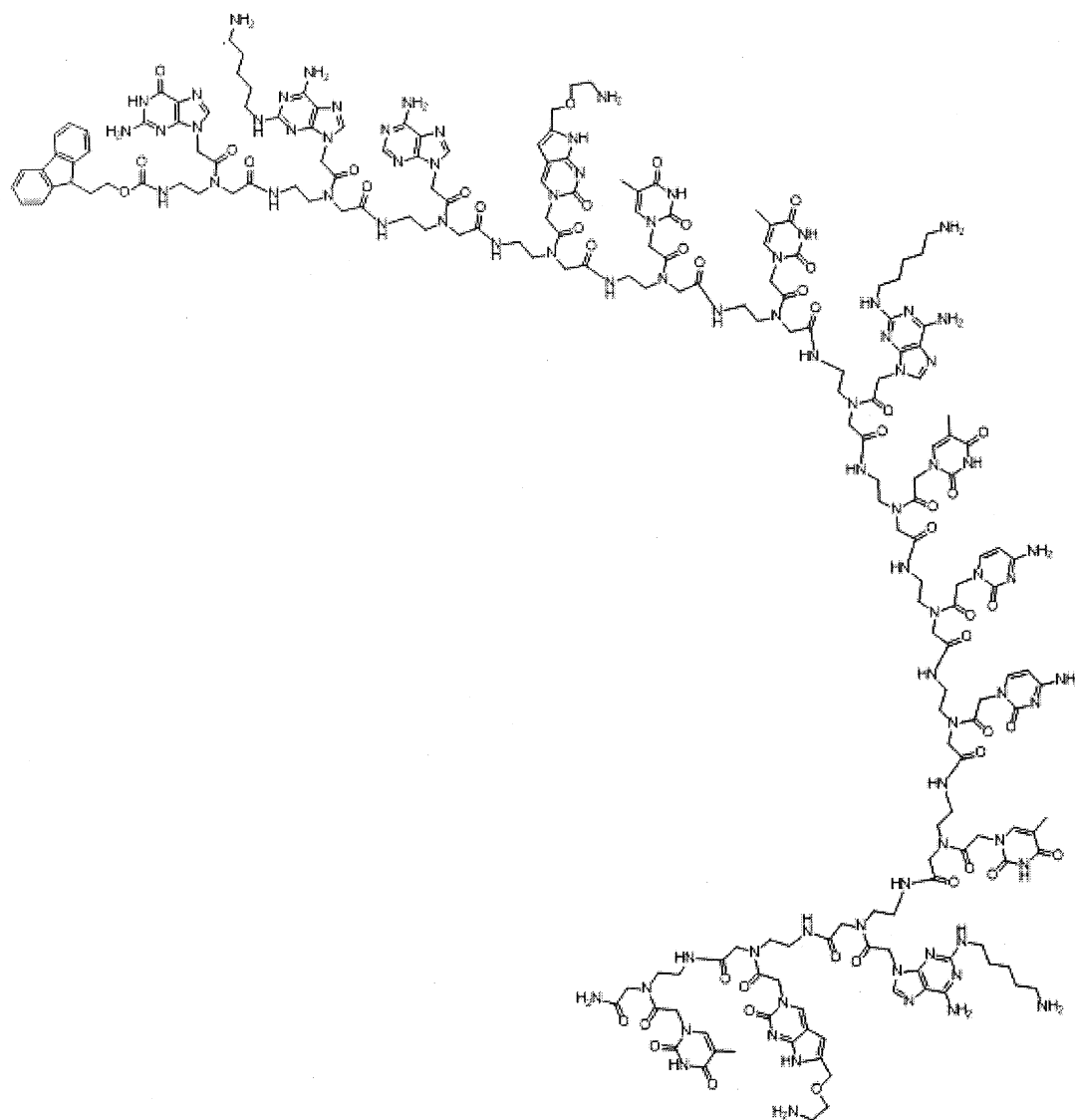


Guanin biến đổi

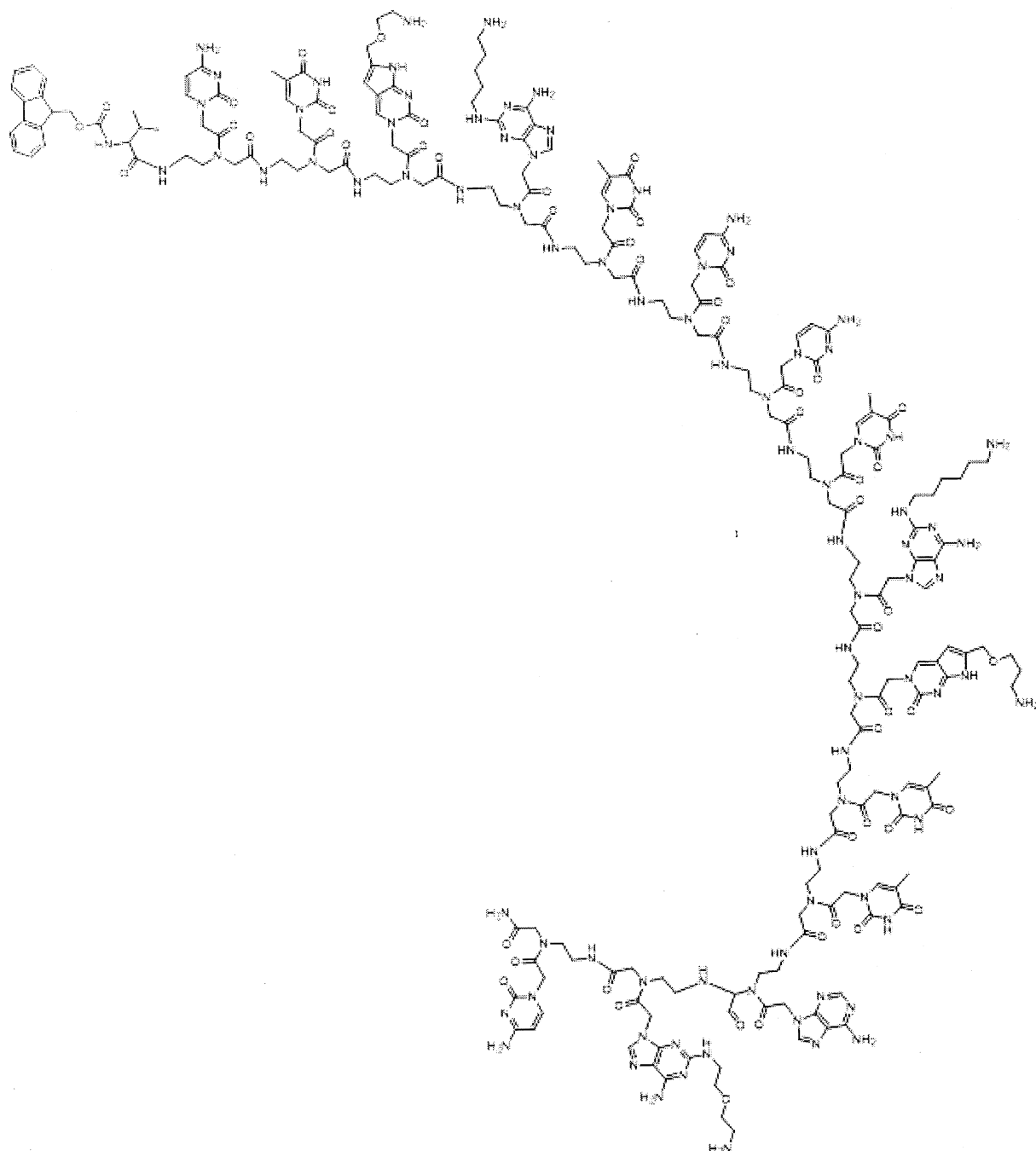


Hình 10



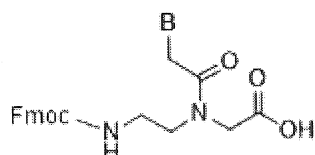
Hình 11

Hình 12



Hình 13

Monome Fmoc-APN

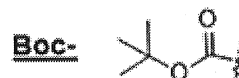


B : Nucleobazơ với (các) nhóm bảo vệ

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

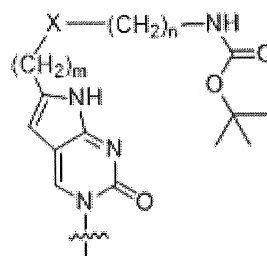
m : Số nguyên

n : Số nguyên



Xytosin biến đổi

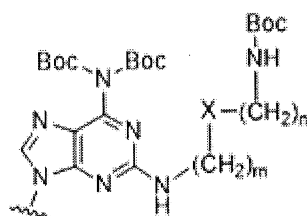
C(mXn) : B =



Adenin biến đổi

A(mXn) :

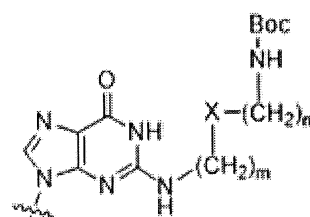
B =



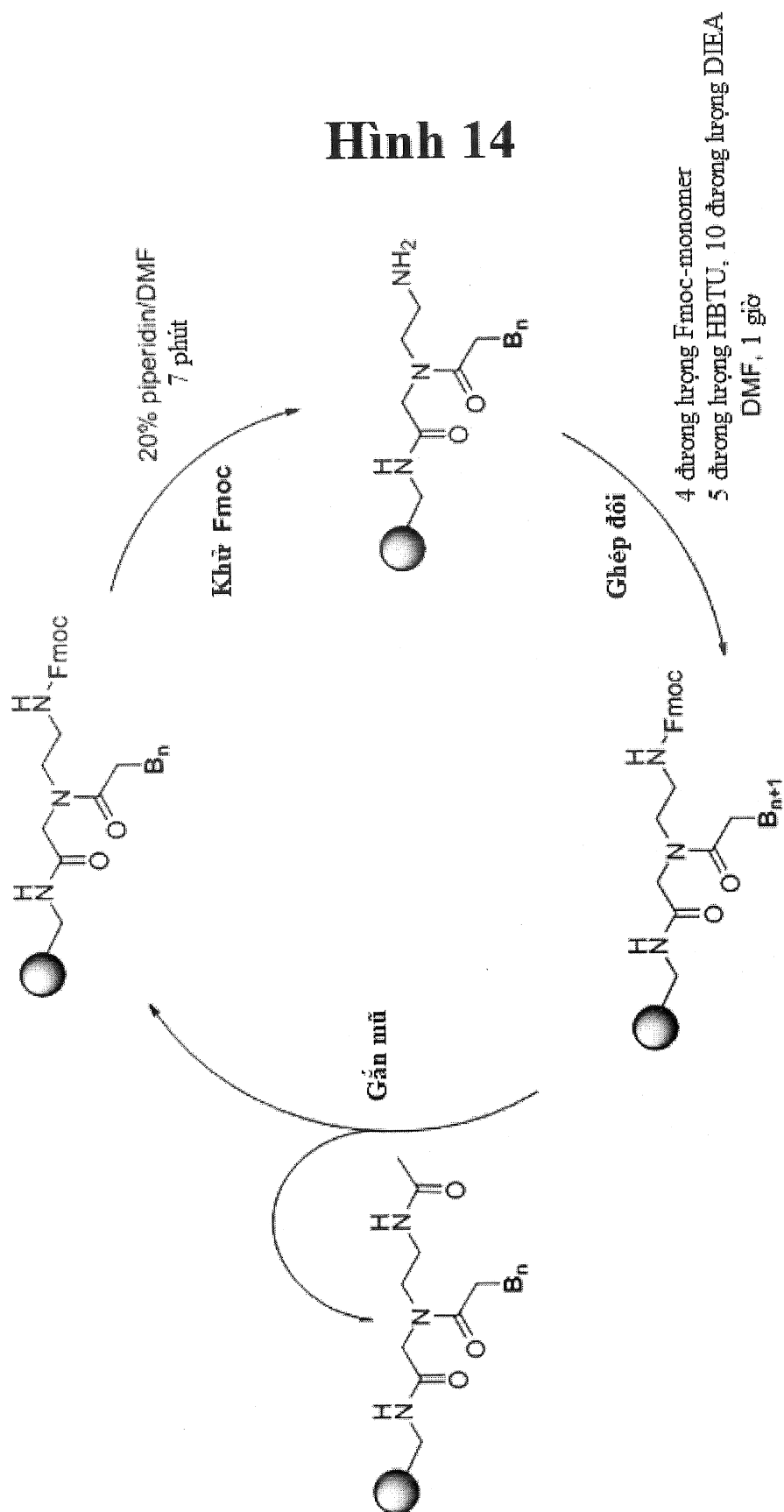
Guanin biến đổi

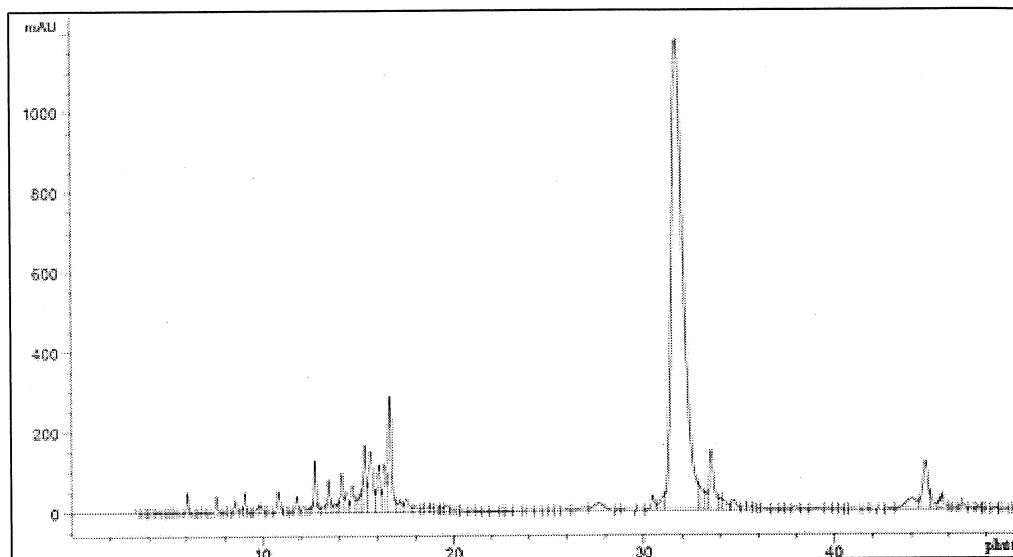
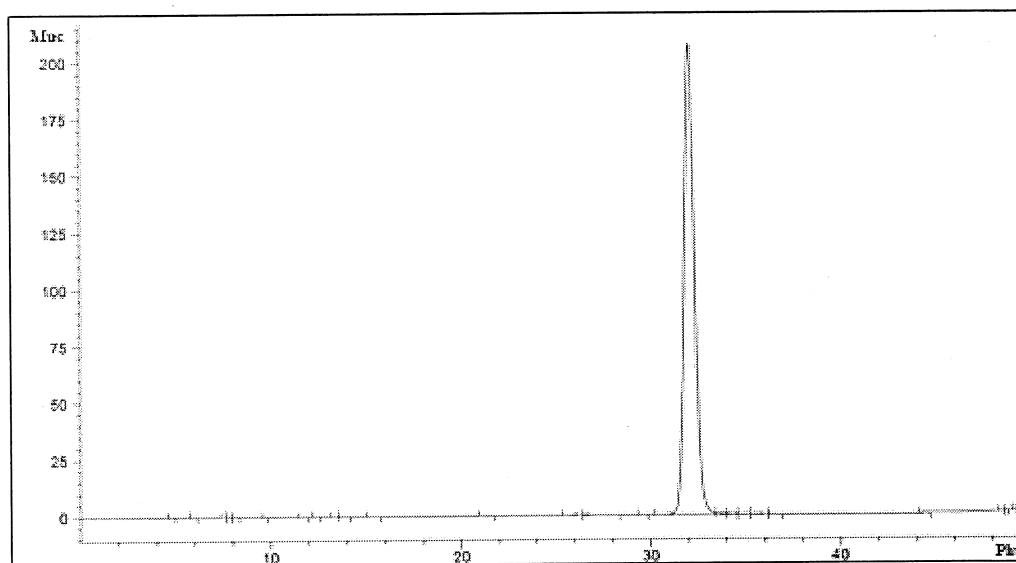
G(mXn) :

B =

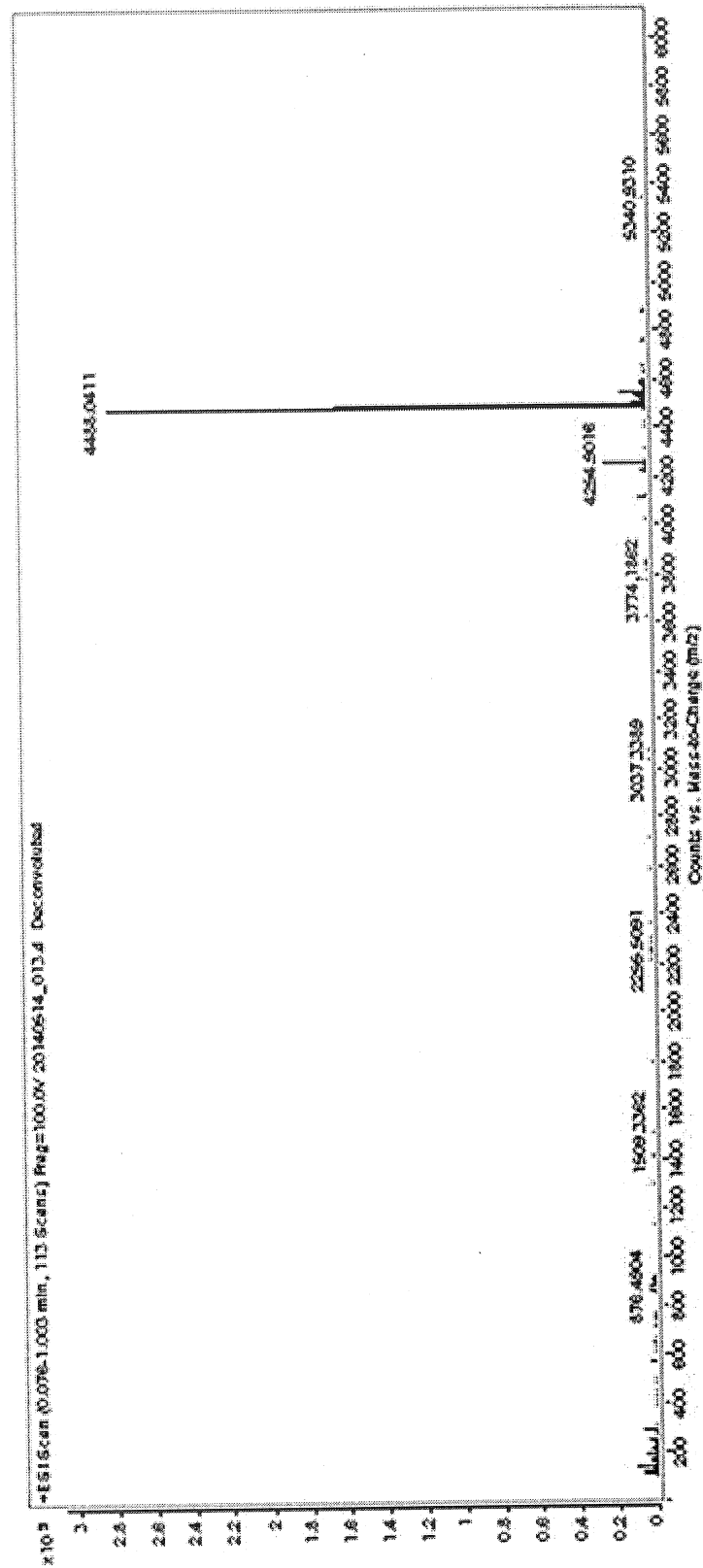


Hình 14

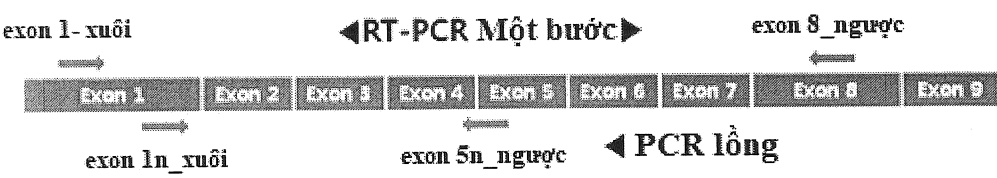


Hình 15A**Hình 15B**

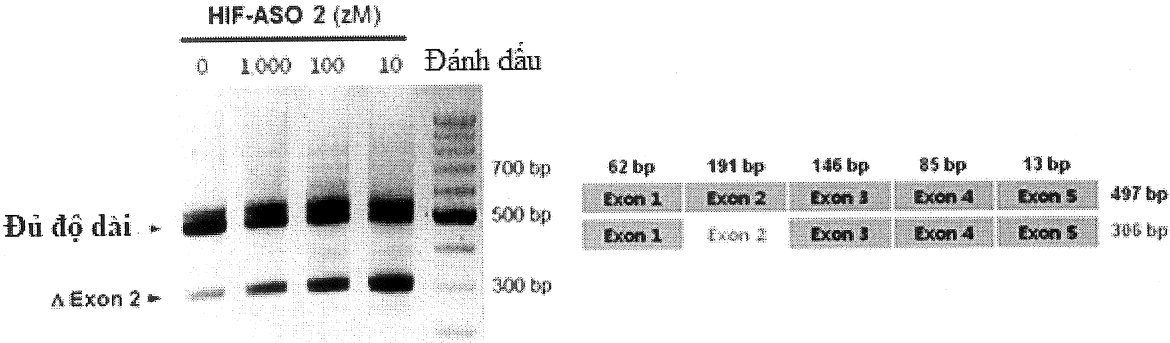
Hình 16



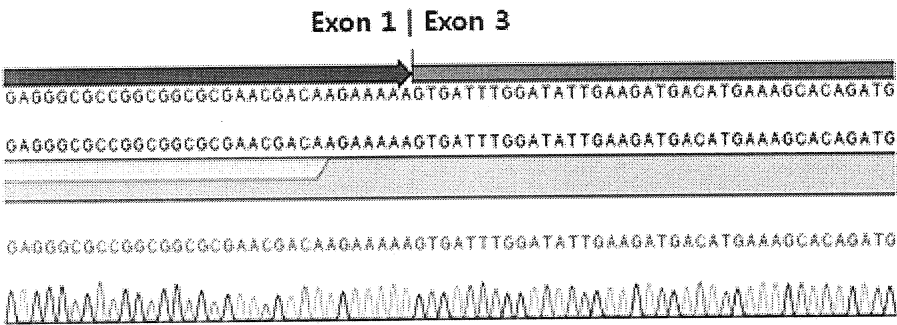
Hình 17A



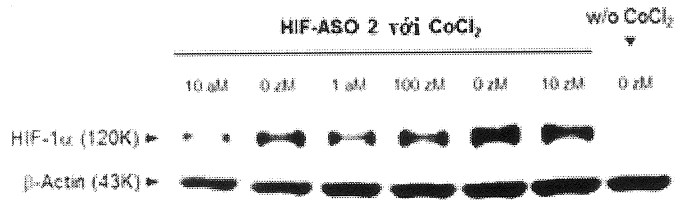
Hình 17B



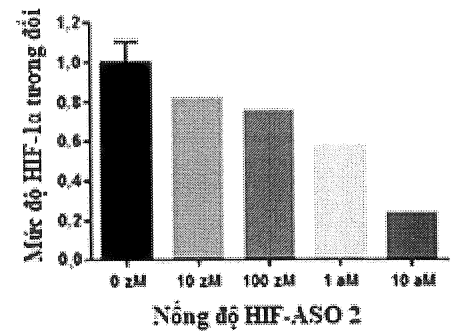
Hình 17C



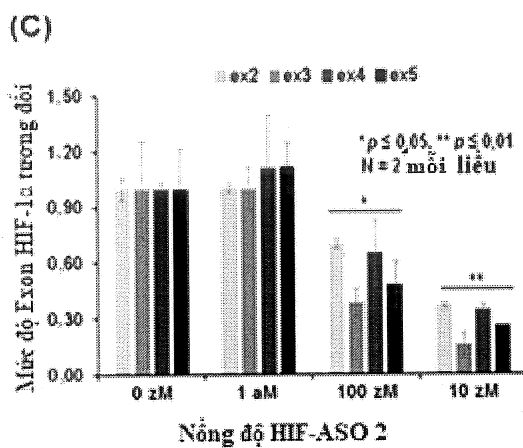
Hình 18A



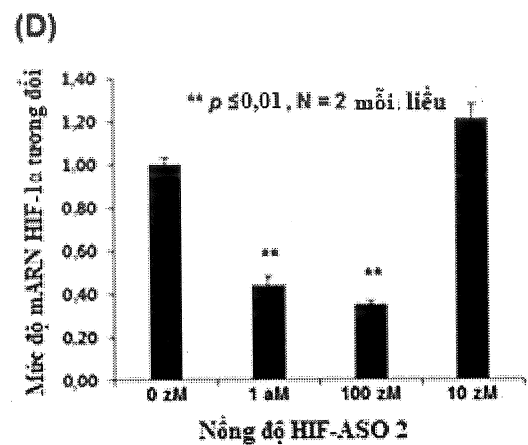
Hình 18B



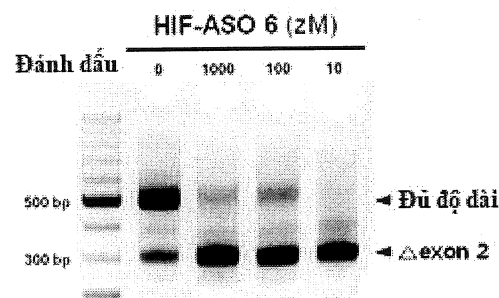
Hình 18C



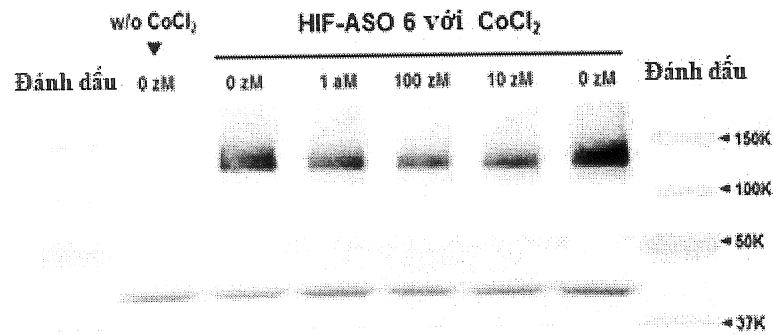
Hình 18D



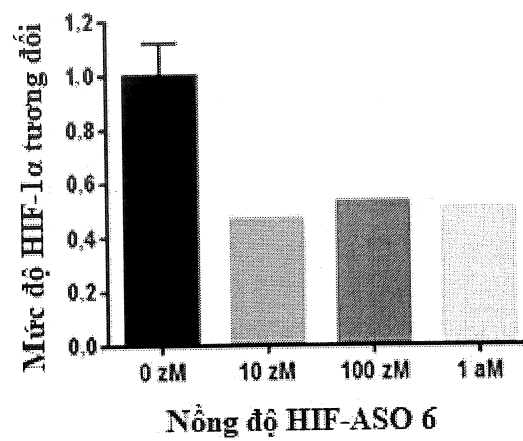
Hình 19A

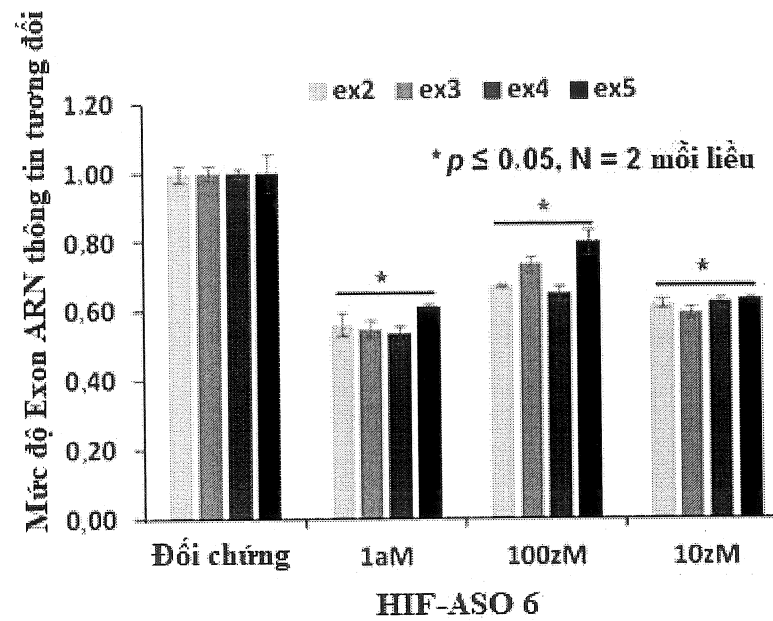
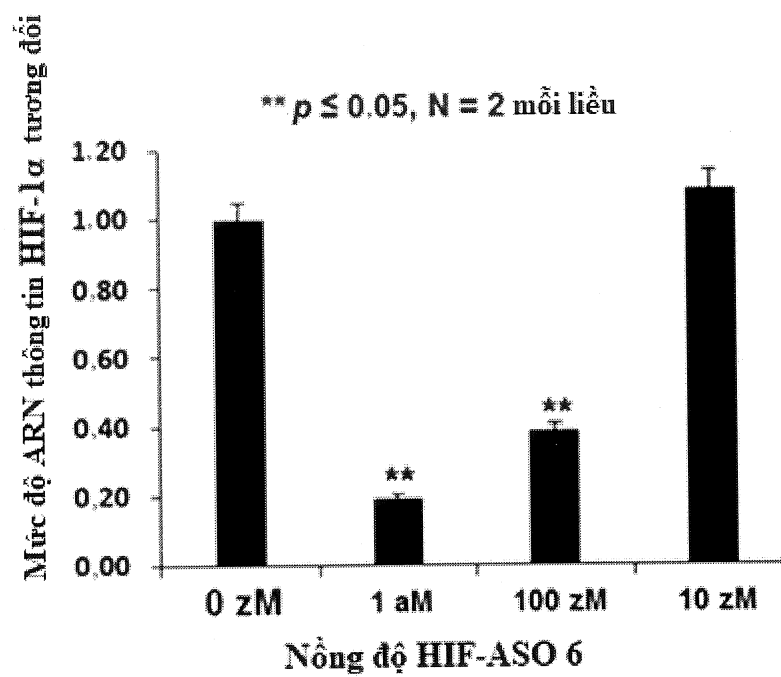


Hình 19B

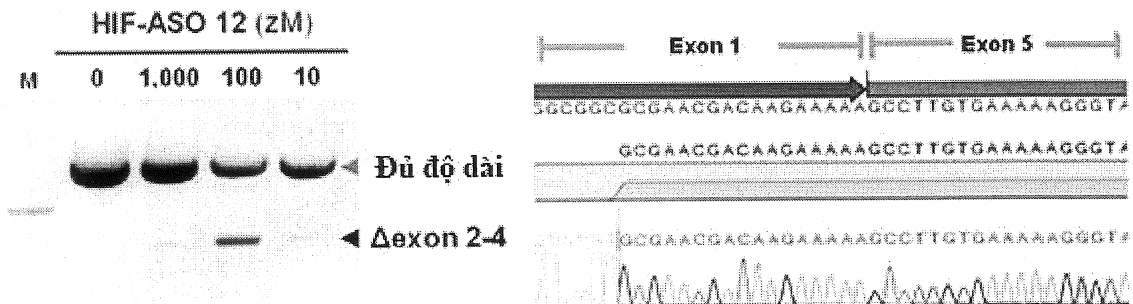


Hình 19C

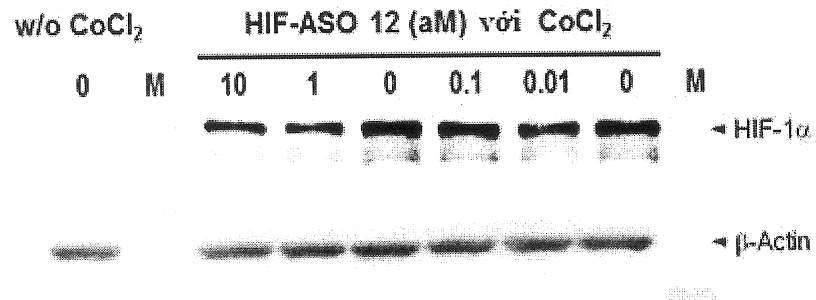


Hình 20A**Hình 20B**

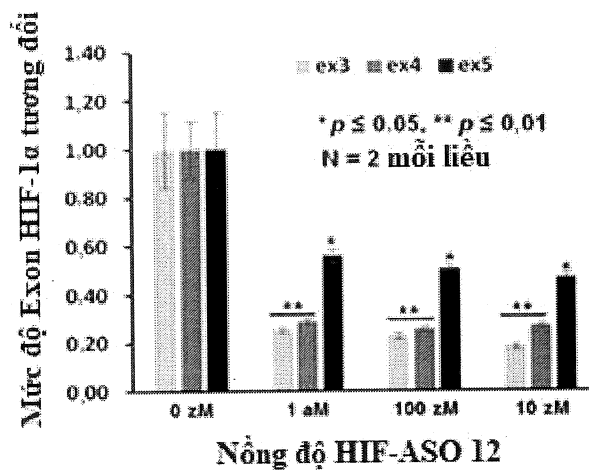
Hình 22A

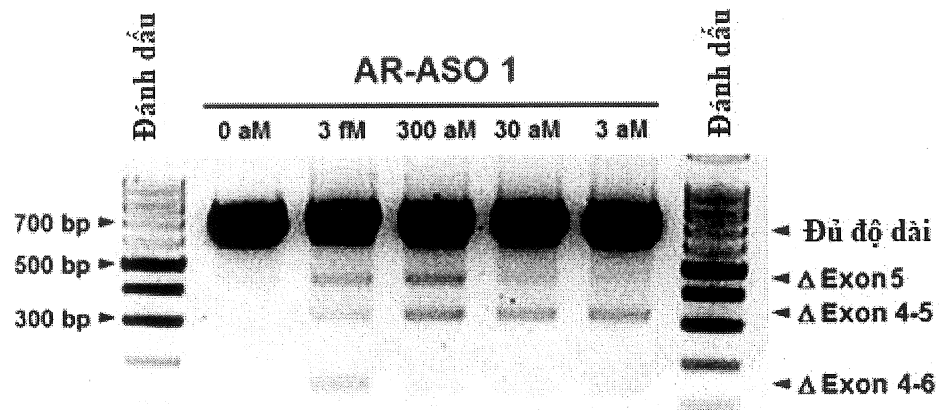
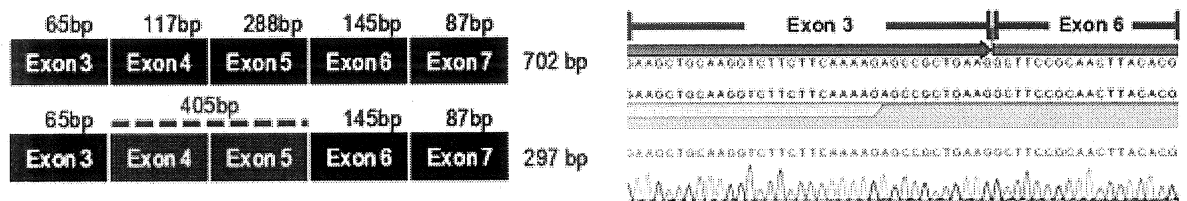
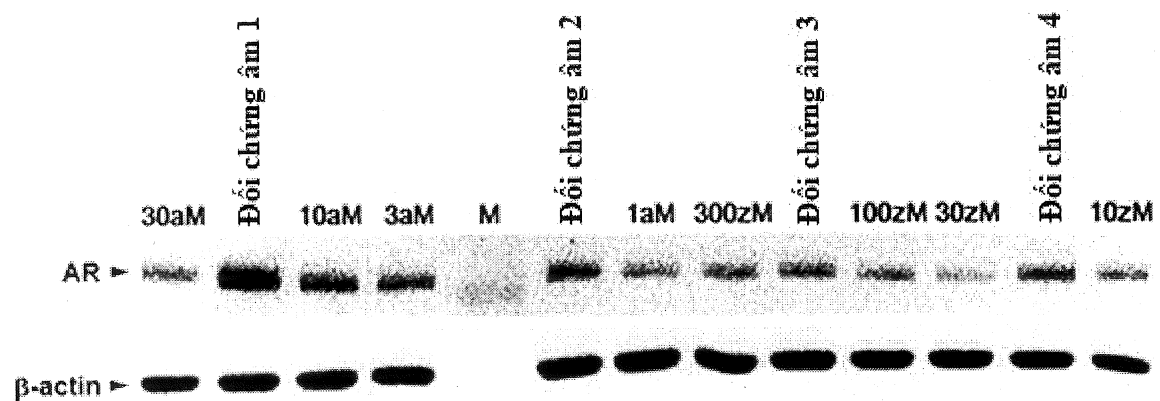


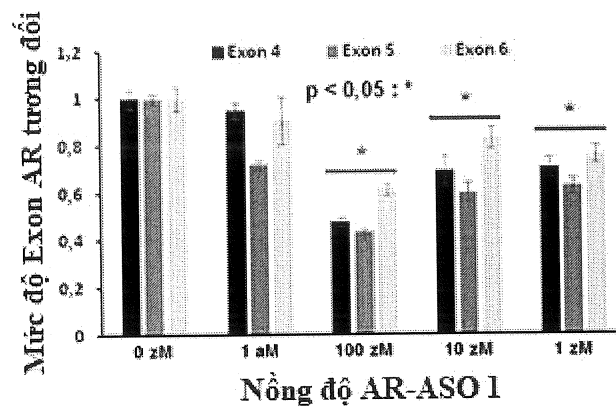
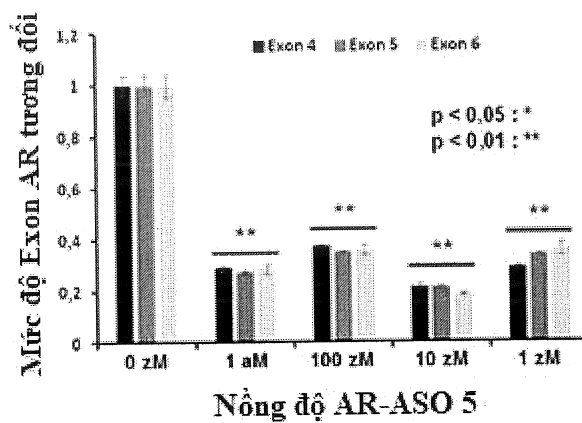
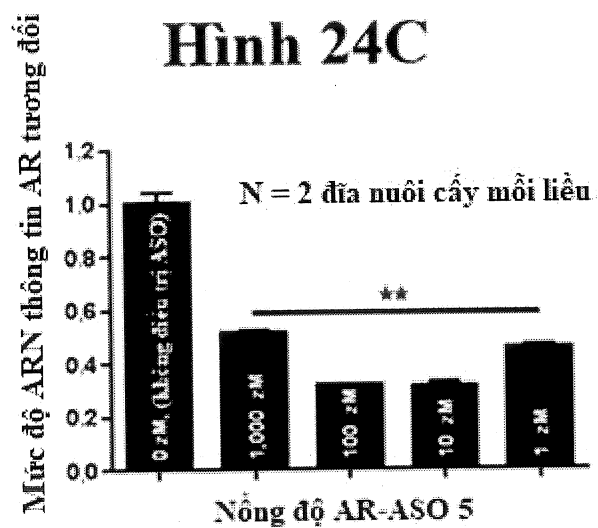
Hình 22B



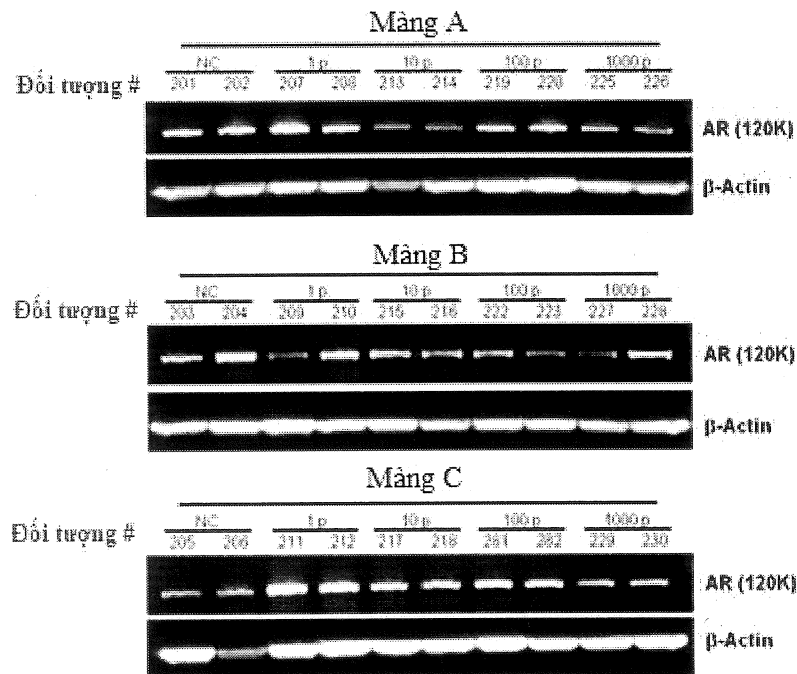
Hình 22C



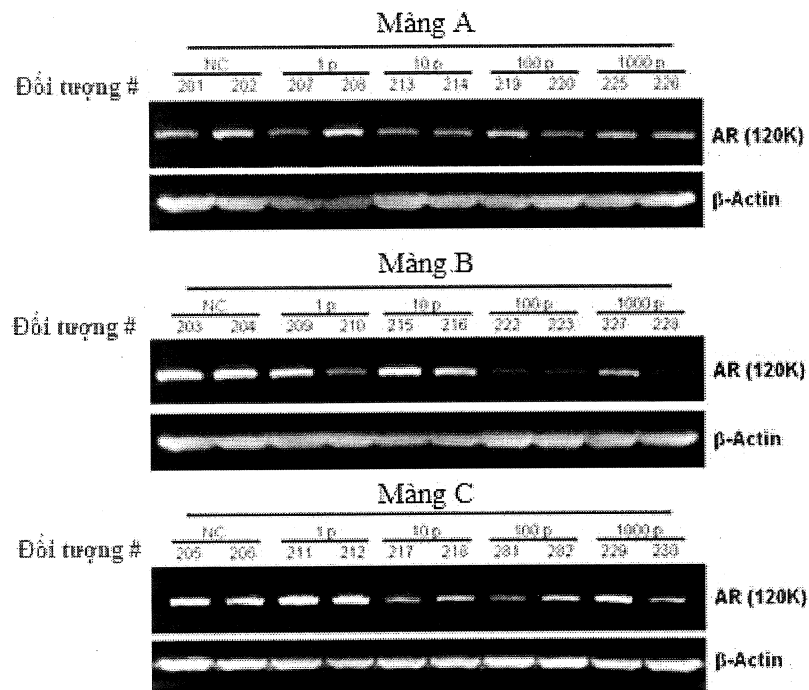
Hình 23A**Hình 23B****Hình 23C**

Hình 24A**Hình 24B****Hình 24C**

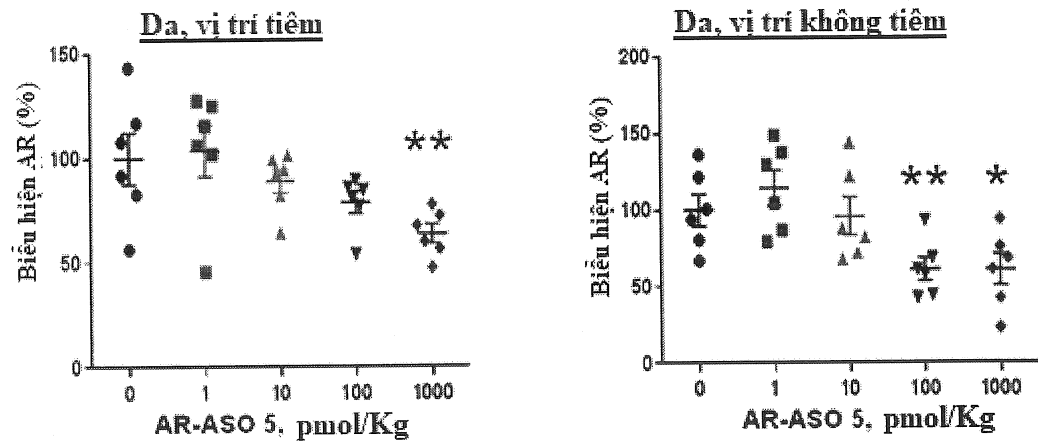
Hình 25A



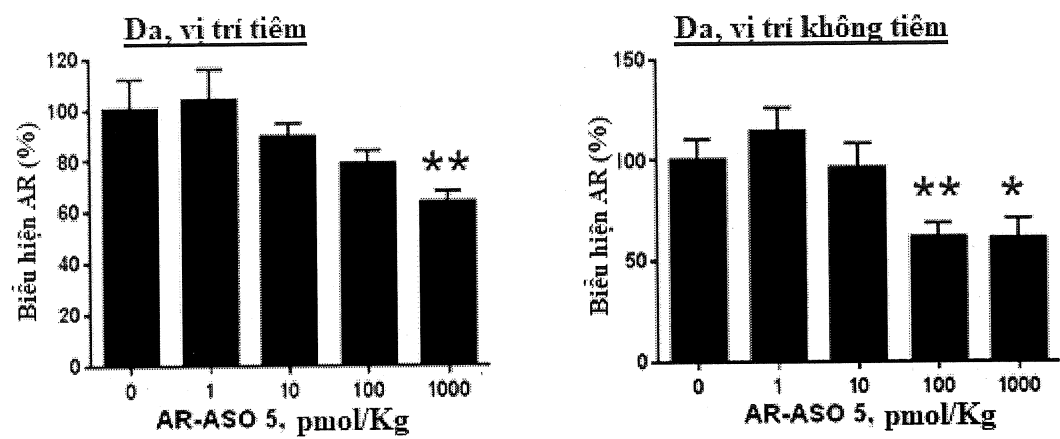
Hình 25B



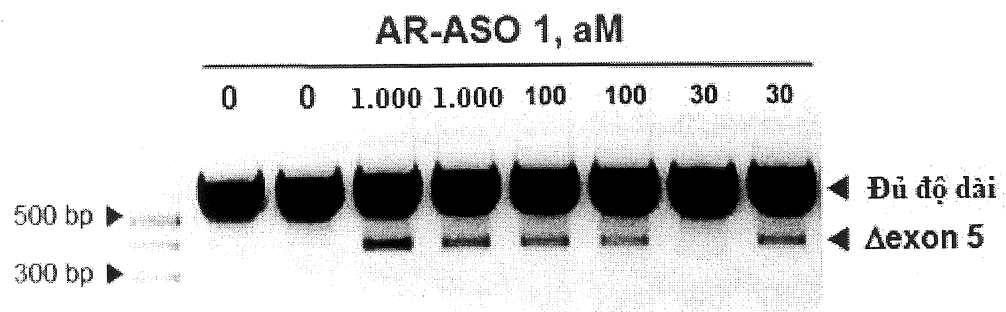
Hình 26A



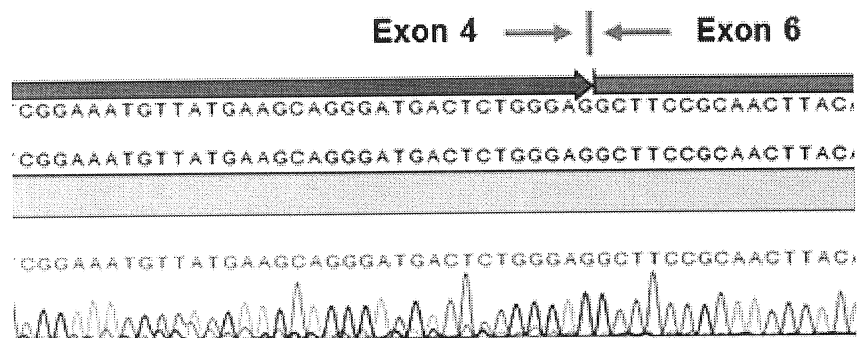
Hình 26B



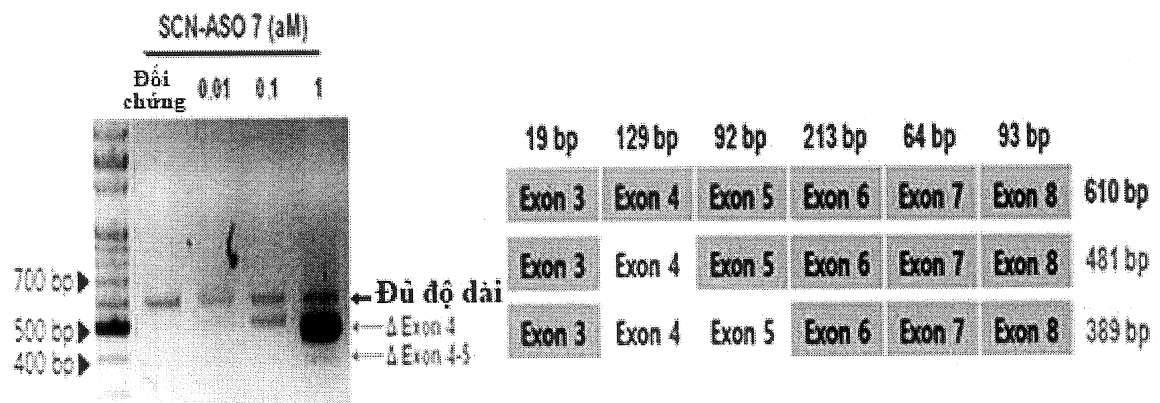
Hình 27A



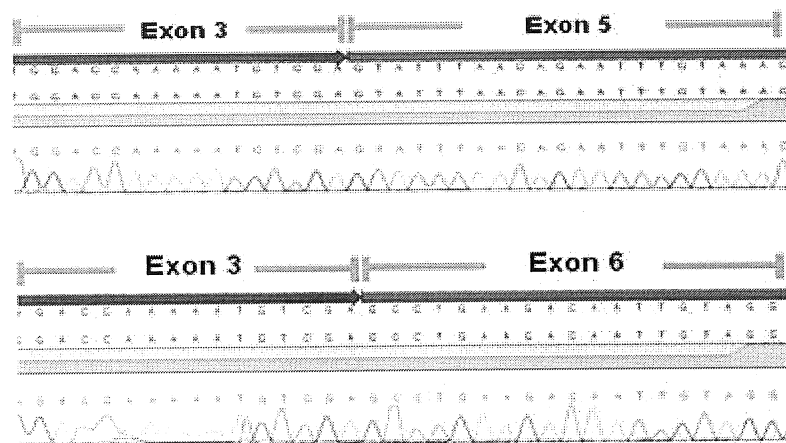
Hình 27B

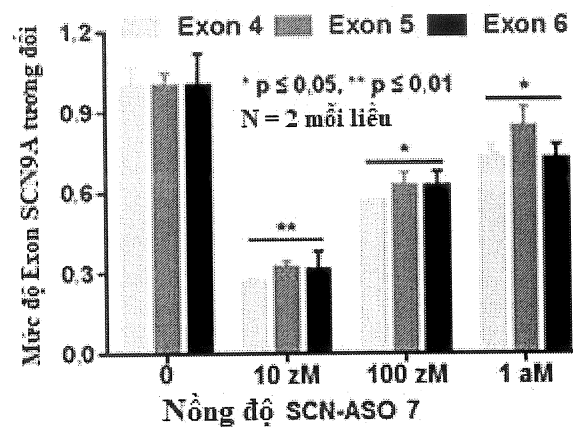
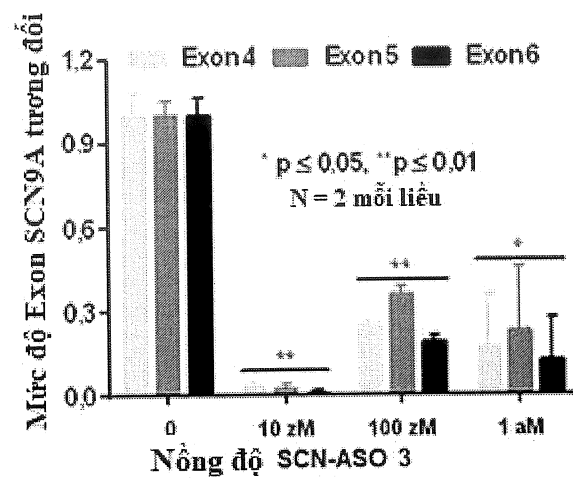
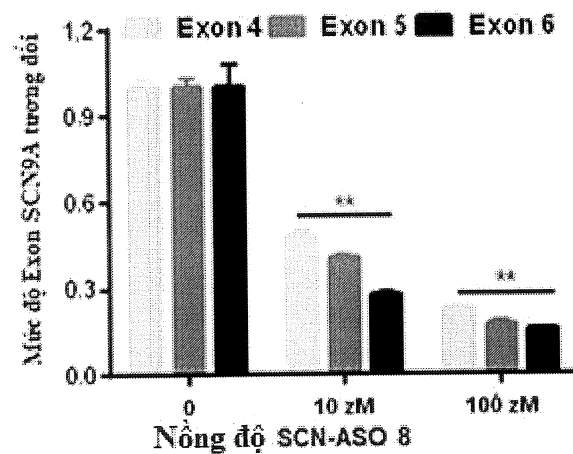


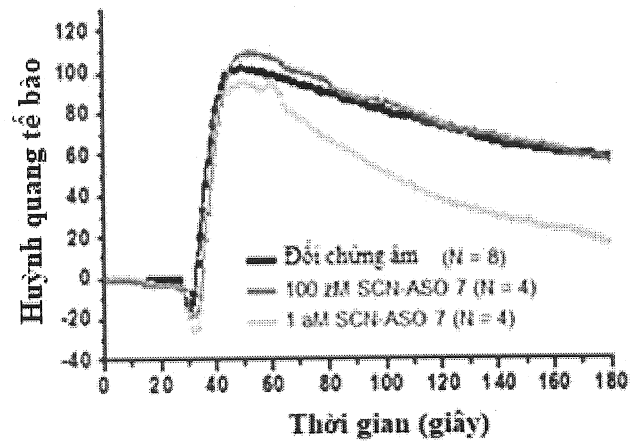
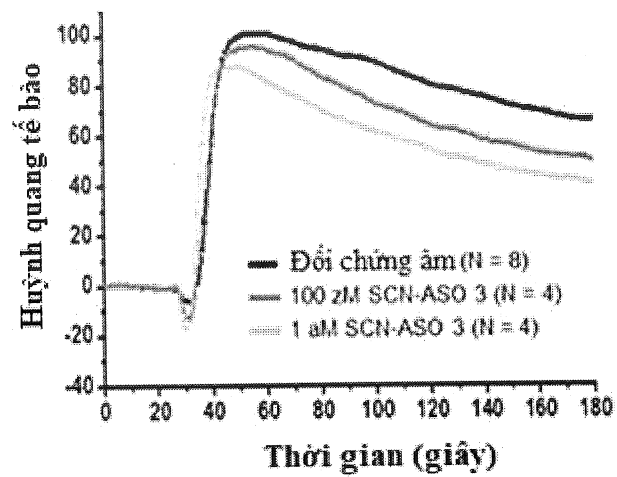
Hình 28A



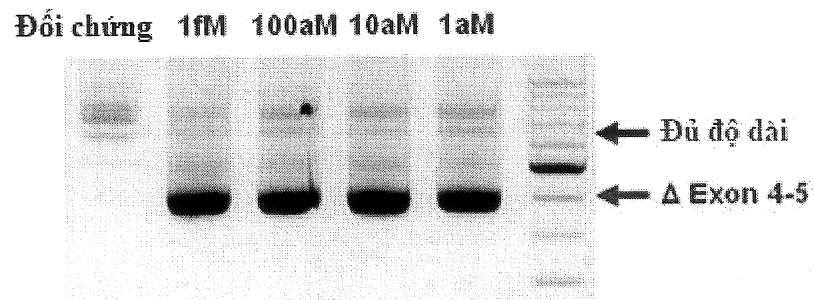
Hình 28B



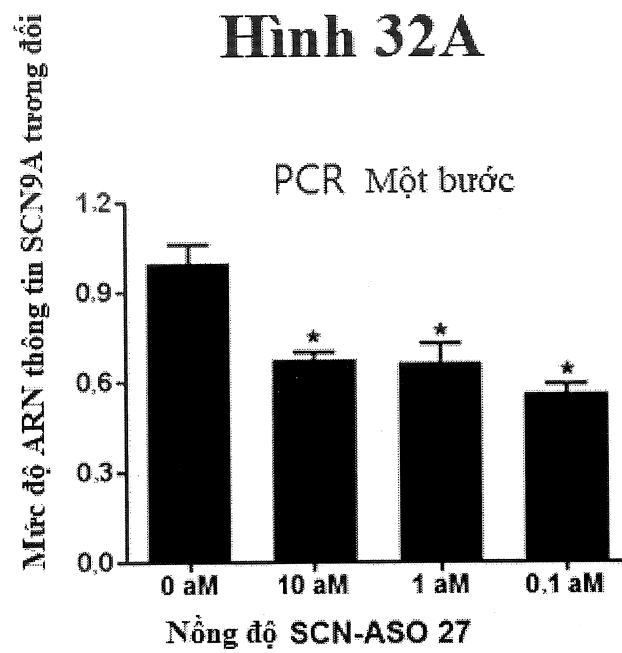
Hình 29A**Hình 29B****Hình 29C**

Hình 30A**Hình 30B**

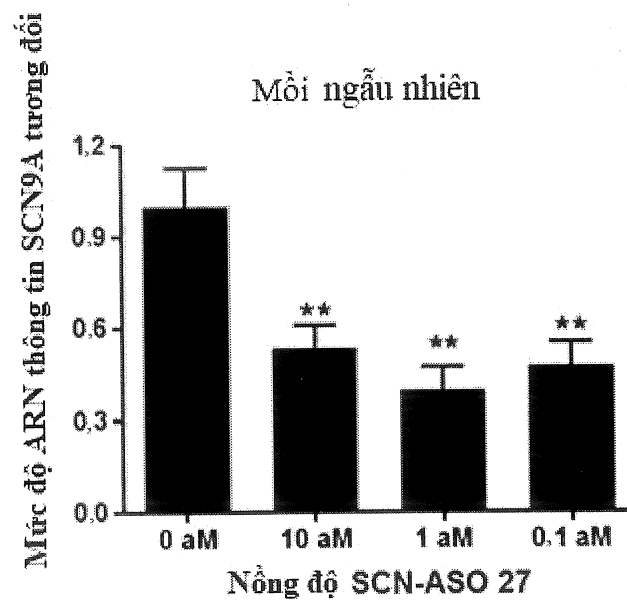
Hình 31C



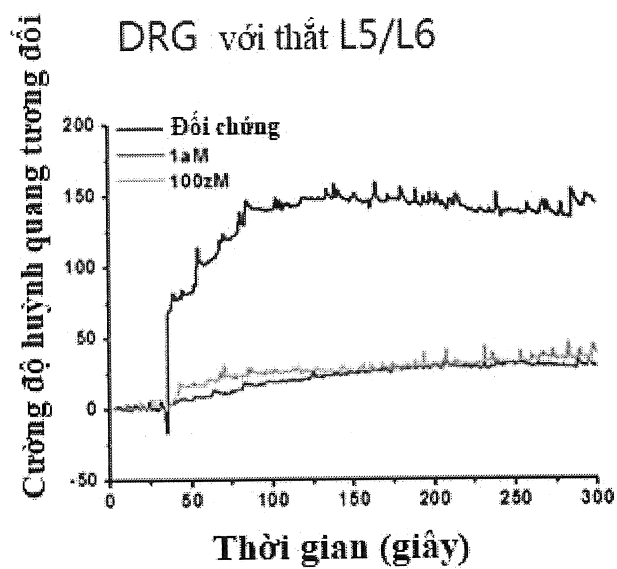
Hình 32A



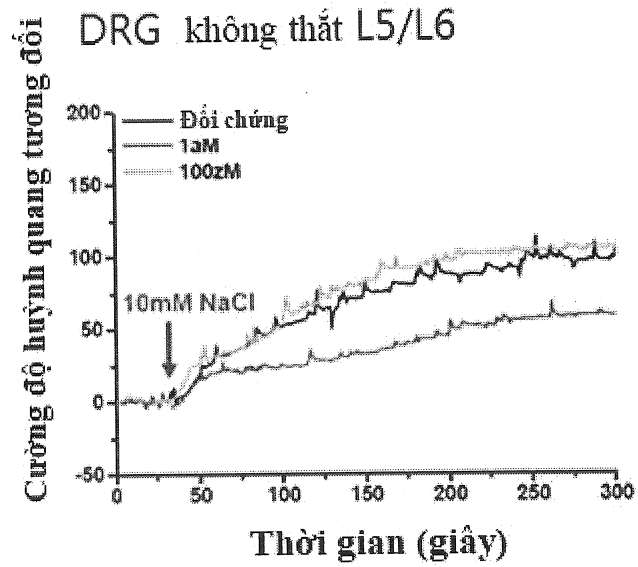
Hình 32B



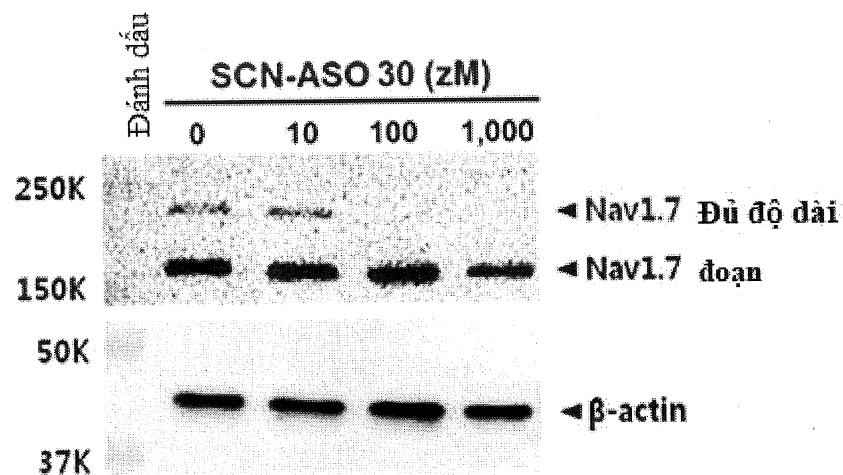
Hình 33A

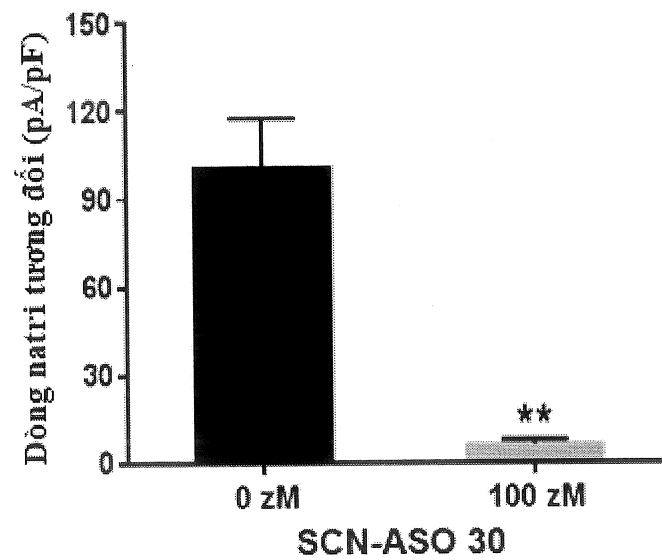
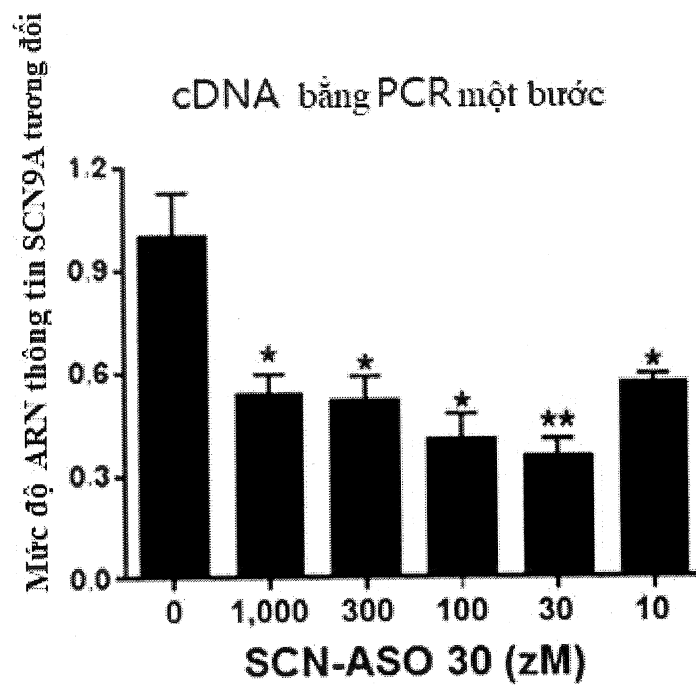


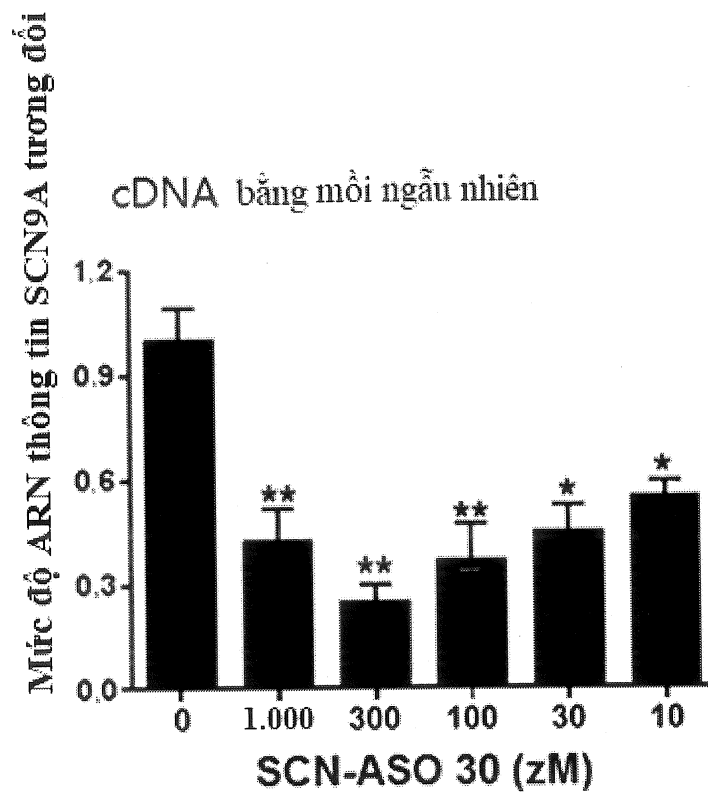
Hình 33B



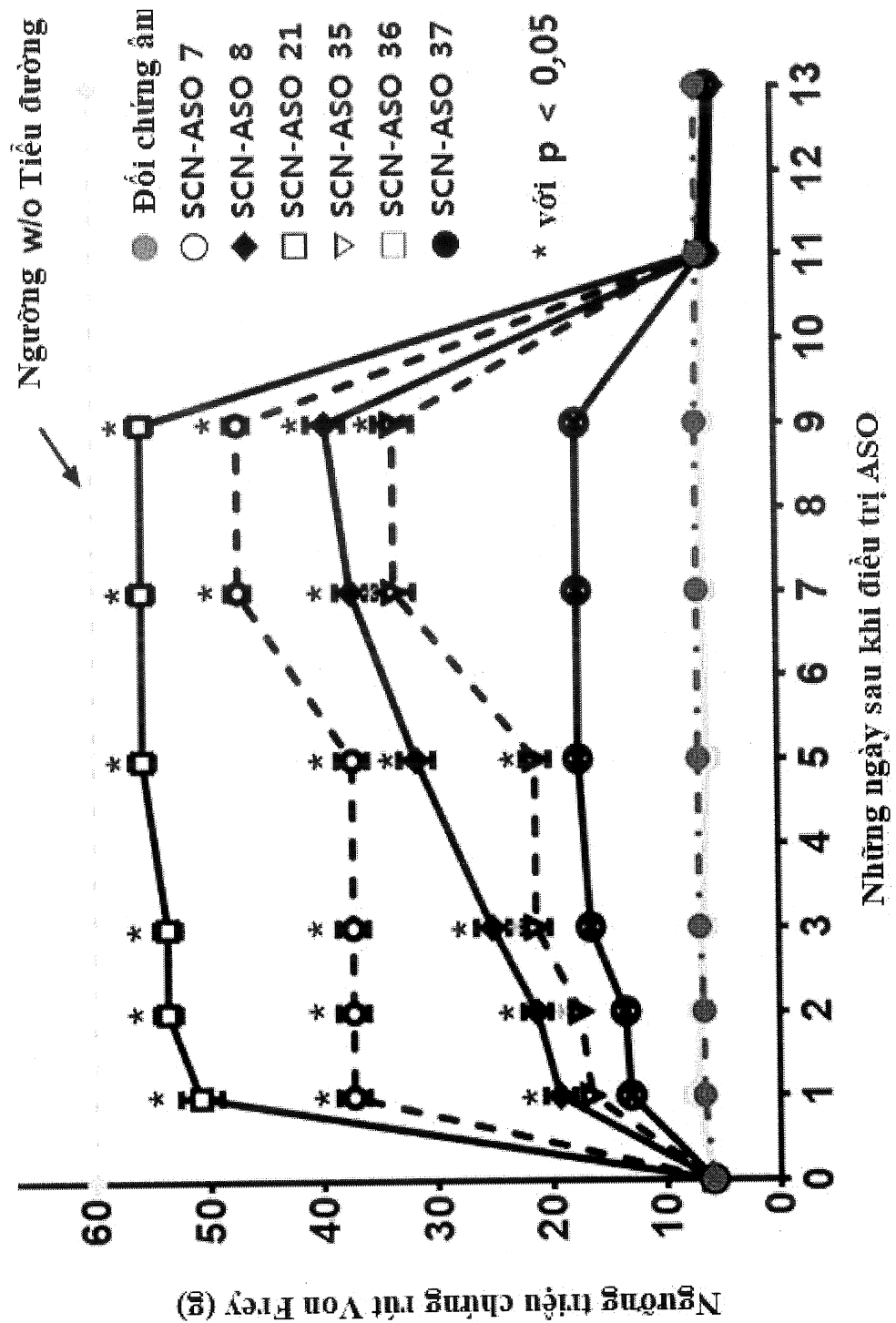
Hình 34A



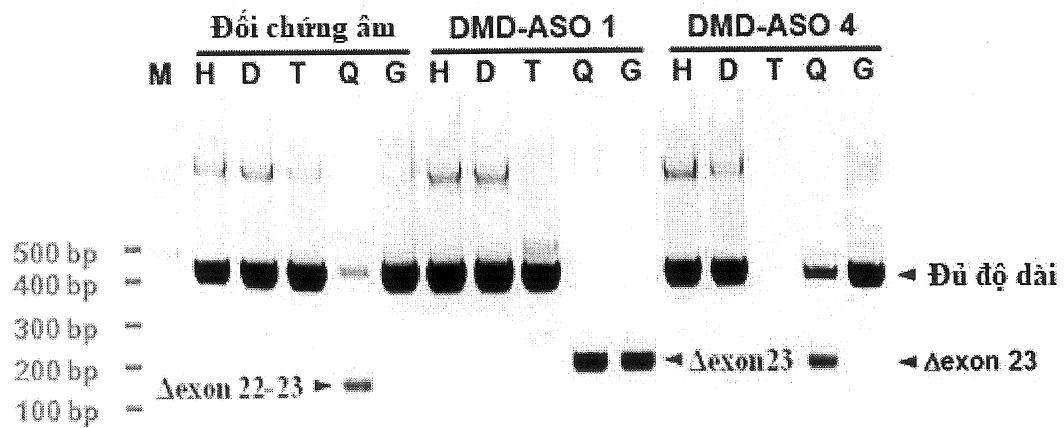
Hình 34B**Hình 35A**

Hình 35B

Hình 36



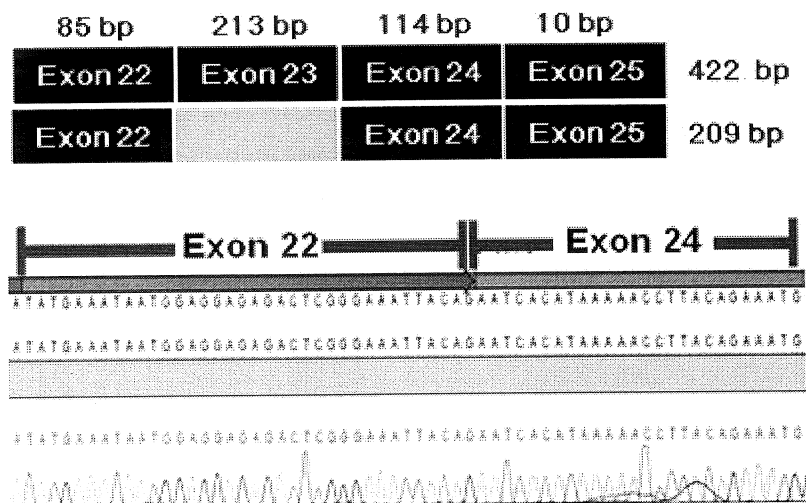
Hình 37A

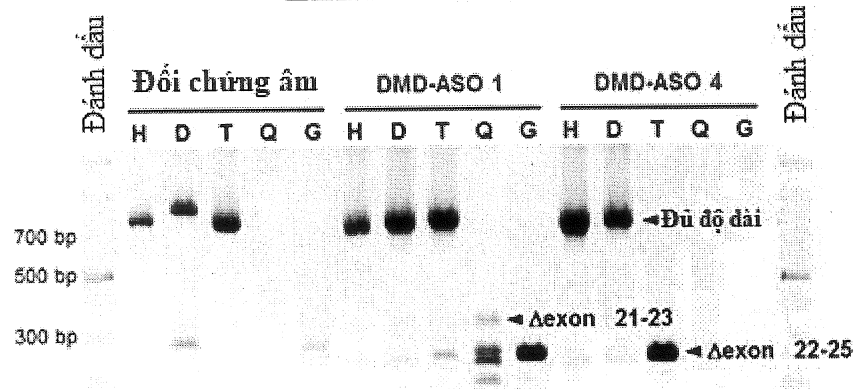
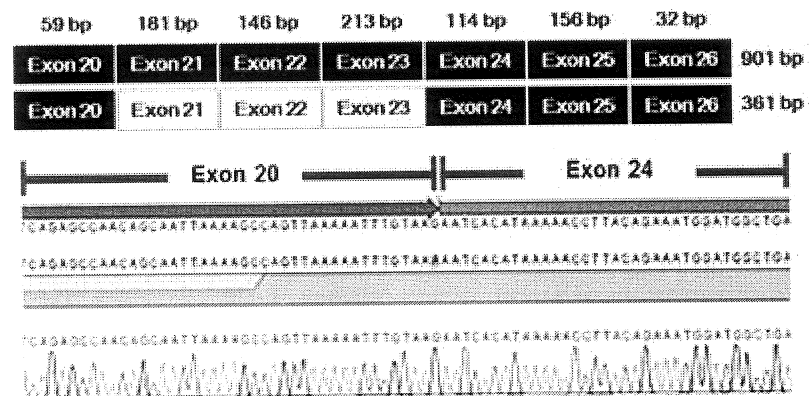
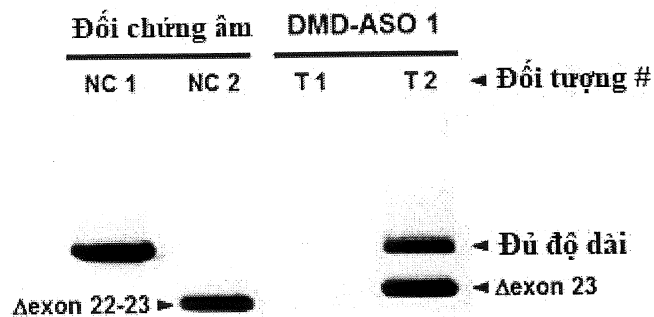


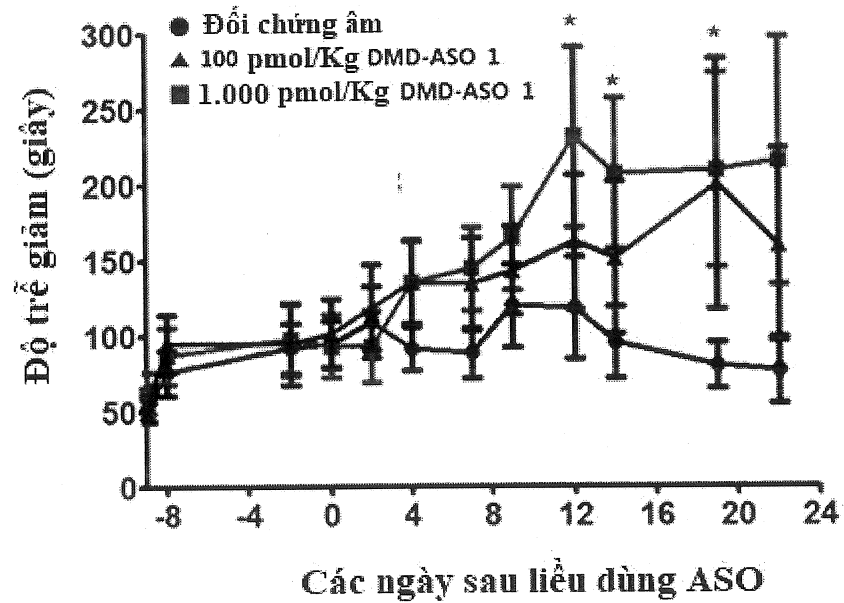
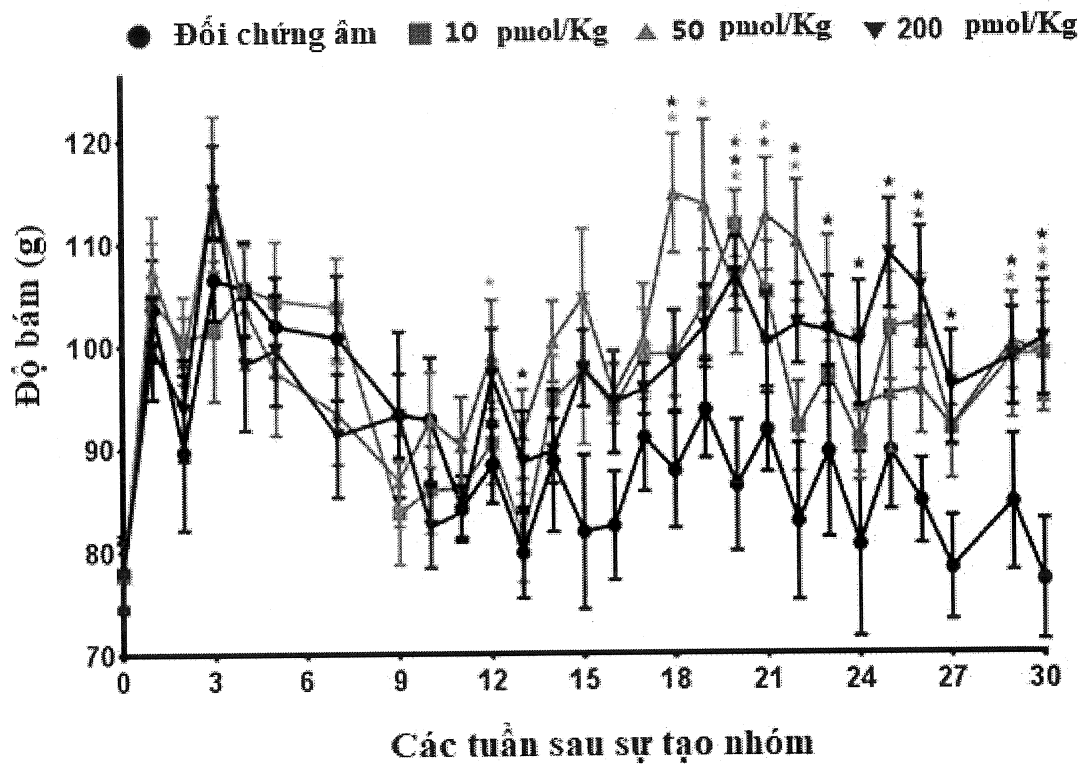
M: Đánh dấu (thang 100 bp), H: tim, D: Cơ hoành, T: cơ ba đầu

Q: Cơ tứ đầu, G: Cơ bụng chân

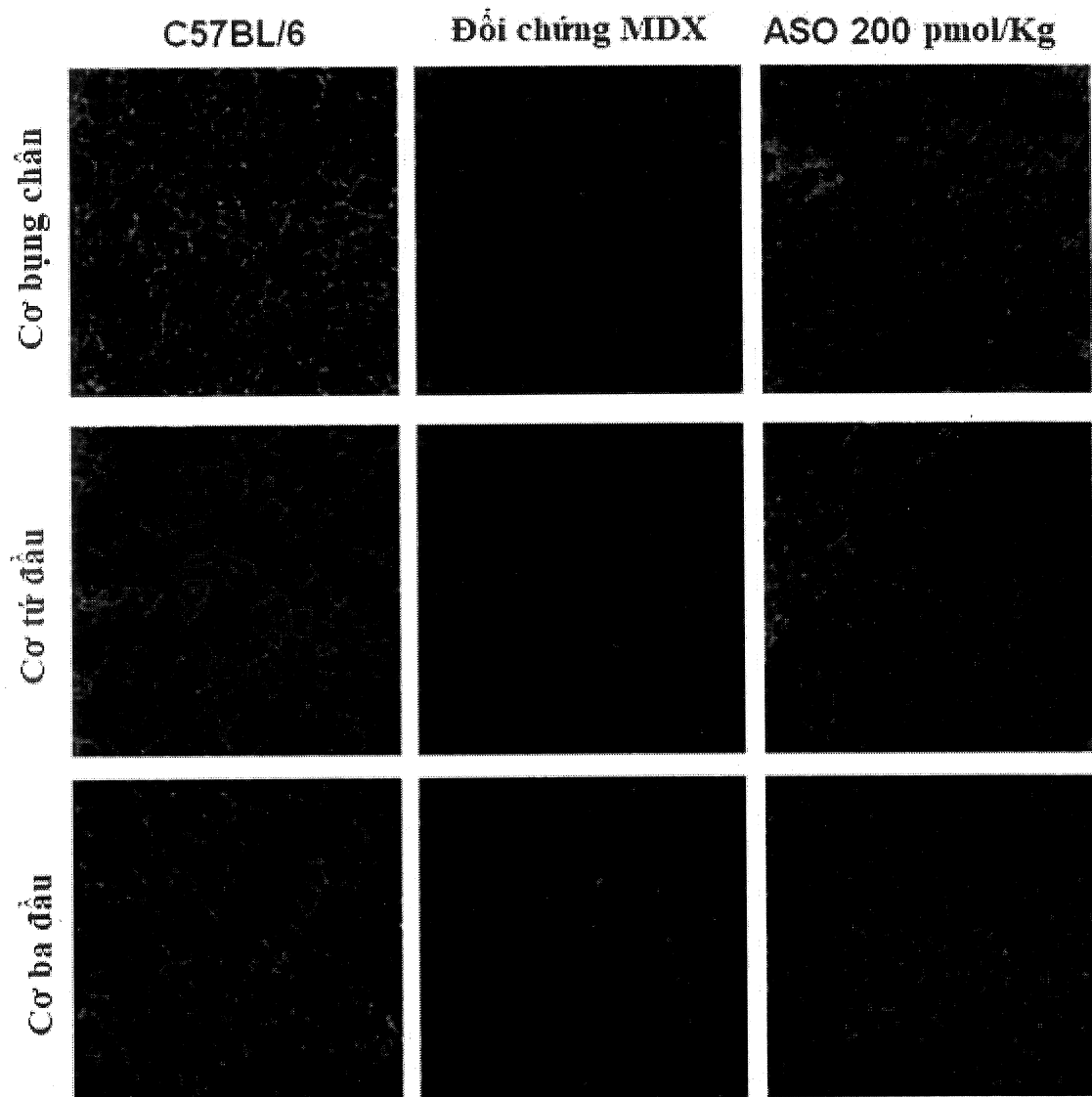
Hình 37B



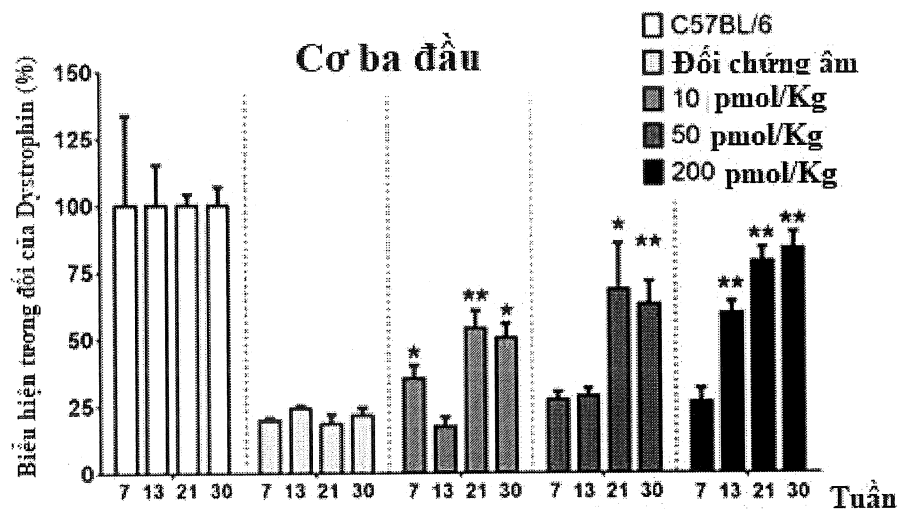
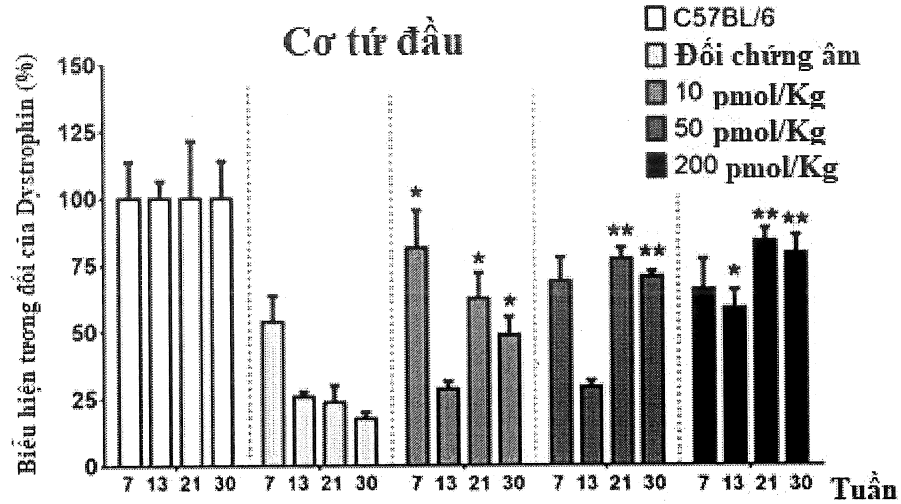
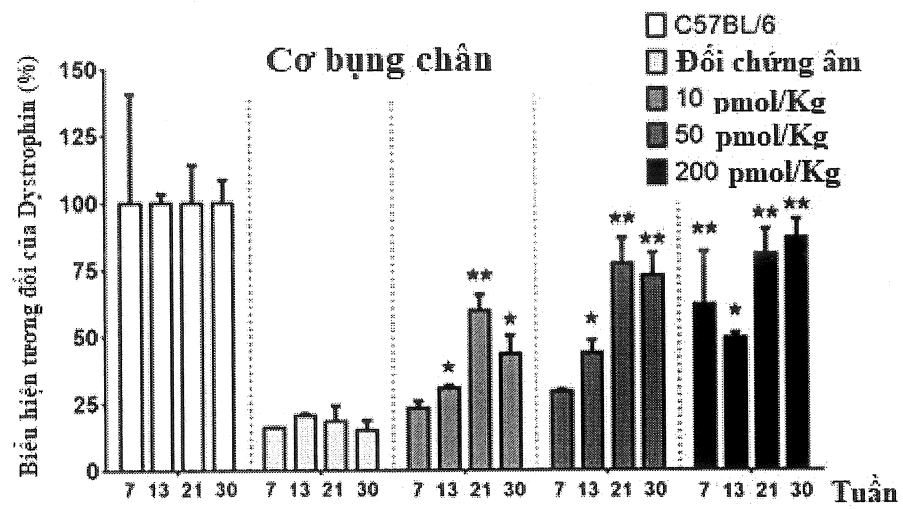
Hình 38A**Hình 38B****Hình 38C**

Hình 39A**Hình 39B**

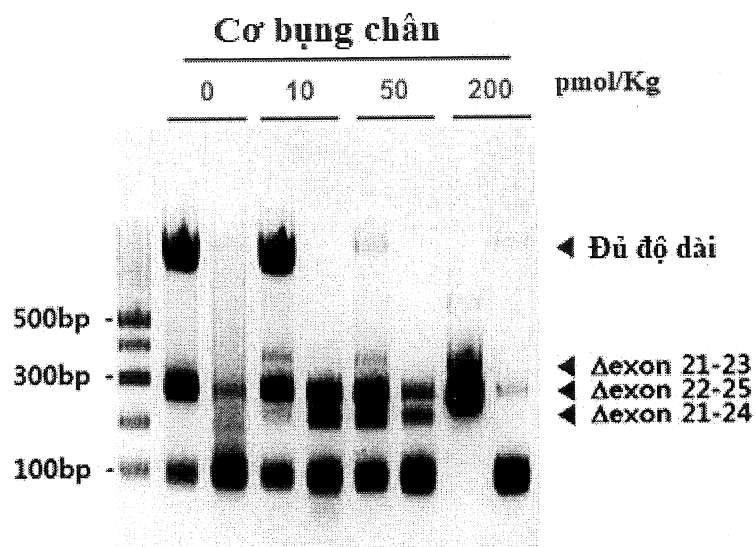
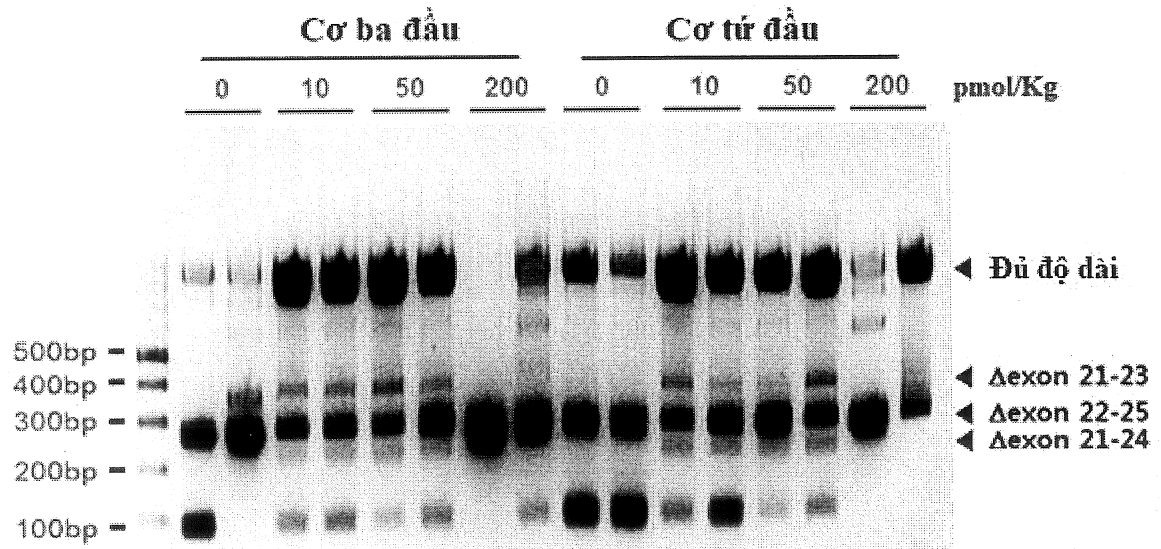
Hình 40

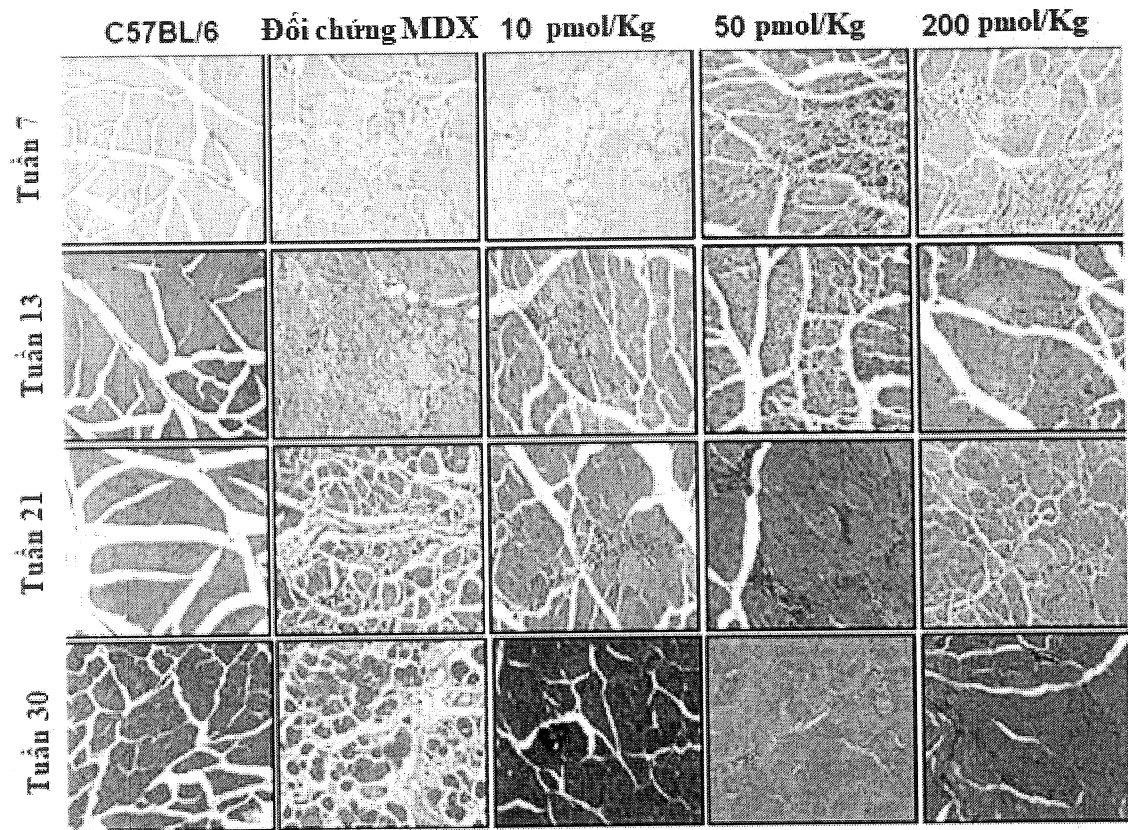


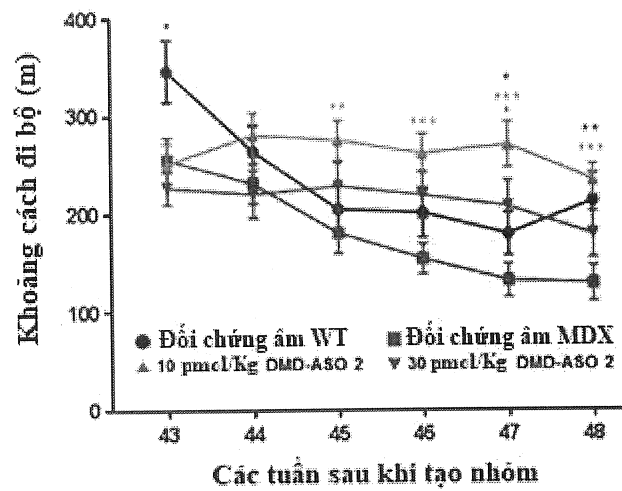
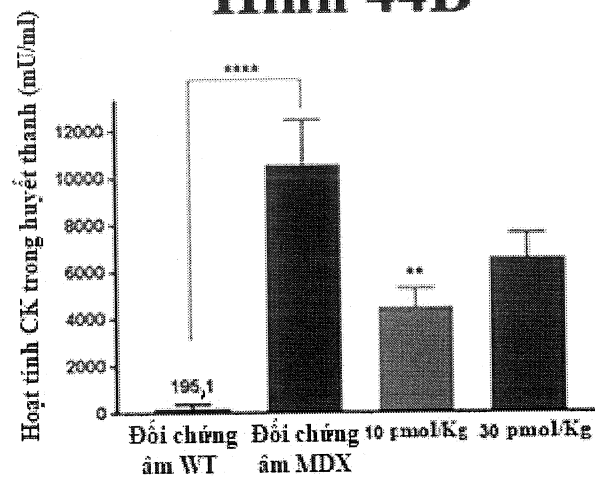
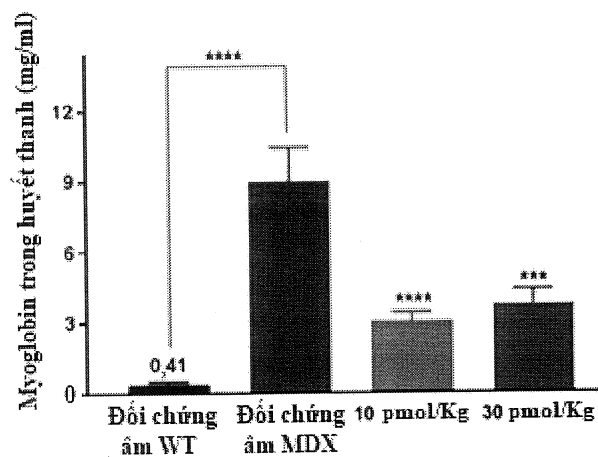
Hình 41



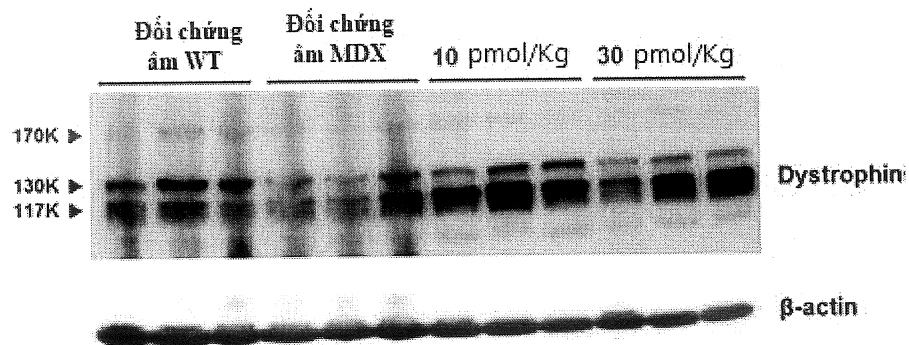
Hình 42



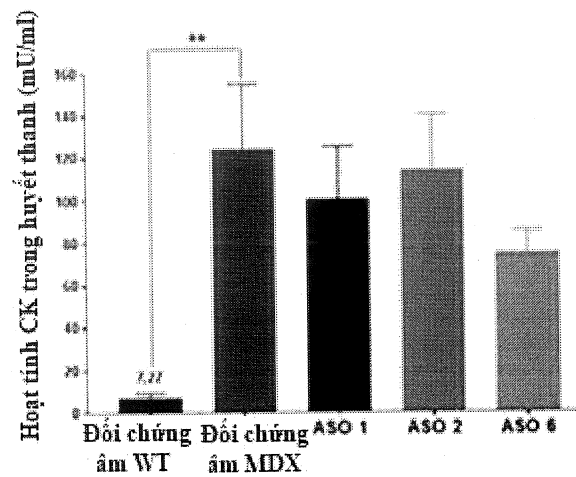
Hình 43

Hình 44A**Hình 44B****Hình 44C**

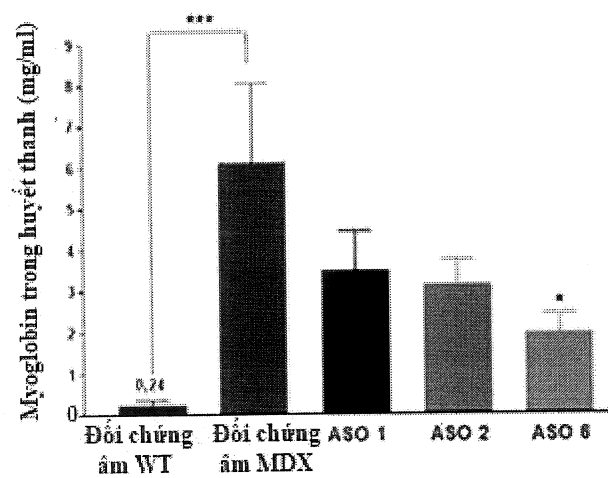
Hình 45A



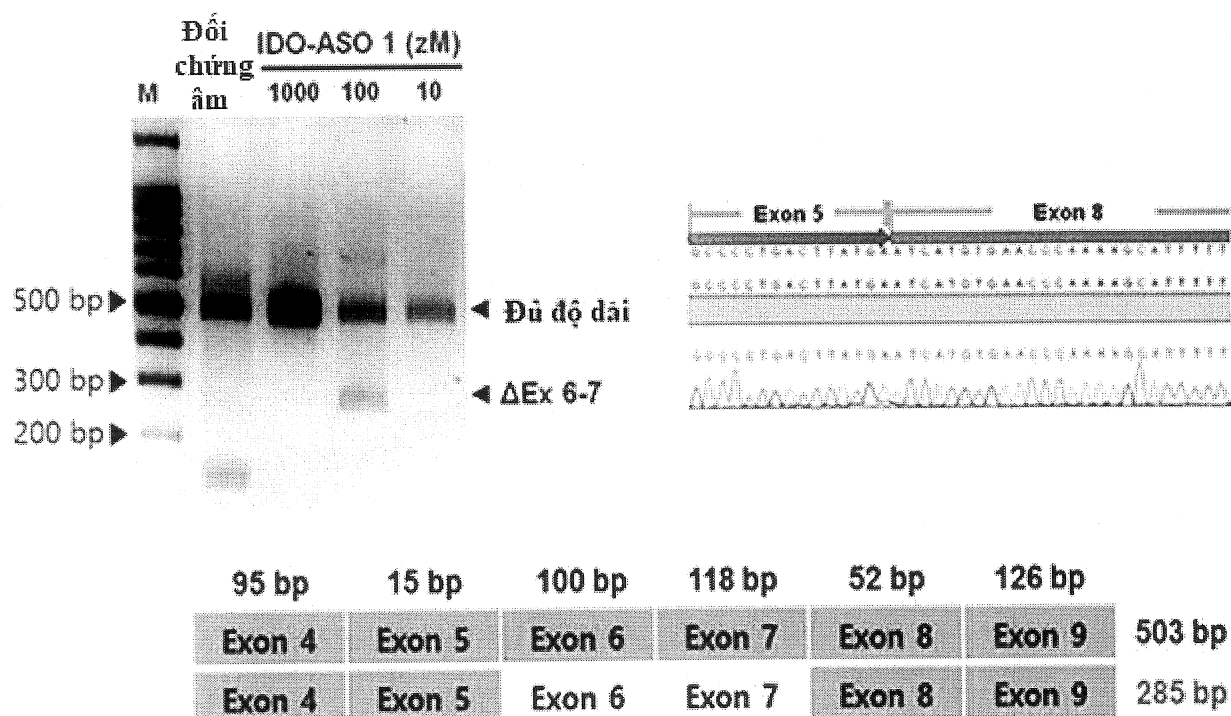
Hình 45B



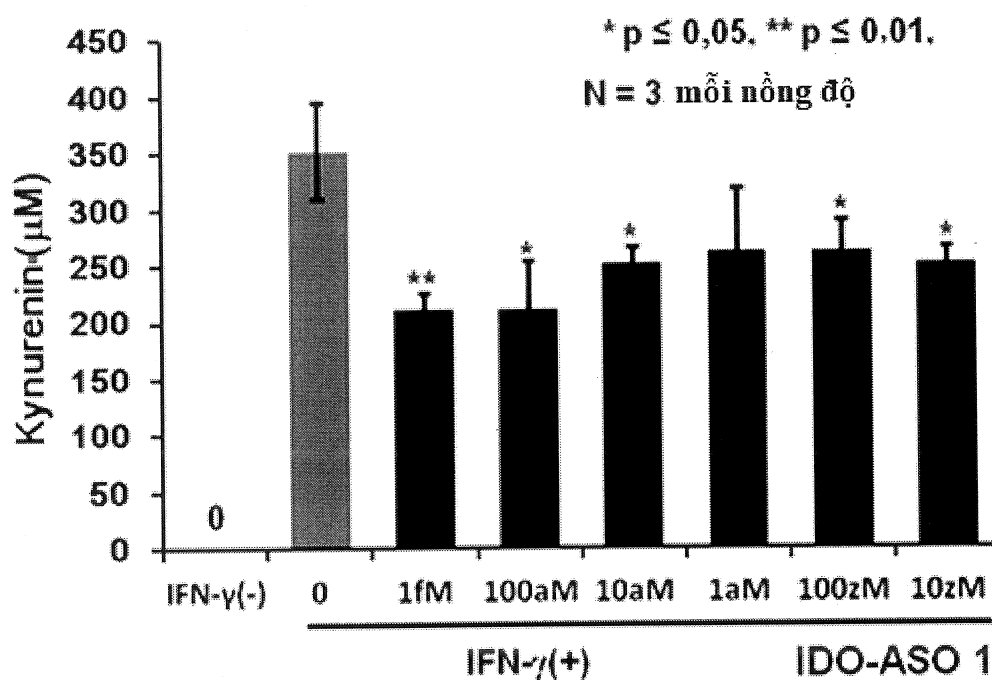
Hình 45C



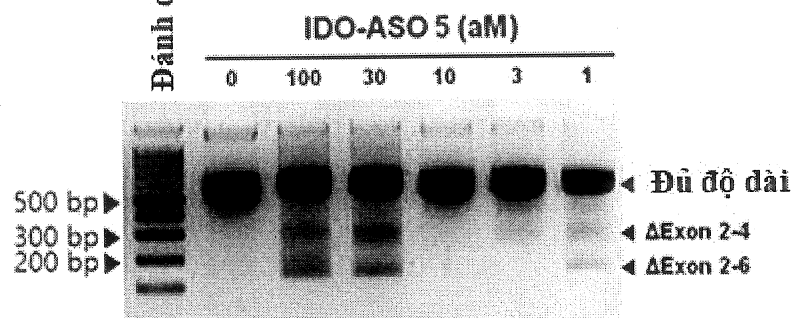
Hình 46A



Hình 46B

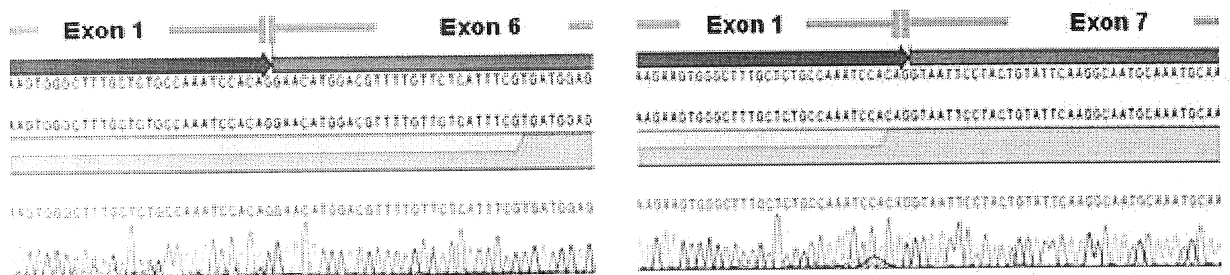


Hình 47A

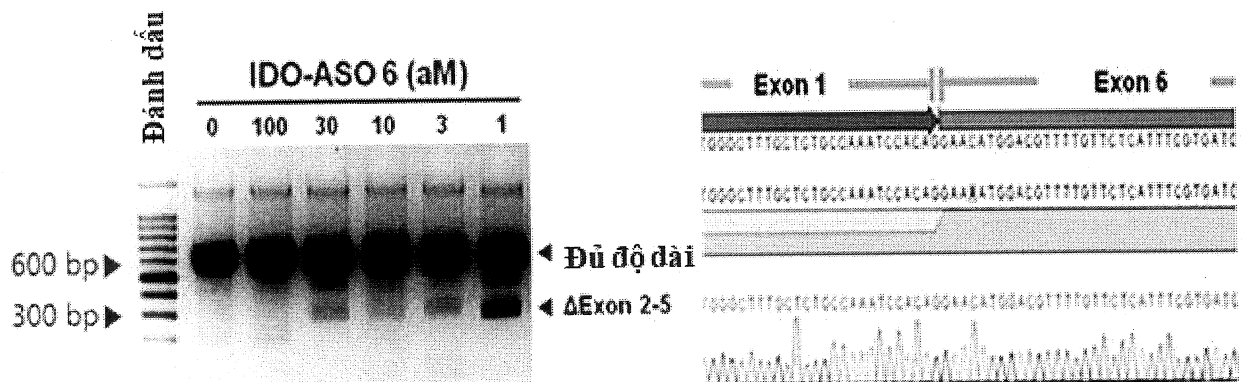


40 bp	96 bp	120 bp	119 bp	15 bp	100 bp	118 bp	11 bp	
Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	619 bp
Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	284 bp
Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	169 bp

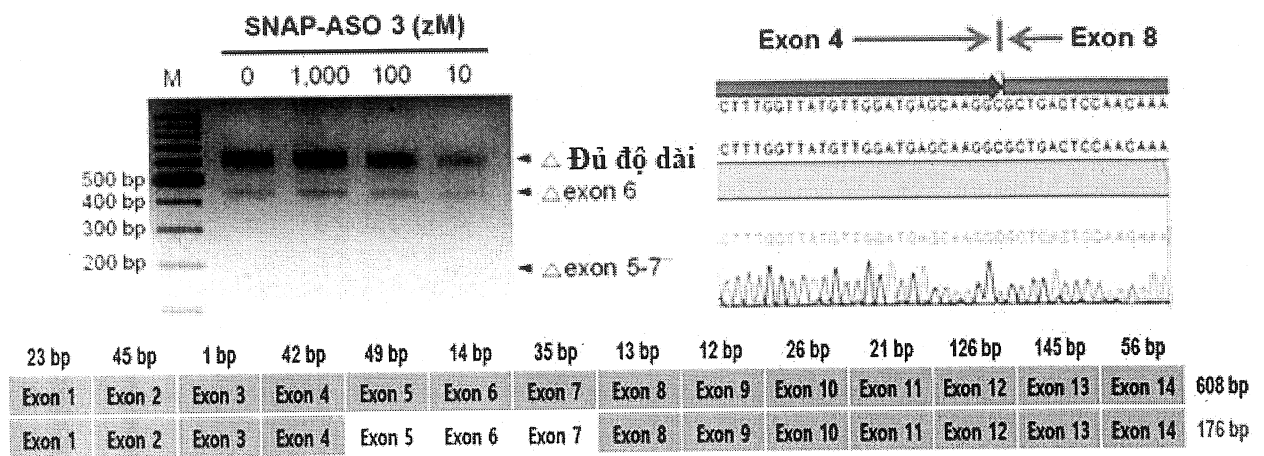
Hình 47B



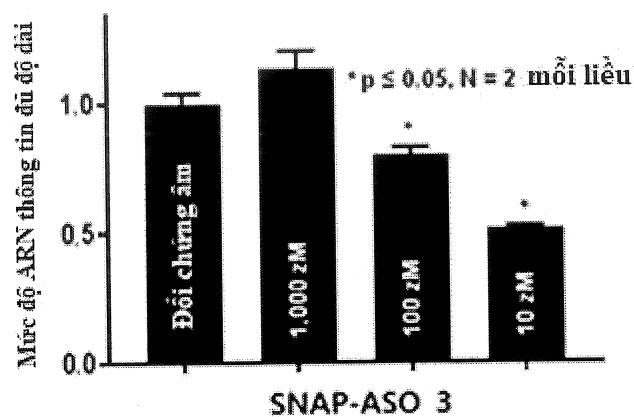
Hình 47C



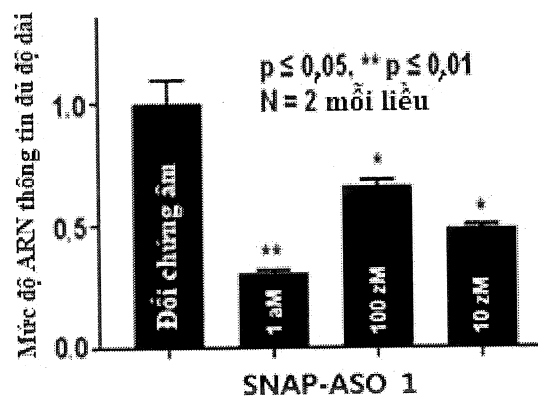
Hình 48A

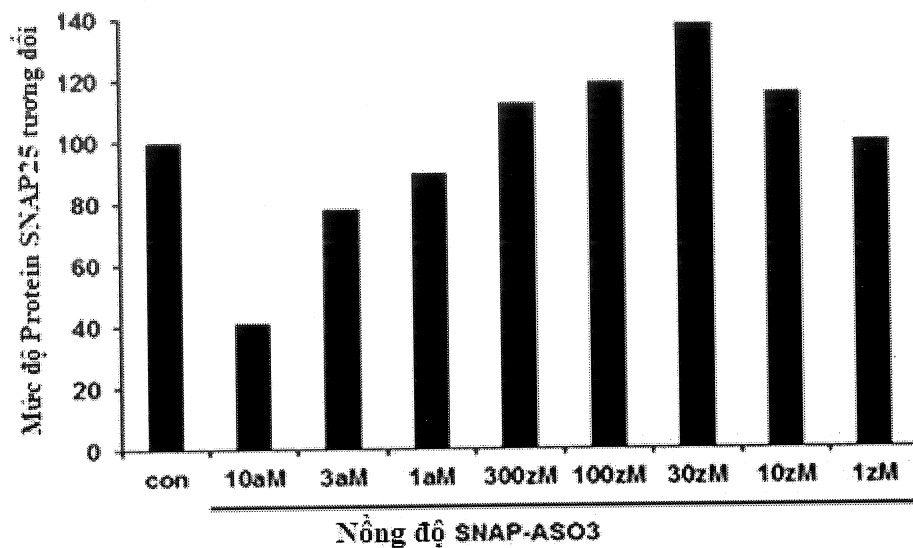
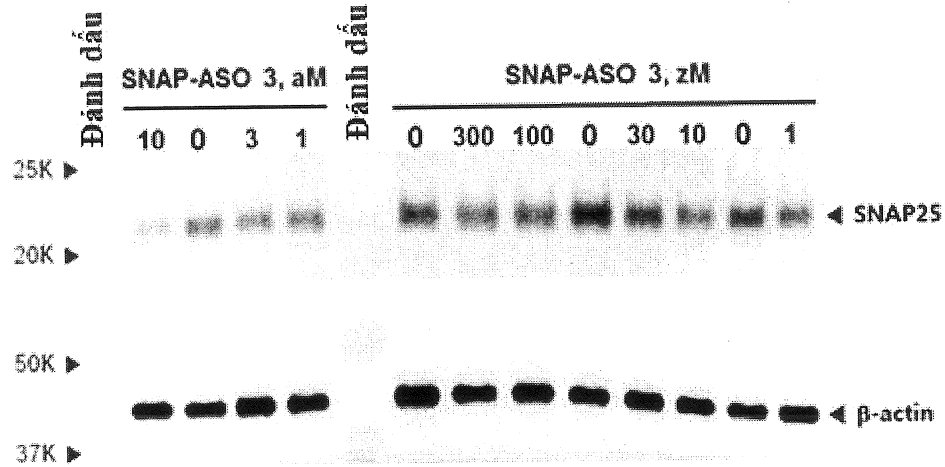
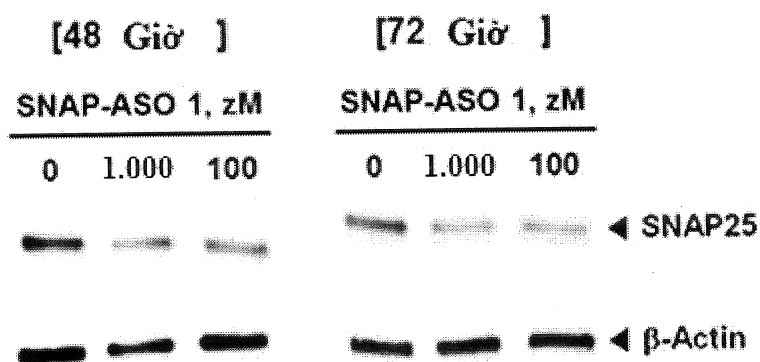


Hình 48B



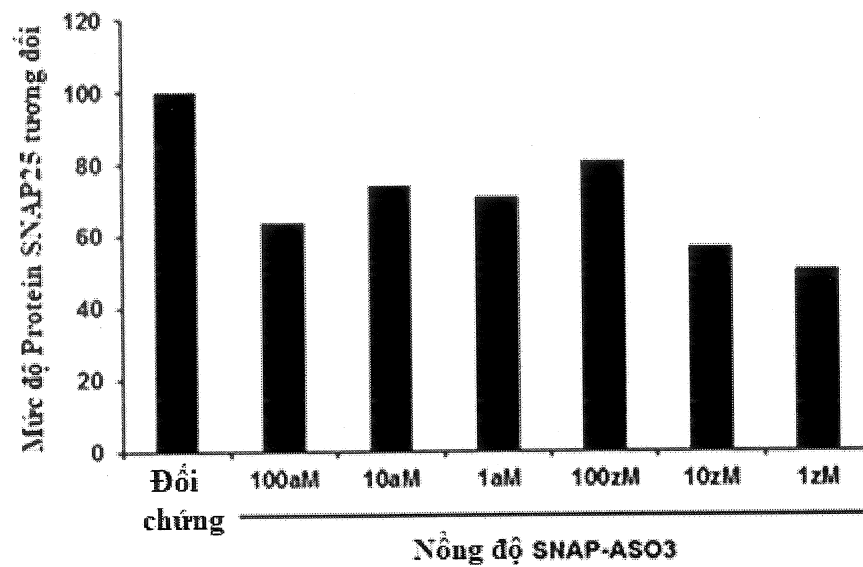
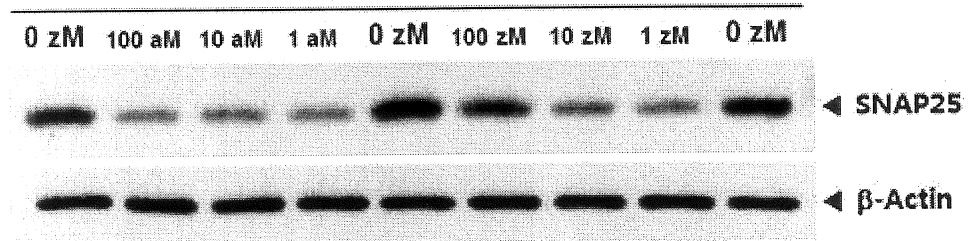
Hình 48C

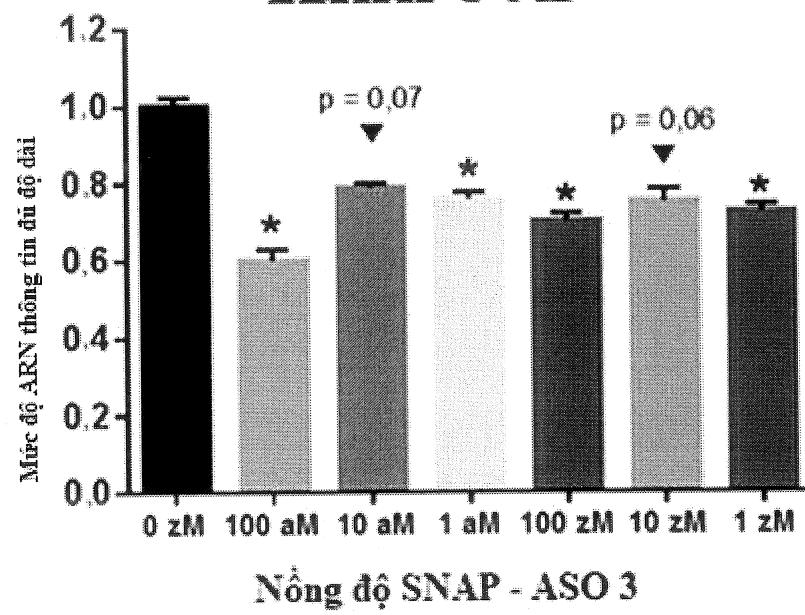


Hình 49A**Hình 49B**

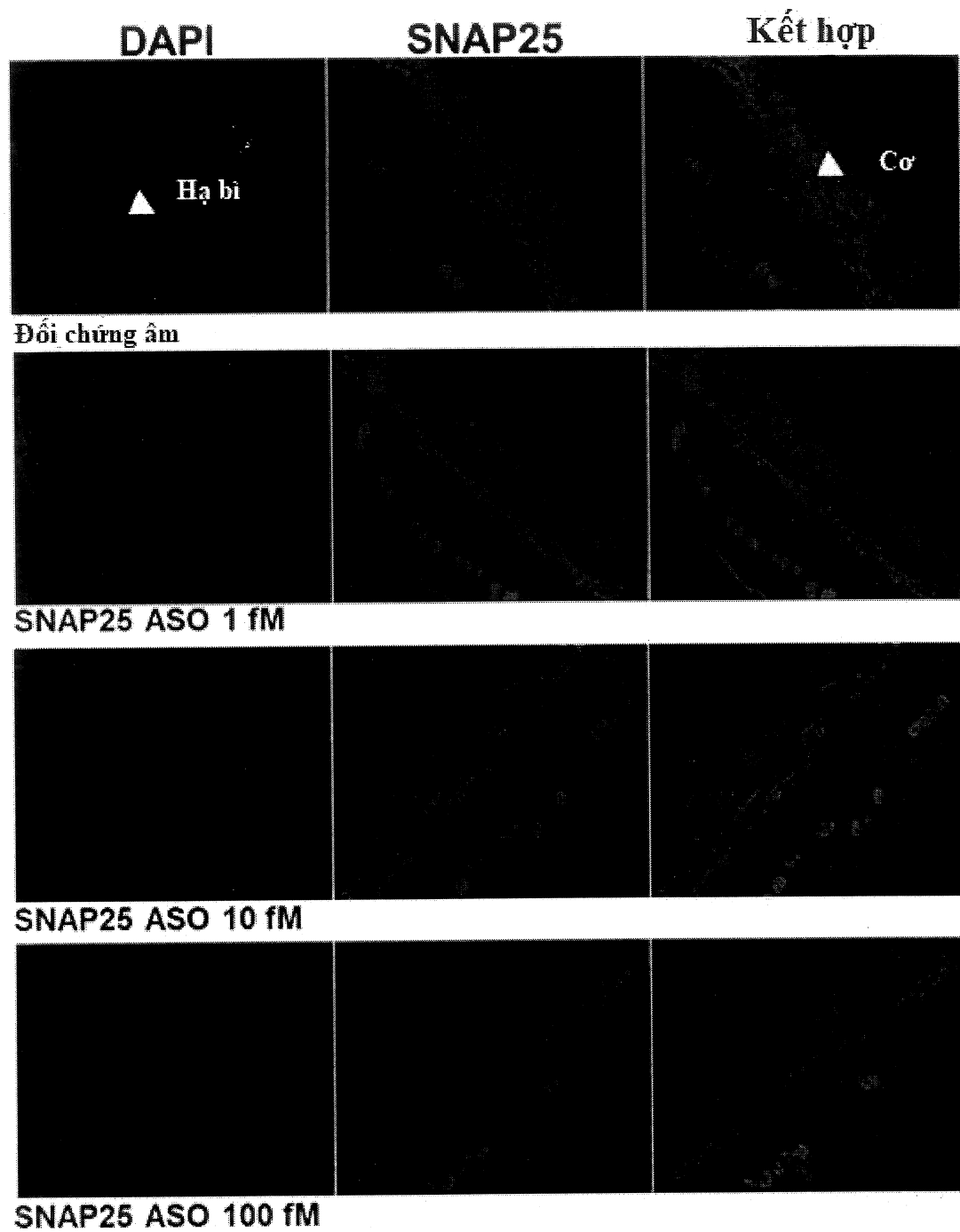
Hình 50A

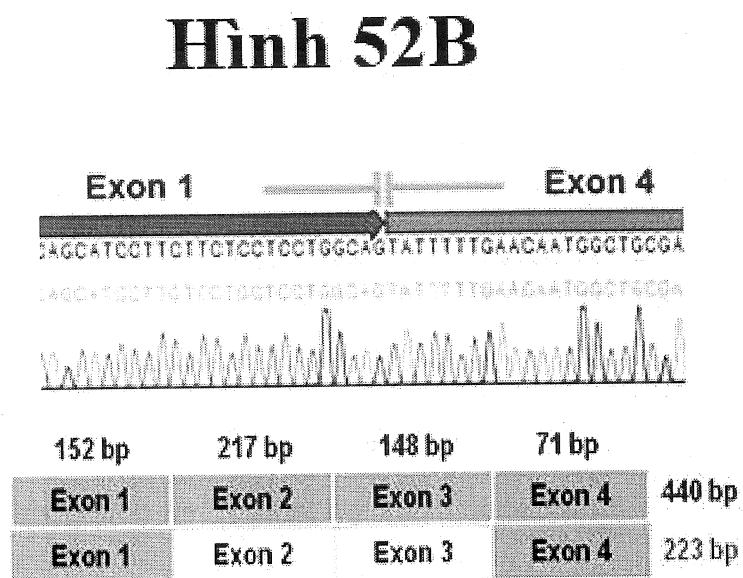
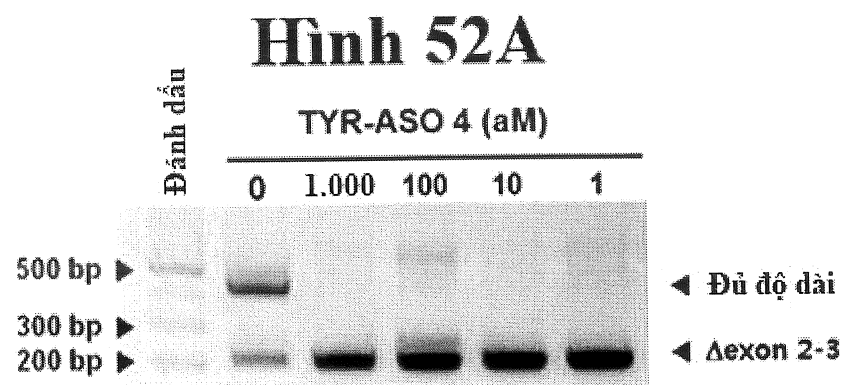
Nồng độ SNAP - ASO 3



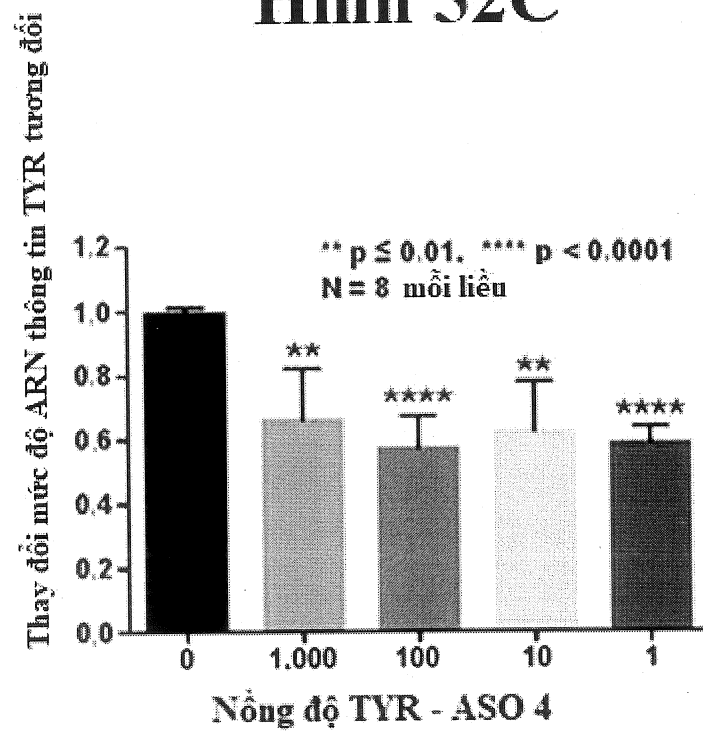
Hình 50B

Hình 51

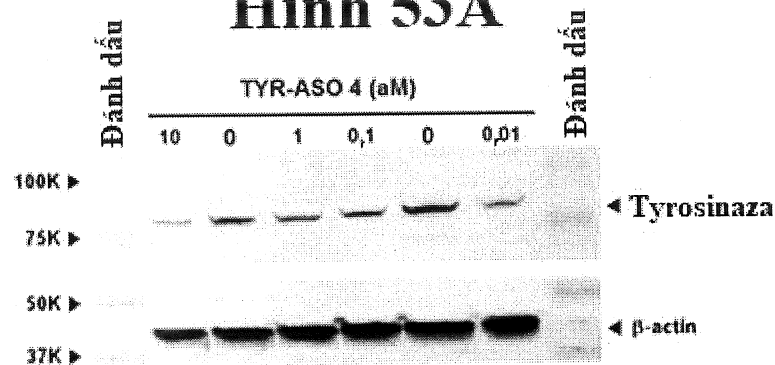


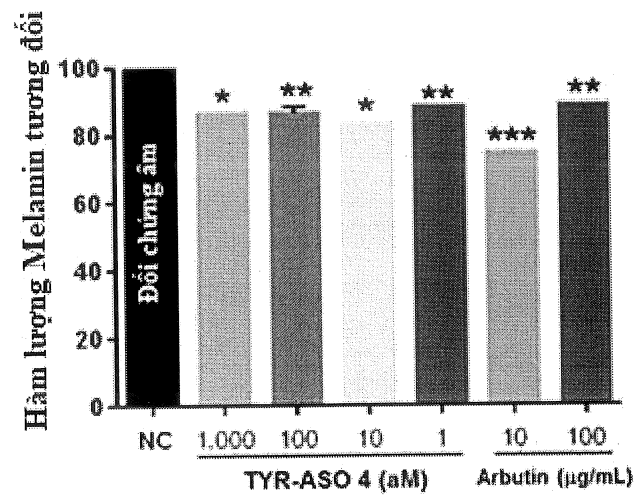
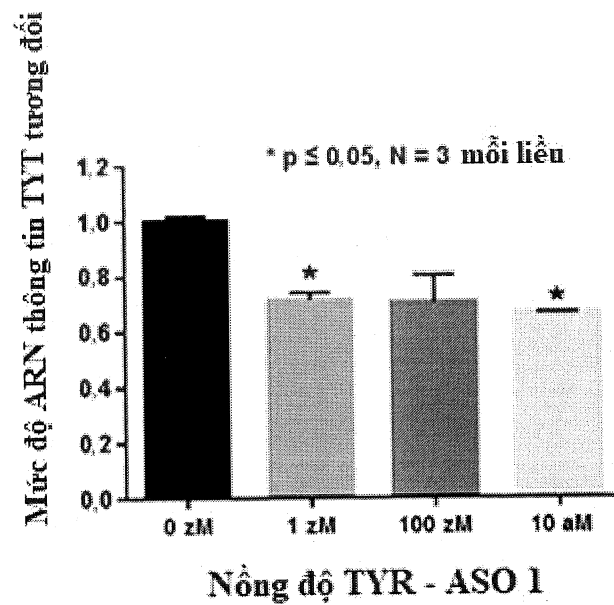


Hình 52C

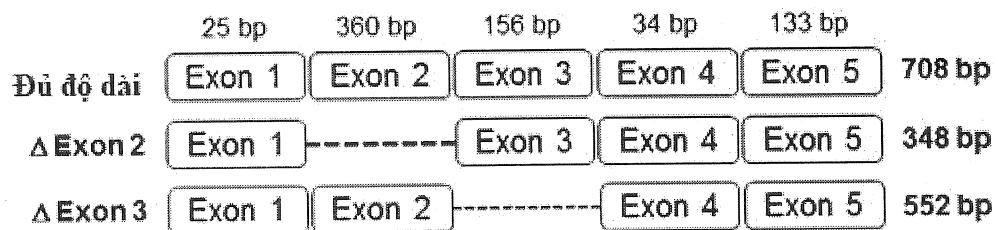
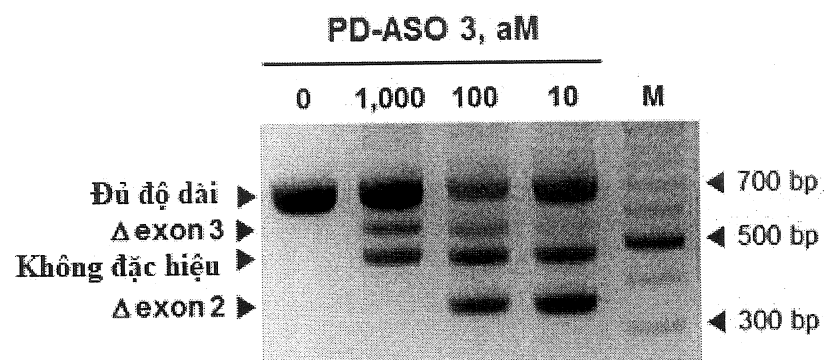


Hình 53A

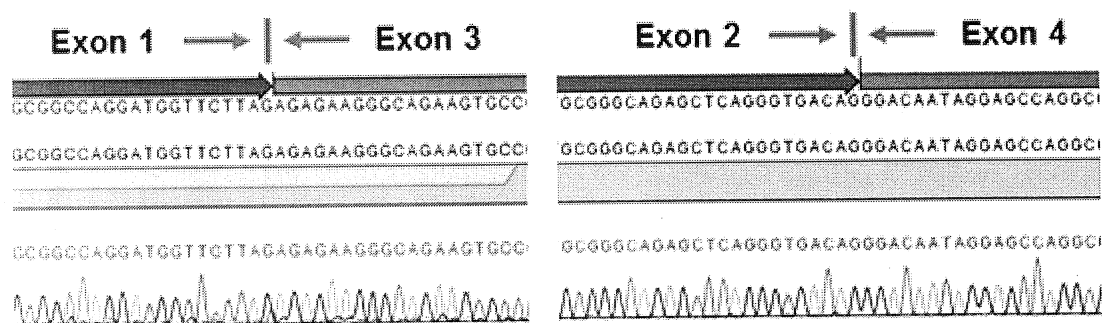


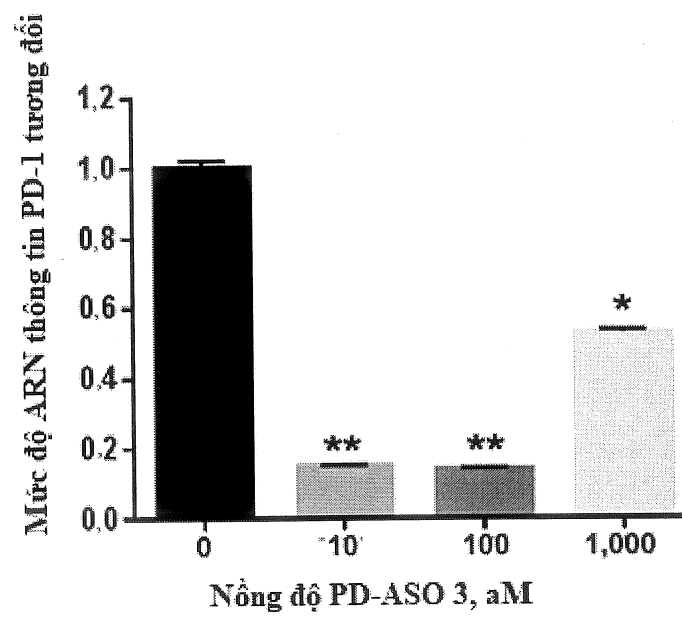
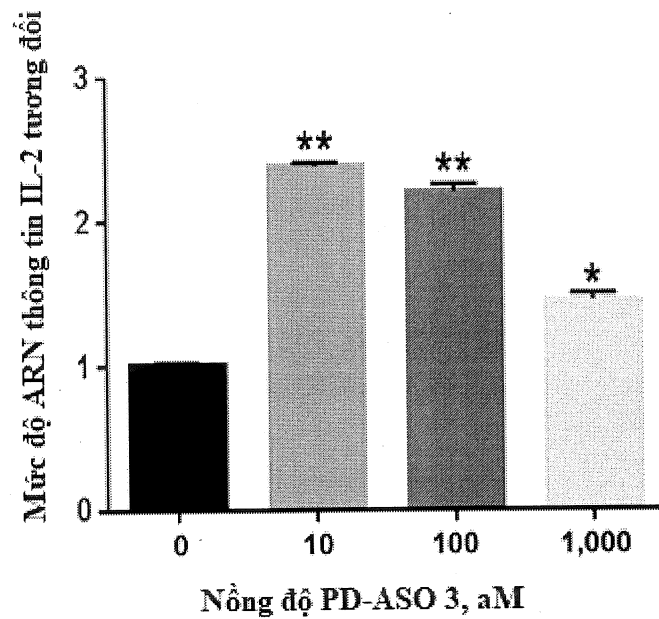
Hình 53B**Hình 53C**

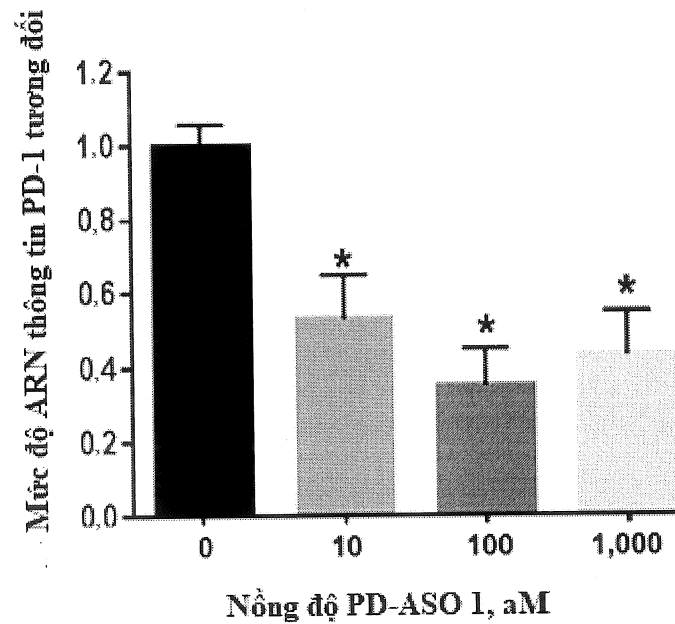
Hình 54A



Hình 54B



Hình 55A**Hình 55B**

Hình 56A**Hình 56B**