



(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
1-0048556
(51)^{2021.01} C07H 21/04; A61K 31/7088; C12N (13) B
15/113; A61K 31/4965; A61P 21/00

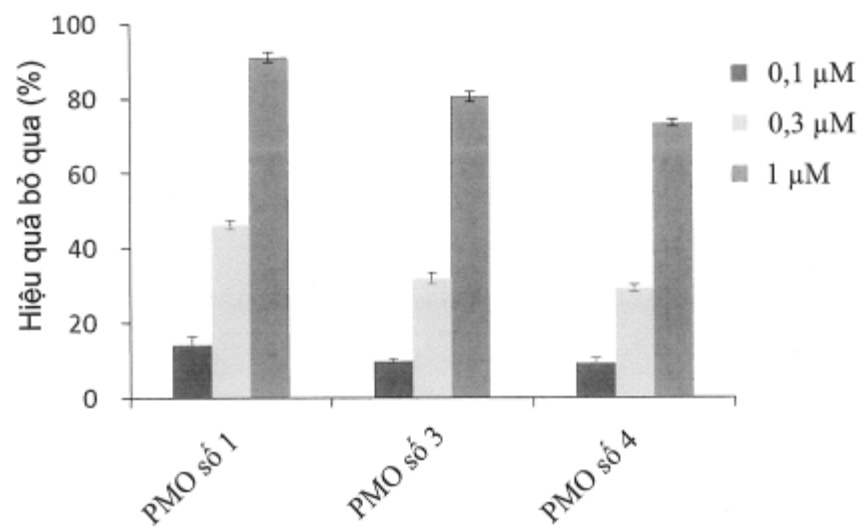
(21) 1-2022-04647 (22) 25/12/2020
(86) PCT/JP2020/048803 25/12/2020 (87) WO 2021/132591 01/07/2021
(30) 2019-236704 26/12/2019 JP
(45) 25/07/2025 448 (43) 26/09/2022 414A
(73) 1. NIPPON SHINYAKU CO., LTD. (JP)
14, Kisshoin Nishinosho Monguchicho, Minami-ku, Kyoto-shi, Kyoto 6018550,
Japan
2. NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY (JP)
1-1, Ogawahigashi-cho 4-chome, Kodaira-shi, Tokyo 1878551, Japan
(72) ENYA Yukiko (JP); SUNADOI Yuta (JP); WAKI Reiko (JP); MUCHIMA Kaname
(JP); TAKEDA Shin'ichi (JP); AOKI Yoshitsugu (JP).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) OLIGOME ĐỐI NGHĨA GÂY RA SỰ BỎ QUA EXON 50 VÀ DƯỢC PHẨM
CHỨA OLIGOME ĐỐI NGHĨA NÀY

(21) 1-2022-04647

(57) Sáng chế đề xuất được phẩm mà gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người với hiệu quả cao. Sáng chế đề xuất oligome đối nghĩa mà gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người.

Fig. 2



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến oligome đối nghĩa gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người, và được phẩm chứa oligome đối nghĩa này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chứng loạn dưỡng cơ Duchenne (Duchenne Muscular Dystrophy - DMD) là dạng nghiêm trọng và phổ biến nhất của chứng teo cơ tiến triển do di truyền mà phát triển ở một trong khoảng 3500 bé trai mới sinh. Mặc dù các chức năng vận động ở các đối tượng mắc DMD là hiếm khi khác với người khỏe mạnh ở giai đoạn vị thành niên và thơ ấu, song sự yếu cơ của họ được quan sát thấy ở trẻ nhỏ từ khoảng 4 đến 5 tuổi. Sau đó, sự yếu cơ ở các đối tượng mắc DMD tiến triển dẫn đến mất khả năng đi lại vào khoảng 12 tuổi và tử vong do thiếu năng hô hấp hoặc tim ở tuổi đôi mươi. Hiện tại, không có phương pháp điều trị đầy đủ cho DMD, và rất mong muốn phát triển tác nhân điều trị hữu hiệu.

DMD được biết là gây ra bởi sự đột biến trong gen dystrophin. Gen dystrophin nằm trên nhiễm sắc thể X và là gen rất lớn bao gồm 2,2 triệu cặp bazơ ADN. ADN được phiên mã thành các tiền mARN, và các intron được loại bỏ bằng cách cắt nối để tổng hợp mARN gồm 11.058 bazơ tương ứng với vùng được dịch mã, trong đó 79 exon được kết hợp cùng nhau. mARN này được dịch mã thành 3.685 axit amin để tạo thành protein dystrophin. Protein dystrophin liên quan đến sự duy trì sự ổn định màng trong các tế bào cơ và cần để giúp các tế bào cơ ít bị phá hủy. Gen dystrophin ở đối tượng mắc DMD có đột biến và do đó, protein dystrophin, là protein chức năng ở tế bào cơ hiếm khi được biểu hiện. Do đó, cấu trúc của các tế bào cơ không thể được duy trì trong cơ thể của đối tượng mắc DMD, dẫn đến sự tràn lượng lớn của các ion canxi vào các tế bào cơ. Do đó, đáp ứng giống như viêm xảy ra để thúc đẩy quá trình xơ hóa làm cho việc tái tạo các tế bào cơ trở nên khó khăn.

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

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

Sự bỏ qua exon có thể được cảm ứng bằng cách liên kết các axit nucleic đối nghĩa nhắm đích là vị trí cắt nối đầu 5' hoặc 3' hoặc cả hai vị trí, hoặc vị trí các exon bên trong. Exon sẽ được bao gồm trong mARN chỉ khi cả hai vị trí cắt nối của nó được nhận diện bởi phức hợp thể cắt nối. Do vậy, sự bỏ qua exon có thể được cảm ứng bằng cách nhắm đích các vị trí cắt nối với các axit amin đối nghĩa. Ngoài ra, sự liên kết của protein SR với vùng trình tự tăng cường cắt nối trong exon (Exonic

Splicing Enhancer - ESE) được xem là cần thiết cho exon để được nhận diện bởi cơ chế cắt nối. Do đó, sự bỏ qua exon cũng có thể được giảm đi bằng cách nhắm đích ESE.

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

Đã thấy rằng có khoảng 4% trong tổng số các đối tượng mắc DMD có thể được điều trị bằng cách bỏ qua exon thứ 50 (sau đây được gọi là "exon 50") (tài liệu phi sáng chế 5). Trong những năm gần đây, nhiều tổ chức nghiên cứu bao gồm chủ đơn đã báo cáo về các thử nghiệm trong đó exon 50 trong gen dystrophin được nhắm đích để bỏ qua exon (các tài liệu sáng chế 1 đến 6 và tài liệu phi sáng chế 6).

[Danh mục tài liệu viện dẫn]

[Tài liệu sáng chế]

[Tài liệu sáng chế 1] Công bố đơn quốc tế WO2013/100190

[Tài liệu sáng chế 2] Công bố đơn quốc tế WO2004/048570

[Tài liệu sáng chế 3] Công bố đơn quốc tế WO2006/000057

[Tài liệu sáng chế 4] Công bố đơn quốc tế WO2010/050802

[Tài liệu sáng chế 5] Công bố đơn quốc tế WO2010/048586

[Tài liệu sáng chế 6] Công bố đơn quốc tế WO2011/057350

[Tài liệu phi sáng chế 1] Monaco A. P. et al., Genomics 2:90-95 (1988)

[Tài liệu phi sáng chế 2] Matsuo M., Brain and Development 18:167-172 (1996)

[Tài liệu phi sáng chế 3] Wilton S. D. et al., Molecular Therapy 15:1288-96 (2007)

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

[Tài liệu phi sáng chế 5] Bladen C. L. et al., Human Mutation 36:395-402 (2015)

[Tài liệu phi sáng chế 6] Bo Wu et al., PLoSOne 6(5):e19906 (2011)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Trong các trường hợp nêu trên đây, các oligome đối nghĩa mới mà gây ra sự bỏ qua exon 50 ở gen dystrophin với hiệu quả cao đã được mong đợi. Ngoài ra, các oligome đối nghĩa có các đặc tính vật lý hoàn hảo (ví dụ, khả năng hòa tan) làm thuốc trong khi vẫn duy trì hoạt tính để tạo ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin với hiệu quả cao đã được mong đợi.

Giải pháp kỹ thuật cho vấn đề

Là kết quả của các nghiên cứu chi tiết về nội dung kỹ thuật của các tài liệu trên đây và cấu trúc của gen dystrophin, các tác giả sáng chế đã thấy rằng sự bỏ qua exon 50 ở gen dystrophin của người được gây ra với hiệu quả cao bằng cách dùng oligome đối nghĩa có trình tự bazơ được biểu diễn bởi trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 3 đến 5. Các tác giả sáng chế cũng đã phát hiện ra rằng oligome đối nghĩa có khả năng hòa tan tuyệt vời trong khi gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người với hiệu quả cao. Dựa trên phát hiện này, các tác giả sáng chế đã hoàn thành sáng chế.

Tức là, sáng chế đề xuất các đối tượng sau.

[1]

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

- (a) oligome đối nghĩa chứa trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5;
- (b) oligome đối nghĩa chứa trình tự bazơ có sự xóa, thay thế, chèn và/hoặc thêm từ 1 đến 5 bazơ trong trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5, và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người;

(c) oligome đối nghĩa chứa trình tự bazơ có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5 và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người; và

(d) oligome đối nghĩa mà lai được trong các điều kiện nghiêm ngặt với oligonucleotit chứa trình tự bazơ bổ sung với trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5, và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người; hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[2]

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

(e) oligome đối nghĩa chỉ chứa trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5;

(f) oligome đối nghĩa chỉ chứa trình tự bazơ có sự xóa và/hoặc thay thế từ 1 đến 5 bazơ trong trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5, và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người;

(g) oligome đối nghĩa chỉ chứa trình tự bazơ có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5 và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người; và

(h) oligome đối nghĩa mà lai được trong các điều kiện nghiêm ngặt với oligonucleotit chỉ chứa trình tự bazơ bổ sung với trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5, và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người; hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó.

[3]

Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm [1] hoặc [2] nêu trên, trong đó

oligome đối nghĩa là

oligome đối nghĩa mà có trình tự nucleotit có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90% với trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5 và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người.

[4]

Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [3] nêu trên, trong đó oligome đối nghĩa là oligonucleotit. [5]

Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm [4] nêu trên, trong đó gốc đường và/hoặc gốc liên kết phosphat của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit này được cải biến. [6]

Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm [4] hoặc [5] nêu trên, trong đó gốc đường của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit là riboza trong đó nhóm 2'-OH được thay bằng nhóm bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br và I (trong đó R là alkyl hoặc aryl và R' là alkylen). [7]

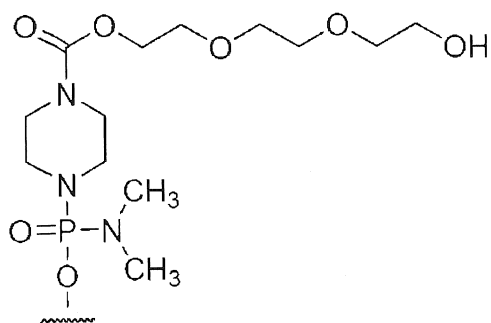
Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [4] đến [6] nêu trên, trong đó gốc liên kết phosphat của ít nhất một nucleotit cấu thành oligonucleotit này là gốc bất kỳ được chọn từ nhóm gồm liên kết phosphorothioat, liên kết phosphorodithioat, liên kết alkylphosphonat, liên kết phosphoramidat và liên kết boranophosphat. [8]

Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [3] nêu trên, trong đó oligome đối nghĩa là oligome morpholino. [9]

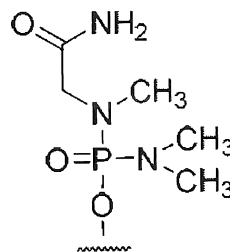
Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm [8] nêu trên, trong đó oligome đối nghĩa là oligome morpholino phosphorodiamidat. [10]

Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm [8] hoặc [9] nêu trên, trong đó đầu 5' có công thức hóa học bất kỳ trong số các công thức hóa học từ (1) đến (3) dưới đây:

[Công thức 1]



(1)



(2)



(3)

[11]

Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [10] nêu trên, trong đó chiều dài của oligome đối nghĩa là 19 hoặc 20 bazơ.

[12]

Dược phẩm để điều trị chứng loạn dưỡng cơ, dược phẩm này chứa oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [11] nêu trên.

[13]

Dược phẩm theo điểm [12] nêu trên, trong đó dược phẩm này còn chứa chất mang được dụng.

[14]

Dược phẩm theo điểm [12] hoặc [13] nêu trên để sử dụng cho đối tượng mắc chứng loạn dưỡng cơ, trong đó đối tượng này là đối tượng có đột biến mà chịu trách nhiệm cho việc loại bỏ exon 50 trong gen dystrophin.

[15]

Dược phẩm theo điểm [14] nêu trên, trong đó đối tượng có gen dystrophin có ít nhất một đột biến dịch chuyển khung gây ra do xóa một exon trong vùng lân cận của exon 50 và trong đó khung đọc axit amin được hiệu chỉnh bằng cách bỏ qua exon 50.

[16]

Dược phẩm theo điểm [14] hoặc [15] nêu trên, trong đó đối tượng có đột biến dịch chuyển khung gây ra do xóa các exon 51, 51-53, 51-55, hoặc 51-57 trong gen dystrophin.

[17]

Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [14] đến [16] nêu trên, trong đó đối tượng là người.

[18]

Sử dụng oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [11] nêu trên để sản xuất thuốc để điều trị chứng loạn dưỡng cơ.

[19]

Phương pháp để điều trị chứng loạn dưỡng cơ, bao gồm bước cho đối tượng mắc chứng loạn dưỡng cơ sử dụng lượng hữu hiệu của oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [11] nêu trên, hoặc dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [12] đến [16] nêu trên.

[20]

Phương pháp để điều trị theo điểm [19] nêu trên, trong đó đối tượng là người.

[21]

Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [11] nêu trên, hoặc dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [12] đến [16] nêu trên để sử dụng trong điều trị chứng loạn dưỡng cơ.

[22]

Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó, hoặc dược phẩm theo điểm [21] nêu trên, trong đó trong quá trình điều trị, đối tượng mắc chứng loạn dưỡng cơ là người.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế có thể đề xuất oligome đối nghĩa mà gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người với hiệu quả cao. Sáng chế có thể đề xuất oligome đối nghĩa mà có khả năng hòa tan tuyệt vời trong khi vẫn giữ hoạt tính gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người với hiệu quả cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện hiệu quả của sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người bởi các oligome đối nghĩa PMO số 1 và 2 ở các tế bào sacôm cơ vân của người (các tế bào RD).

Fig. 2 thể hiện hiệu quả của sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người bởi các oligome đối nghĩa PMO số 1, 3 và 4 ở các tế bào RD.

Fig. 3 thể hiện hiệu quả của sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người bởi các oligome đối nghĩa PMO số 1, 5, 6 và 7 ở các tế bào RD.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

1. Oligome đối nghĩa

Sáng chế đề xuất oligome đối nghĩa (sau đây được gọi là “oligome đối nghĩa theo sáng chế”) mà gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người với hiệu quả cao.

Exon 50 trong gen dystrophin của người

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

Trong hệ gen người, gen dystrophin của người nằm ở locus Xp21.2. Gen dystrophin của người có kích thước là 2,2 triệu cặp bazơ và là gen lớn nhất trong số

các gen người đã biết. Tuy nhiên, các vùng mã hóa của gen dystrophin của người chỉ là 14 kb, phân bố thành 79 exon trong suốt gen dystrophin của người (Roberts, RG, et al., Genomics, 16: 536-538 (1993); và Koenig, M., et al., Cell 53 219-228, 1988). Pre-mARN, là sản phẩm phiên mã của gen dystrophin của người, trải qua việc cắt nối để tạo thành mARN trưởng thành gồm 14 kb. Trình tự bazơ của gen dystrophin kiểu đại của người là đã biết (GenBank Accession No. NM_004006).

Trình tự bazơ bao gồm exon 50 và trình tự trong vùng lân cận của đầu 5' của intron 50 trong gen dystrophin kiểu đại của người được biểu thị bằng SEQ ID NO: 1. Oligome đối nghĩa

Oligome đối nghĩa theo sáng chế được thiết kế để gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người, nhờ đó cải biến protein được mã hóa bởi gen dystrophin loại DMD thành protein dystrophin loại BMD. Do đó, exon 50 trong gen dystrophin là đích của sự bỏ qua exon bởi oligome đối nghĩa bao gồm cả kiểu đại và kiểu đột biến.

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

(a) oligome đối nghĩa chứa trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5;

(b) oligome đối nghĩa chứa trình tự bazơ có sự xóa, thay thế, chèn và/hoặc thêm từ 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 đến 2, hoặc 1 bazơ trong trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5, và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người;

(c) oligome đối nghĩa chứa trình tự bazơ có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 94%, hoặc ít nhất 95% với trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5 và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người; và

(d) oligome đối nghĩa mà lại được trong các điều kiện nghiêm ngặt với oligonucleotit chứa trình tự bazơ bổ sung với trình tự bazơ của bất kỳ trong số các

SEQ ID NO: 3 đến 5 và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người.

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

(e) oligome đối nghĩa chỉ chứa trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5;

(f) oligome đối nghĩa chỉ chứa trình tự bazơ có sự xóa và/hoặc thay thế từ 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 đến 2, hoặc 1 bazơ trong trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5, và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người;

(g) oligome đối nghĩa chỉ chứa trình tự bazơ có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 94%, hoặc ít nhất 95% với trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5 và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người; và

(h) oligome đối nghĩa mà lai được trong các điều kiện nghiêm ngặt với oligonucleotit chỉ chứa trình tự bazơ bổ sung với trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5 và có hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người.

Các oligome đối nghĩa từ (b) đến (d) và các oligome đối nghĩa từ (f) đến (h) lần lượt là các đột biến của oligome đối nghĩa (a) và oligome đối nghĩa (e), cụ thể và được dự định là tương ứng với các đột biến (ví dụ, dạng đa hình) của gen dystrophin của đối tượng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "oligome đối nghĩa mà lai được trong các điều kiện nghiêm ngặt" đề cập đến, ví dụ, oligome đối nghĩa thu được bằng cách lai khuôn lác, lai vết tan, lai Southern hoặc kỹ thuật lai tương tự, sử dụng làm đoạn dò, toàn bộ hoặc một phần oligonucleotit chứa trình tự bazơ bổ sung với trình tự bazơ của, ví dụ, bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5. Phương pháp lai có thể được sử dụng bao gồm các phương pháp được mô tả trong, ví dụ, "Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor,

Laboratory Press 2001," "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997," v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” có thể là bất kỳ trong số các điều kiện nghiêm ngặt thấp, các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải hoặc các điều kiện nghiêm ngặt cao. Thuật ngữ "điều kiện nghiêm ngặt thấp" là, ví dụ, $5 \times \text{SSC}$, $5 \times$ dung dịch Denhardt, 0,5% SDS, 50% formamit ở 32°C . Thuật ngữ "điều kiện nghiêm ngặt vừa phải" là, ví dụ, $5 \times \text{SSC}$, $5 \times$ dung dịch Denhardt, 0,5% SDS, 50% formamit ở 42°C , hoặc $5 \times \text{SSC}$, 1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50% formamit ở 42°C . Thuật ngữ "điều kiện nghiêm ngặt cao" là, ví dụ, (1) $5 \times \text{SSC}$, $5 \times$ dung dịch Denhardt, 0,5% SDS, 50% formamit ở 50°C , (2) $0,2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS ở 60°C , (3) $0,2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS ở 62°C , (4) $0,2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS ở 65°C , hoặc (5) $0,1 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS ở 65°C , nhưng không giới hạn ở đó. Trong các điều kiện này, oligome đối nghĩa với độ đồng nhất trình tự cao hơn được kỳ vọng sẽ thu được một cách hiệu quả ở nhiệt độ cao hơn. Nhiều yếu tố liên quan đến sự nghiêm ngặt để lai bao gồm nhiệt độ, nồng độ đoạn dò, chiều dài đoạn dò, độ mạnh ion, thời gian, nồng độ muối và các yếu tố khác, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể lựa chọn một cách thích hợp các yếu tố này để đạt được sự nghiêm ngặt tương tự. Ở đây, thuật ngữ "độ đồng nhất trình tự" đề cập đến sự đồng nhất trên toàn bộ phạm vi của trình tự bazơ được so sánh giữa một cặp gồm hai axit nucleic nhất định và được biểu thị bằng tỷ lệ (%) các bazơ phù hợp khi sắp thẳng hàng tối ưu các trình tự bazơ được tạo ra bằng cách sử dụng thuật toán toán học đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Ví dụ, oligome đối nghĩa chứa trình tự bazơ có ít nhất "80% độ đồng nhất trình tự" với oligome đối nghĩa chứa trình tự gồm 20 bazơ nghĩa là oligome đối nghĩa có 16 bazơ hoặc nhiều hơn giống với oligome đối nghĩa gồm 20 bazơ.

Khi các kit có bán trên thị trường được sử dụng để lai, ví dụ, Alkphos Direct Labelling và Detection System (GE Healthcare) có thể được sử dụng. Trong trường hợp này, theo quy trình kèm theo bộ kit, sau khi ủ với đoạn dò được dán nhãn qua đêm, màng được rửa bằng đệm rửa sơ bộ chứa 0,1% (khối lượng/thể tích) SDS ở 55°C , nhờ đó cho phép phát hiện oligome đối nghĩa được lai. Theo cách khác, khi

đoạn dò được đánh dấu bằng digoxigenin (DIG) bằng cách sử dụng thuốc thử có bán trên thị trường (ví dụ, PCR Labelling Mix (Roche Diagnostics), v.v.) trong sản xuất đoạn dò dựa trên toàn bộ hoặc một phần trình tự bổ sung với trình tự bazơ của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 3 đến 5, việc lai có thể được phát hiện với kit phát hiện axit nucleic DIG (Roche Diagnostics).

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

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

Thuật ngữ "gây ra (cho phép) sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người" được dự định có nghĩa rằng bằng cách liên kết oligome đối nghĩa theo sáng chế với vị trí tương ứng với exon 50 và/hoặc intron liền kề của nó của sản phẩm phiên mã (ví dụ, pre-mARN) của gen dystrophin của người, việc loại bỏ exon 50 xảy ra và, ví dụ, trình tự bazơ tương ứng với đầu 5' của exon 52 được nối với trình tự bazơ tương ứng với đầu 3' của exon 49 ở đối tượng mắc DMD có sự xóa exon 51 khi sản phẩm

phiên mã trải qua quá trình cắt nối, do đó dẫn đến sự tạo thành mARN trưởng thành không có sự dịch chuyển khung codon.

Do đó, đối tượng mắc DMD có đột biến mà chịu trách nhiệm cho việc bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin có thể được xử lý bằng cách bỏ qua exon 50. Ví dụ về các đối tượng mắc DMD như vậy bao gồm các đối tượng mắc DMD có gen dystrophin có ít nhất một đột biến dịch chuyển khung gây ra do xóa một exon trong vùng lân cận của exon 50 và trong đó khung đọc axit amin được hiệu chỉnh bằng cách bỏ qua exon 50, và cụ thể hơn bao gồm các đối tượng mắc DMD có đột biến dịch chuyển khung gây ra do xóa các exon 51, 51-53, 51-55, 51-57, v.v. trong gen dystrophin.

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

Sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người có được gây ra hay không có thể được xác nhận bằng cách đưa oligome đối nghĩa theo sáng chế vào tế bào biểu hiện dystrophin (ví dụ, các tế bào sacôm cơ vân của người), khuếch đại vùng xung quanh exon 50 của mARN của gen dystrophin của người từ ARN tổng của tế bào biểu hiện dystrophin bằng PCR theo thời gian thực và thực hiện PCR xếp lồng hoặc phân tích trình tự trên sản phẩm được khuếch đại bởi PCR. Hiệu quả bỏ qua ES (%) có thể được xác định như sau. mARN cho gen dystrophin của người được thu gom từ các tế bào thử nghiệm; và trong mARN, mức polynucleotit của sợi thể hiện exon 50 được bỏ qua (mức polynucleotit "A") và mức polynucleotit của sợi thể hiện exon 50 không được bỏ qua (mức polynucleotit "B") được đo. Bằng cách sử dụng các giá trị đo "A" và "B", hiệu quả được tính toán theo phương trình (1) sau. Để tính toán hiệu quả bỏ qua, công bố đơn quốc tế WO2012/029986 có thể được tham khảo.

$$ES = 100 \times A / (A + B) \dots (1)$$

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

Oligome đối nghĩa theo sáng chế bao gồm, ví dụ, oligonucleotit, oligome morpholino hoặc oligome peptit axit nucleic (Peptide Nucleic Acid - PNA), có độ dài là 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 hoặc 35 bazơ. Độ dài của oligome đối nghĩa tốt hơn là từ 16 đến 25, từ 16 đến 23, 19 hoặc 20 bazơ và các oligome morpholino được ưu tiên.

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

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

Trong sáng chế, bazơ nitơ bao gồm, ví dụ, adenin, guanin, hypoxanthin, xytosin, thymine, uraxil, và các bazơ cải biến của nó. Ví dụ về các bazơ cải biến này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, pseudouraxil, 3-metyluraxil, dihydrouraxil, 5-alkylxytosin (ví dụ, 5-metylxytosin), 5-alkyluraxil (ví dụ, 5-etyluraxil), 5-halouraxil (5-bromouraxil), 6-azapyrimidin, 6-alkylpyrimidin (6-metyluraxil), 2-thiouraxil, 4-thiouraxil, 4-axetylxytosin, 5-(carboxyhydroxymetyl) uraxil, 5'-carboxymetylaminometyl-2-thiouraxil, 5-carboxymetylaminometyluraxil, 1-metyladenin, 1-methylhypoxanthin, 2,2-dimethylguanin, 3-metylxytosin, 2-metyladenin, 2-methylguanin, N6-metyladenin, 7-methylguanin, 5-metoxymethyl-2-thiouraxil, 5-methylaminometyluraxil, 5-methylcarbonylmetyluraxil, 5-metyloxyuraxil, 5-metyl-2-thiouraxil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenin, axit uraxil-

5-oxyaxetic, 2-thioxytosin, purin, 2,6-diaminopurin, 2-aminopurin, isoguanin, indol, imidazol, xanthin, v.v..

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

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

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

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

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

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

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

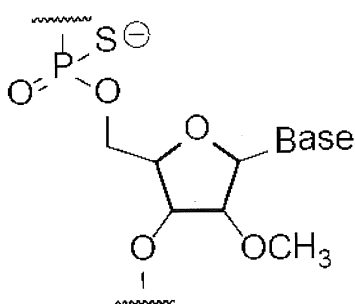
Trong sáng chế này, aryl tốt hơn là bao gồm aryl có 6 đến 10 nguyên tử cacbon. Các ví dụ cụ thể bao gồm phenyl, α -naphthyl và β -naphthyl. Trong số các nhóm này, phenyl được ưu tiên. Aryl có thể tùy ý được thế. Ví dụ về các phân tử thế này là alkyl, halogen, alkoxy, xyano và nitro. Aryl có thể được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

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

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

Tốt hơn là, oligonucleotit theo sáng chế là oligome đôi nghĩa theo sáng chế bao gồm đơn vị cấu trúc được thể hiện bởi công thức chung dưới đây trong đó nhóm -OH ở vị trí 2' của riboza được thế bằng metoxy và gốc liên kết phosphat là liên kết phosphorothioat:

[Công thức 2]



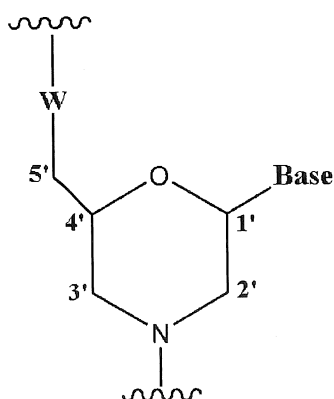
trong đó Base là bazơ nitơ.

Oligonucleotit theo sáng chế có thể được tổng hợp dễ dàng bằng cách sử dụng các thiết bị tổng hợp tự động khác nhau (ví dụ, AKTA oligopilot plus 10/100 (GE

Healthcare)). Theo cách khác, sự tổng hợp cũng có thể được giao cho tổ chức là bên thứ ba (ví dụ, Promega Inc., Takara Co., hoặc Japan Bio Service Co.), v.v..

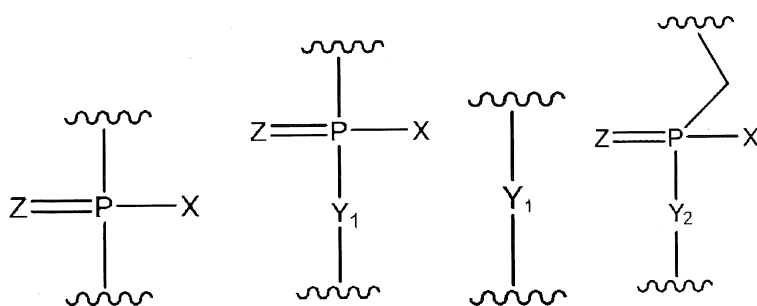
Oligome morpholino theo sáng chế là oligome đối nghĩa theo sáng chế chứa đơn vị cấu trúc thể hiện bởi công thức chung dưới đây:

[Công thức 3]



(trong đó Base có nghĩa giống như được xác định trên đây; và W là nhóm được biểu thị bởi công thức bất kỳ trong số các công thức sau đây:

[Công thức 4]



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

R^1 là H hoặc alkyl;

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

Y_1 là O, S, CH_2 hoặc NR^1 ;

Y_2 là O, S hoặc NR^1 ;

Z là O hoặc S.

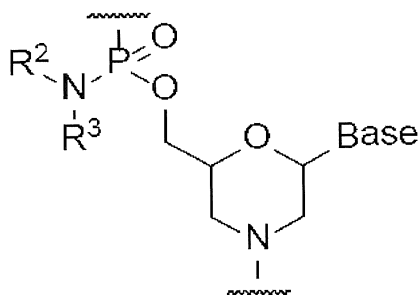
Các ví dụ về các hợp chất monome morpholino mà được sử dụng trong quá trình tổng hợp oligome morpholino theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hợp chất monome morpholino (A), hợp chất monome morpholino (C), hợp chất monome morpholino (T), và hợp chất monome morpholino (G) sau đây.

[Bảng 1]

Hợp chất monome morpholino (A)	Hợp chất monome morpholino (C)	Hợp chất monome morpholino (T)	Hợp chất monome morpholino (G)

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

[Công thức 5]



trong đó Base, R² và R³ có nghĩa giống như được xác định trên đây.

Oligome morpholino theo sáng chế bao gồm oligome mà toàn bộ hoặc một phần bazơ nitơ, các gốc vòng morpholin, các gốc liên kết phosphat, đầu 3' và/hoặc đầu 5' tạo thành oligome morpholino được cải biến.

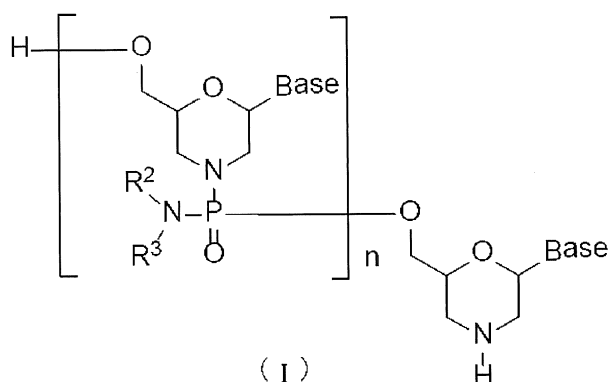
Sự cải biến gốc liên kết phosphat bao gồm, ví dụ, sự cải biến thay thế bằng liên kết phosphorodiamidat, liên kết phosphorothioat, liên kết phosphorodithioat, liên kết alkylphosphonat, liên kết phosphoramidat và liên kết boranophosphat (Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160)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

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

[Phương pháp sản xuất PMO]

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

[Công thức 6]



trong đó Base, R^2 và R^3 có nghĩa giống như được xác định trên đây; và,

n là số nguyên từ 1 đến 99, tốt hơn là số nguyên xác định từ 15 đến 34, 15 đến 24 hoặc 15 đến 22, tốt hơn nữa là 18 hoặc 19.

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

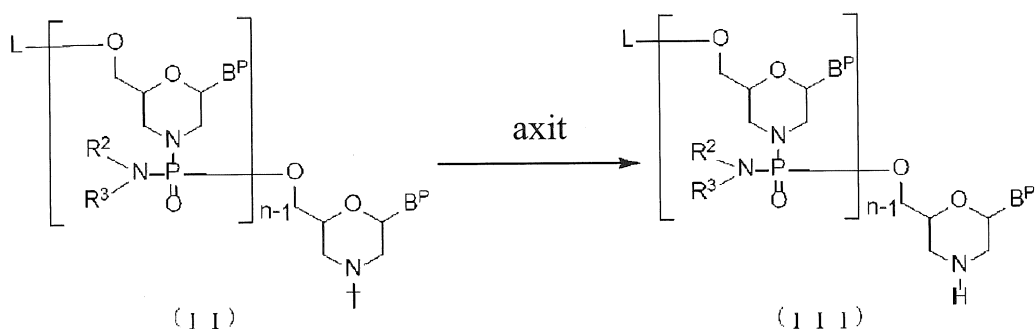
Các hợp chất và các chất phản ứng được sử dụng trong các bước dưới đây không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là chúng thường được sử dụng để tạo thành PMO.

Tương tự, tất cả các bước dưới đây có thể được thực hiện bằng phương pháp pha lỏng hoặc phương pháp pha rắn (thao tác bằng tay hoặc bằng cách sử dụng thiết bị tổng hợp tự động pha rắn sẵn có trên thị trường). Trong sản xuất PMO bằng phương pháp pha rắn, ưu tiên sử dụng các thiết bị tổng hợp tự động xét về mặt các quy trình thực hiện đơn giản và sự tổng hợp chính xác.

(1) Bước A:

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

[Công thức 7]



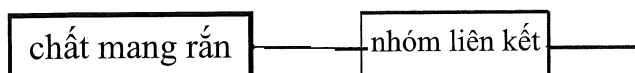
trong đó n, R² và R³ có nghĩa giống như được xác định trên đây;

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

T là trityl, monomethoxytrityl hoặc dimethoxytrityl; và,

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

[Công thức 8]



(I V)

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

Nhóm bảo vệ cho nhóm amino như vậy không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó được sử dụng làm nhóm bảo vệ cho các axit nucleic. Các ví dụ cụ thể bao gồm benzoyl, 4-metoxibenzoyl, axetyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, phenylaxetyl, phenoxyaxetyl, 4-tert-butylphenoxyaxetyl, 4-isopropylphenoxyaxetyl và (dimethylamino)metylen. Các ví dụ cụ thể về nhóm bảo vệ cho nhóm hydroxy bao gồm 2-xyanoetyl, 4-nitrophenetyl, phenylsulfonyletyl, metylsulfonyletyl, trimethylsilyletyl, phenyl, mà có thể được thể bằng 1 đến 5 nhóm thu electron ở các vị trí thay thế tùy ý, diphenylcarbamoyl, dimethylcarbamoyl, diethylcarbamoyl, methylphenylcarbamoyl, 1-pyrrolidinylcarbamoyl, morpholinocarbamoyl, 4-(tert-butylcarboxy) benzyl, 4-[(dimethylamino)carboxy]benzyl và 4-(phenylcarboxy)benzyl, (xem, *ví dụ*, WO 2009/064471).

"Chất mang rắn" không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là chất mang có thể sử dụng cho phản ứng pha rắn của các axit nucleic. Mong muốn đối với chất mang rắn là có các đặc tính sau đây: *ví dụ*, (i) nó hòa tan một cách hạn chế trong các chất phản ứng mà có thể được sử dụng để tổng hợp các dẫn xuất morpholino axit nucleic (*ví dụ*, diclometan, axetonitril, tetrazol, *N*-metylimidazol, pyridin, anhydrit axetic, lutidin, axit trifloaxetic); (ii) nó ổn định về mặt hóa học đối với các chất phản ứng có thể sử dụng để tổng hợp các dẫn xuất morpholino axit nucleic; (iii) nó có thể bị biến đổi về mặt hóa học; (iv) nó có thể được mang điện bởi các dẫn xuất morpholino axit nucleic mong muốn; (v) nó có độ bền đủ để chịu được áp suất cao qua các xử lý; và (vi) có khoảng đường kính hạt và sự phân bố nhất định. Cụ thể hơn, polystyren có thể trương phồng (*ví dụ*, nhựa aminometyl polystyren được liên kết ngang với 1% divinylbenzen (cỡ 200-400 mesh) (2,4-3,0 mmol/g) (Tokyo Chemical Industry), nhựa polystyren được aminometyl hóa·HCl [divinylbenzen 1%, cỡ 100-200 mesh] (Peptide Institute, Inc.)), polystyren không trương phồng (*ví dụ*, Primer Support (GE Healthcare)), polystyren gắn kết với mạch PEG (*ví dụ*, nhựa NH₂-PEG (Watanabe

Chemical Co.), nhựa TentaGel), thủy tinh xốp được điều chỉnh (controlled pore glass - CPG) (được sản xuất bởi, ví dụ, CPG), thủy tinh xốp được điều chỉnh bằng oxaly1 (xem, ví dụ, Alul et al., Nucleic Acids Research, Vol. 19, 1527 (1991)), chất phụ trợ tạo dẫn xuất với aminopolyetylen glycol TentaGel (xem, ví dụ, Wright et al., Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993)), và copolyme Poros-polystyren/divinylbenzen.

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

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

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

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

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

Axit có thể được sử dụng trong bước này cũng có thể được sử dụng ở dạng chất pha loãng với dung môi thích hợp ở nồng độ là 0,1% đến 30%. Dung môi không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là trơ đối với phản ứng, và bao gồm, ví dụ,

diclometan, axetonitril, rượu cồn (etanol, isopropanol, trifloetanol, v.v.), nước, hoặc hỗn hợp của nó.

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

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

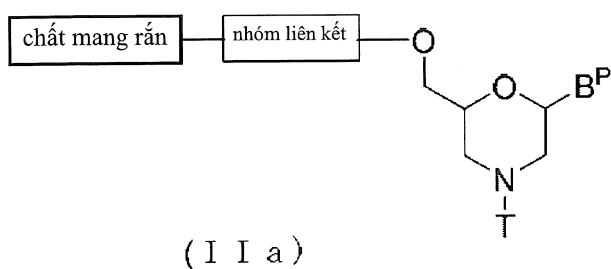
Sau khi hoàn thành bước này, bazơ có thể được thêm vào, nếu cần, để trung hòa axit còn lại trong hệ thống. "Bazơ" không bị giới hạn một cách cụ thể và bao gồm, *ví dụ*, diisopropyletylamin. Bazơ cũng có thể được sử dụng ở dạng chất pha loãng với dung môi thích hợp ở nồng độ là 0,1% (thể tích/thể tích)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

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

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

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

[Công thức 9]

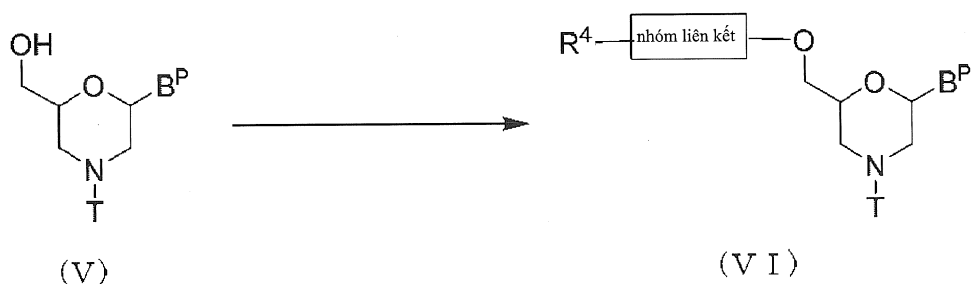


trong đó B^P, T, nhóm liên kết và chất mang rắn có nghĩa giống như được xác định trên đây.

Bước 1:

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

[Công thức 10]

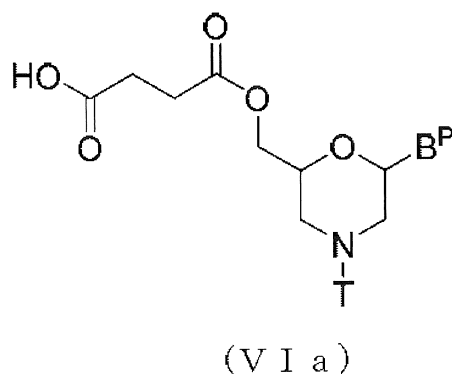


trong đó B^P, T và nhóm liên kết có nghĩa giống như được xác định trên đây; và ,
R⁴ là hydroxy, halogen, nhóm carboxyl hoặc amino.

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

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

[Công thức 11]

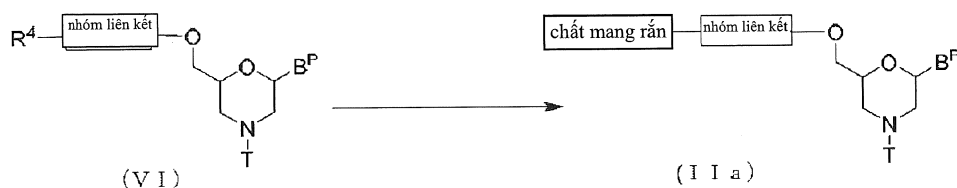


trong đó B^P và T có nghĩa giống như được xác định trên đây.

Bước 2:

Hợp chất (VI) được cho phản ứng với chất mang rắn bằng cách sử dụng tác nhân ngưng tụ hoặc tương tự để tạo thành hợp chất (IIa).

[Công thức 12]

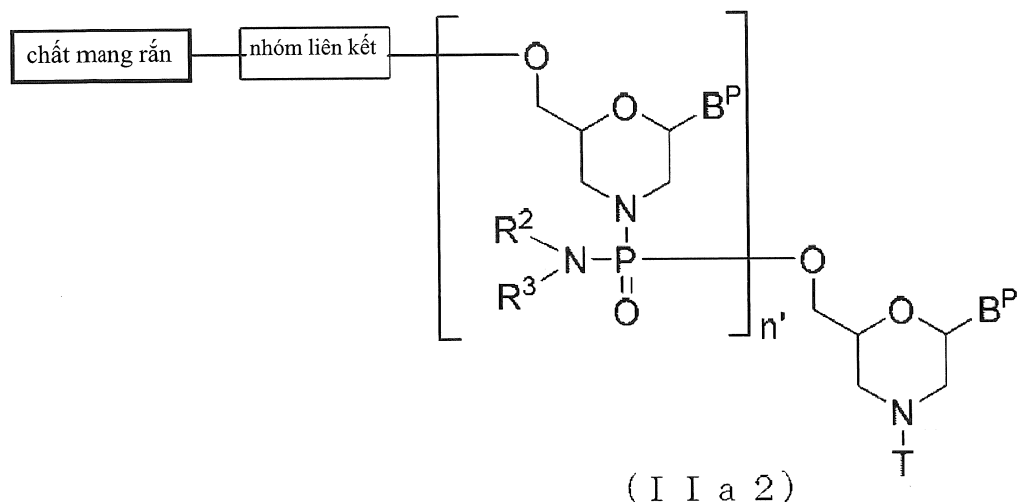


trong đó B^P , R^4 , T, nhóm liên kết và chất mang rắn có nghĩa giống như được xác định trên đây.

Bước này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng hợp chất (VI) và chất mang rắn theo quy trình đã biết làm phản ứng ngưng tụ.

Trong hợp chất (II), hợp chất được thể hiện bởi công thức chung (IIa2) dưới đây trong đó n là từ 2 đến 99 (tốt hơn là số nguyên xác định là 16 đến 35, 16 đến 25, hoặc 16 đến 23, tốt hơn là 19 hoặc 20) và L là nhóm được thể hiện bởi công thức chung (IV) có thể được sản xuất bằng cách sử dụng hợp chất (IIa) làm nguyên liệu ban đầu và lặp lại bước A và bước B của phương pháp sản xuất PMO được mô tả trong bản mô tả trong một số lần mong muốn.

[Công thức 13]



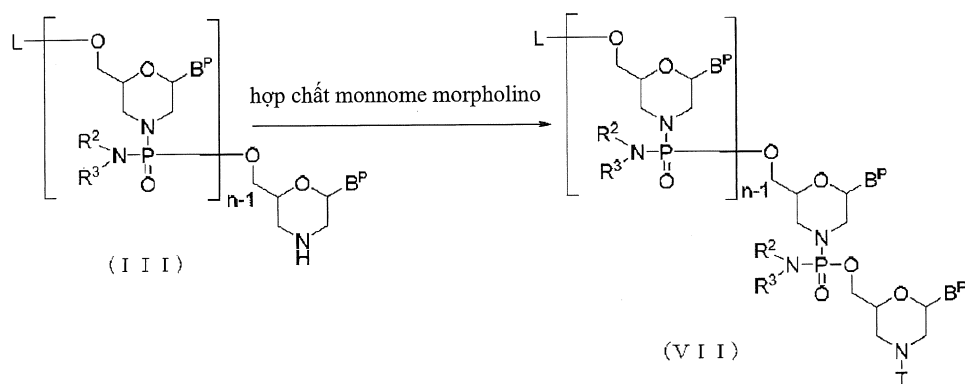
trong đó B^P , R^2 , R^3 , T, nhóm liên kết và chất mang rắn có nghĩa giống như được xác định trên đây; và,

n' bằng từ 1 đến 98 (trong phương án cụ thể, n' là, ví dụ, 1 đến 34, 1 đến 24, 1 đến 23, 1 đến 22, 1 đến 21, 1 đến 20, 1 đến 19, 1 đến 18, 1 đến 17, 1 đến 16, 1 đến 15).

(2) Bước B

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

[Công thức 14]

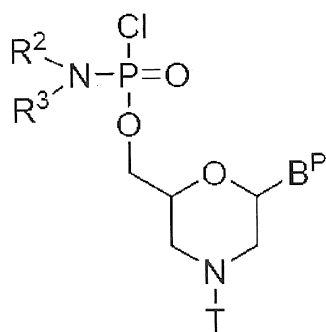


trong đó B^P , L, n, R^2 , R^3 và T có nghĩa giống như được xác định trên đây.

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

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

[Công thức 15]



(V I I I)

trong đó B^P , R^2 , R^3 và T có nghĩa giống như được xác định trên đây.

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

Hợp chất monome morpholino và bazơ mà có thể được sử dụng trong bước này cũng có thể được sử dụng làm chất pha loãng với dung môi thích hợp ở nồng độ là 0,1% đến 30%. Dung môi không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó trợ với phản ứng, và bao gồm, ví dụ, N,N-dimetylimidazolidon, N-metylpiperidon, DMF, diclometan, axetonitril, tetrahydrofuran, hoặc hỗn hợp của nó.

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

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

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

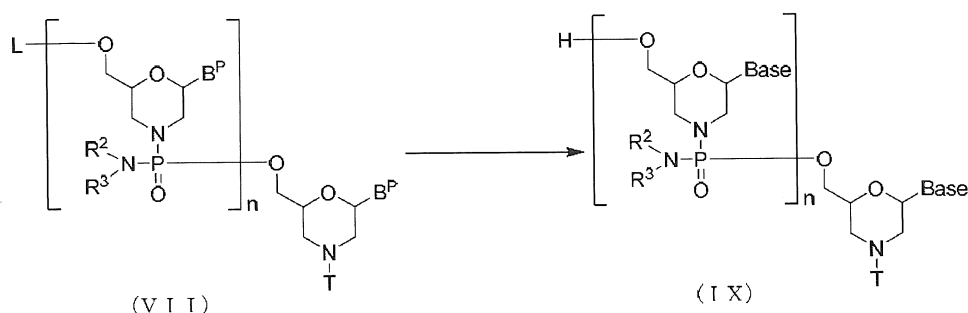
Nếu cần, bazơ như pyridin, lutidin, collidin, trietylamin, diisopropyletylamin, *N*-etylmorpholin, v.v. cũng có thể được sử dụng phối hợp với tác nhân axyl hóa. Lượng tác nhân axyl hóa được sử dụng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 mol đương lượng đến 10000 mol đương lượng, và tốt hơn nữa là trong khoảng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

Nhiệt độ phản ứng trong phản ứng này tốt hơn là trong khoảng từ 10°C đến 50°C, tốt hơn nữa là, trong khoảng từ 10°C đến 50°C, tốt hơn nhiều nữa là, trong khoảng từ 20°C đến 40°C, và tốt nhất là, trong khoảng từ 25°C đến 35°C. Thời gian phản ứng có thể thay đổi phụ thuộc vào loại tác nhân axyl hóa được sử dụng và nhiệt độ phản ứng, và thích hợp là trong khoảng từ 0,1 phút đến 24 giờ nói chung, và tốt hơn là trong khoảng từ 1 phút đến 5 giờ.

(3) Bước C:

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

[Công thức 16]



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

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

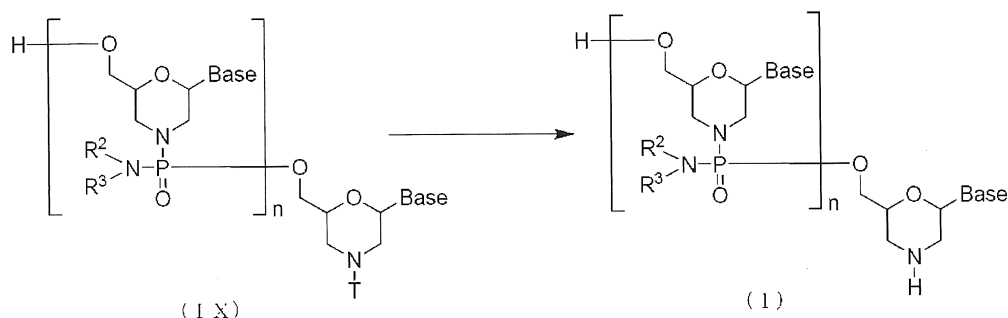
"Tác nhân khử bảo vệ" bao gồm, *ví dụ*, nước amoniac đậm đặc và metylamin. "Tác nhân khử bảo vệ" được dùng trong bước này cũng có thể được sử dụng làm chất pha loãng với, *ví dụ*, nước, metanol, etanol, rượu isopropylic, axetonitril, tetrahydrofuran, DMF, N,N-dimethylimidazolidon, N-metylpiperidon, hoặc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

Nhiệt độ phản ứng thích hợp là, *ví dụ*, nằm trong khoảng từ 15°C đến 75°C, tốt hơn là, trong khoảng từ 40°C đến 70°C, và tốt hơn nữa là, trong khoảng từ 50°C đến 60°C. Thời gian phản ứng để khử bảo vệ có thể thay đổi phụ thuộc vào loại hợp chất (VII), nhiệt độ phản ứng, v.v., và thích hợp là trong khoảng từ 10 phút đến 30 giờ, tốt hơn là 30 phút đến 24 giờ, và tốt hơn nữa là trong khoảng từ 5 giờ đến 20 giờ.

(4) Bước D:

PMO (I) được sản xuất bằng cách cho hợp chất (IX) được tạo ra trong bước C phản ứng với axit:

[Công thức 17]



trong đó Base, n , R^2 , R^3 và T có nghĩa giống như được xác định trên đây.

Bước này có thể được thực hiện bằng cách thêm axit vào hợp chất (IX).

"Axit" có thể được sử dụng trong bước này bao gồm, ví dụ, axit tricloaxetic, axit dicloaxetic, axit axetic, axit phosphoric, axit clohydric, v.v.. Lượng axit được sử dụng được sử dụng một cách thích hợp để cho phép dung dịch có độ pH trong khoảng từ 0,1 đến 4,0, ví dụ, và tốt hơn nữa là, trong khoảng từ pH 1,0 đến 3,0. Dung môi không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó trợ với phản ứng, và bao gồm, ví dụ, axetonitril, nước, hoặc hỗn hợp của các dung môi của chúng.

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

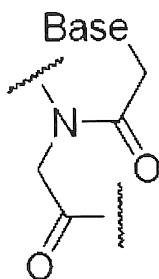
PMO (I) có thể thu được bằng cách cho hỗn hợp phản ứng thu được trong bước này vào các phương pháp tách và tinh chế thông thường như chiết, cô đặc, trung hòa, lọc, tách bằng ly tâm, kết tinh lại, sắc ký cột pha đảo sử dụng C_8 đến C_{18} , sắc ký cột trao đổi cation, sắc ký cột trao đổi anion, sắc ký cột lọc gel, sắc ký lỏng hiệu năng cao, thẩm tách, siêu lọc, v.v., riêng rẽ hoặc ở dạng phối hợp của các phương pháp này. Do đó, PMO (I) mong muốn có thể được phân tách và tinh chế (xem, ví dụ, WO 1991/09033).

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

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

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

[Công thức 18]



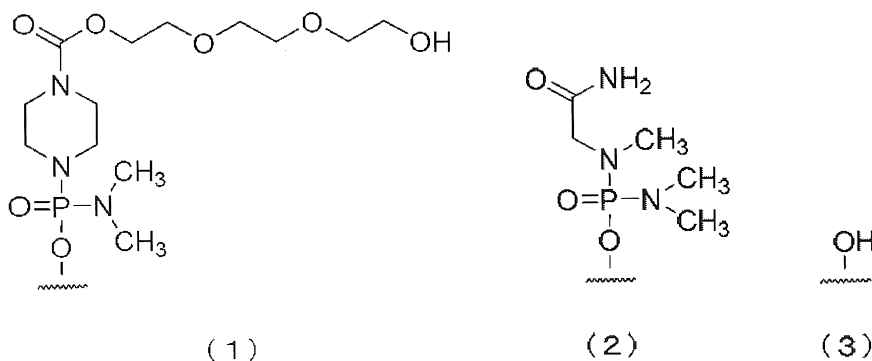
trong đó Base có nghĩa giống như được xác định trên đây.

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

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

Trong oligome đối nghĩa theo sáng chế, đầu 5' có thể là nhóm bất kỳ trong số các nhóm được thể hiện bởi công thức hóa học từ (1) đến (3) dưới đây, và tốt hơn là (3)-OH.

[Công thức 19]



Dưới đây, các nhóm được thể hiện bởi (1), (2) và (3) trên đây được gọi là "Nhóm (1)," "Nhóm (2)" và "Nhóm (3)," tương ứng.

Oligome đối nghĩa theo sáng chế có thể bao gồm hợp chất có nguyên tử phospho tinh khiết quang học về mặt hóa học lập thể vì nguyên tử phospho của gốc liên kết phosphat đóng vai trò là tâm bất đối xứng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thu được các dạng có hoạt tính quang học tinh khiết từ các hỗn hợp chất đồng phân (WO2017/024264). Oligome đối nghĩa theo sáng chế có thể được tổng hợp ở dạng có hoạt tính quang học tinh khiết. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thu được các dạng có hoạt tính quang học tinh khiết bằng cách kiểm soát các phản ứng tổng hợp (công bố đơn chưa xét nghiệm của Nhật Bản số 2018-537952).

2. Oligome đối nghĩa được liên hợp với peptit

Oligome đối nghĩa theo sáng chế có thể tạo thành phức với peptit chức năng nhằm mục đích cải thiện hiệu quả (ví dụ, peptit thấm qua màng nhằm cải thiện hiệu quả phân phối đến các tế bào đích) (WO2008/036127, WO2009/005793, WO2012/150960, WO2016/187425, WO2018/118662, WO2018/118599, WO2018/118627, J. D. Ramsey, N. H. Flynn, Pharmacology & Therapeutics 154, 78-

86 (2015), M. K. Tsoumpra et al., EBioMedicine, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.036>). Vị trí liên hợp không bị giới hạn một cách cụ thể. Tốt hơn, nếu đầu 5' hoặc 3' của oligome đối nghĩa được kết nối (liên hợp) với đầu tận cùng amino hoặc đầu tận cùng carboxyl của peptit chức năng.

Làm một phương án khác, oligome đối nghĩa theo sáng chế và peptit chức năng có thể tạo thành phức hợp (liên hợp) thông qua nhóm liên kết. Nhóm liên kết không bị giới hạn một cách cụ thể. Tốt hơn, nếu đầu 5' hoặc 3' của oligome đối nghĩa được kết nối với một đầu của nhóm liên kết trong khi đầu tận cùng amino hoặc đầu tận cùng carboxyl của peptit chức năng được kết nối với đầu kia của nhóm liên kết. Axit amin bổ sung có thể tồn tại giữa peptit chức năng và nhóm liên kết.

3. Dược phẩm

Oligome đối nghĩa theo sáng chế, ngay cả khi chiều dài của nó là ngắn so với oligome đối nghĩa trong giải pháp kỹ thuật đã biết, có thể gây ra sự bỏ qua exon 50 với hiệu quả cao. Oligome đối nghĩa theo sáng chế có khả năng hòa tan tuyệt vời trong khi vẫn duy trì hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 với hiệu quả cao. Do đó, mong đợi rằng các tình trạng loạn dưỡng cơ có thể được cải thiện với hiệu quả cao bằng cách sử dụng oligome đối nghĩa theo sáng chế cho những đối tượng mắc DMD có đột biến mà chịu trách nhiệm cho sự bỏ qua exon 50 (ví dụ, đột biến dịch chuyển khung và đột biến sai nghĩa/đột biến vô nghĩa ở exon 50) trong gen dystrophin. Do đó, mong đợi rằng các tình trạng loạn dưỡng cơ có thể được cải thiện với hiệu quả cao bằng cách sử dụng oligome đối nghĩa theo sáng chế, ví dụ, ít nhất là đối với đối tượng mắc DMD có gen dystrophin đột biến được xác định trước có sự xóa bỏ một exon ở vùng lân cận của exon 50. Gen dystrophin đột biến được xác định trước nghĩa là gen dystrophin có ít nhất một đột biến dịch chuyển khung gây ra do xóa một exon trong vùng lân cận của exon 50 và trong đó khung đọc axit amin được hiệu chỉnh bằng cách bỏ đi (bỏ qua) exon 50. Ví dụ về đối tượng có gen dystrophin đột biến được xác định trước như vậy bao gồm đối tượng mắc DMD có đột biến dịch chuyển khung gây ra bởi sự xóa bỏ các exon 51, 51-53, 51-55, 51-57, v.v..

Cụ thể hơn, mong đợi rằng các tình trạng loạn dưỡng cơ có thể được cải thiện với hiệu quả cao bằng cách sử dụng được phẩm chứa oligome đối nghĩa theo sáng chế cho đối tượng mắc DMD, những người có đột biến chuyển hóa thành trong khung bằng cách bỏ qua exon 50, ví dụ, đối tượng có sự xóa bỏ exon 51, đối tượng có sự xóa bỏ exon 51-53, đối tượng có sự xóa bỏ exon 51-55, đối tượng có sự xóa bỏ exon 51-57, và v.v.). Ví dụ, khi được phẩm chứa oligome đối nghĩa theo sáng chế được sử dụng, các hiệu quả điều trị giống như vậy có thể đạt được thậm chí ở liều nhỏ hơn liều của các oligome trong giải pháp kỹ thuật đã biết. Do đó, các tác dụng phụ có thể được giảm nhẹ và điều này là có hiệu quả kinh tế.

Oligome đối nghĩa theo sáng chế cũng hữu ích trong việc bảo chế được phẩm vì oligome đối nghĩa có khả năng hòa tan tuyệt vời trong khi vẫn duy trì hoạt tính để gây ra sự bỏ qua exon 50 với hiệu quả cao.

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

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị chứng loạn dưỡng cơ, bao gồm việc sử dụng cho đối tượng mắc DMD oligome đối nghĩa theo sáng chế.

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

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

Các ví dụ về muối được dụng của oligome đối nghĩa theo sáng chế được chứa trong được phẩm theo sáng chế bao gồm các muối của kim loại kiềm như muối natri, muối kali và muối lithi; các muối của kim loại kiềm thổ như muối canxi và muối magie; các muối của kim loại như muối nhôm, muối sắt, muối kẽm, muối đồng, muối niken, muối coban, v.v.; muối amoni; các muối amin hữu cơ như muối t-octylamin, muối dibenzylamin, muối morpholin, muối glucosamin, muối phenylglyxin alkyl este, muối etylendiamin, muối N-metylglucamin, muối guanidin, muối dietylamin, muối

triethylamin, muối dicyclohexylamin, muối N,N'-dibenzyletylendiamin, muối cloprocain, muối procain, muối dietanolamin, muối N-benzylphenetylamin, muối piperazin, muối tetrametylamoni, muối tris(hydroxymetyl)aminometan; các muối hydrohalogenua như muối của axit flohydric, muối hydroclorua, muối hydrobromua và muối hydroiodua; muối của axit vô cơ như muối nitrat, muối perclorat, muối sulfat, muối phosphat, v.v.; các alkan sulfonat thấp như muối metansulfonat, muối triflometansulfonat và muối etansulfonat; muối arylsulfonat như muối benzensulfonat và muối p-toluensulfonat; các muối của axit hữu cơ như muối axetat, muối malat, muối fumarat, muối succinat, muối xitrat, muối tartrat, muối oxalat, muối maleat, v.v.; và các muối của axit amin như muối glyxin, muối lysin, muối arginin, muối ornithin, muối của axit glutamic và muối của axit aspartic. Các muối này có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết. Theo cách khác, oligome đối nghĩa theo sáng chế được chứa trong dược phẩm theo sáng chế có thể ở dạng hydrat của nó.

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

Trong việc dùng oligome đối nghĩa theo sáng chế cho đối tượng mắc chứng loạn dưỡng cơ, dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm chất mang để thúc đẩy sự phân phối oligome đến các mô cơ. Chất mang này không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là dược dụng, và các ví dụ bao gồm các chất mang cation như liposome cation, polyme cation, v.v., hoặc các chất mang sử dụng vỏ virus. Các ví dụ các liposome cation là, ví dụ, các liposome chứa 2-O-(2-diethylaminoethyl)carbamoyl-1,3-O-di-oleoylglycerol và các phospholipit làm các hợp phần chính (sau đây được gọi là "liposome A"), Oligofectamine (nhãn hiệu đã đăng ký) (Invitrogen Corp.), Lipofectin

(nhãn hiệu đã đăng ký) (Invitrogen Corp.), Lipofectamine (nhãn hiệu đã đăng ký) (Invitrogen Corp.), Lipofectamine 2000 (nhãn hiệu đã đăng ký) (Invitrogen Corp.), DMRIE-C (nhãn hiệu đã đăng ký) (Invitrogen Corp.), GeneSilencer (nhãn hiệu đã đăng ký) (Gene Therapy Systems), TransMessenger (nhãn hiệu đã đăng ký) (QIAGEN, Inc.), TransIT TKO (nhãn hiệu đã đăng ký) (Mirus) và Nucleofector II (Lonza). Trong số các chất khác, liposome A là được ưu tiên. Ví dụ về các polyme cation bao gồm JetSI (nhãn hiệu đã đăng ký) (Qbiogene, Inc.) và Jet-PEI (nhãn hiệu đã đăng ký) (polyetylenimin, Qbiogene, Inc.). Ví dụ về các chất mang sử dụng vỏ virus bao gồm GenomeOne (nhãn hiệu đã đăng ký) (HVJ-E liposome, Ishihara Sangyo). Theo cách khác, các thiết bị y tế được mô tả trong patent Nhật Bản số 2924179 và các chất mang cation được mô tả trong công bố lại đơn trong nước Nhật Bản của các đơn PCT số 2006/129594 và 2008/096690 cũng có thể được sử dụng.

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

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

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể ở dạng dung dịch chứa nước. Trong trường hợp này, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa oligome đối nghĩa theo sáng chế ở nồng độ từ 2,5 đến 500 mg/mL, 5 đến 450 mg/mL, 10 đến 400 mg/mL, 15 đến 350 mg/mL, 20 đến 300 mg/mL, 20 đến 250 mg/mL, 20 đến 200 mg/mL, 20 đến 150 mg/mL, 20 đến 100 mg/mL, 20 đến 50 mg/mL, 20 đến 40 mg/mL, 20 đến 30 mg/mL, 23 đến 27 mg/mL, 24 đến 26 mg/mL, hoặc 25 mg/mL. Theo cách khác, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa oligome đối nghĩa theo sáng chế ở nồng độ từ 10 đến 100

mg/mL, 15 đến 95 mg/mL, 20 đến 80 mg/mL, 25 đến 75 mg/mL, 30 đến 70 mg/mL, 35 đến 65 mg/mL, 40 to 60 mg/mL, 45 đến 55 mg/mL, 47 đến 53 mg/mL, 48 đến 52 mg/mL, 49 đến 51 mg/mL, hoặc 50 mg/mL.

Dược phẩm theo sáng chế có thể ở dạng khô. Trong trường hợp này, để bào chế dược phẩm theo sáng chế ở dạng dung dịch nước, dược phẩm theo sáng chế ở dạng khô bao gồm, ví dụ, 125 mg hoặc 250 mg oligome đối nghĩa theo sáng chế ở dạng khô có thể được trộn với 0,5 mL đến 100 mL nước (tương ứng với oligome đối nghĩa theo sáng chế ở nồng độ 1,25 mg/mL đến 250 mg/mL hoặc 2,5 mg/mL đến 500 mg/mL), tốt hơn là với 1 mL đến 50 mL nước (tương ứng với oligome đối nghĩa theo sáng chế ở nồng độ 2,5 mg/mL đến 125 mg/mL hoặc 5 mg/mL đến 250 mg/mL), tốt hơn nữa là với 5 mL đến 10 mL nước (tương ứng với oligome đối nghĩa theo sáng chế ở nồng độ 12,5 mg/mL đến 25 mg/mL hoặc 25 mg/mL đến 50 mg/mL) và được sử dụng.

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

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế bằng cách thêm oligome đối nghĩa theo sáng chế vào dịch phân tán chất mang và khuấy hỗn hợp một cách thích hợp. Các chất phụ gia có thể được thêm vào ở bước thích hợp trước hoặc sau khi thêm oligome đối nghĩa theo sáng chế. Khi dược phẩm theo sáng chế ở dạng dung dịch

nước, dung môi chứa nước có thể được sử dụng trong khi thêm oligome đối nghĩa theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là được dụng, và các ví dụ về dung môi chứa nước bao gồm nước tiêm được hoặc nước cất tiêm được, chất lỏng điện ly như nước muối sinh lý, v.v., và dịch đường như dịch đường glucoza, dịch đường maltoza, v.v.. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể chọn lựa một cách thích hợp các điều kiện về pH và nhiệt độ cho mục đích này.

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

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

Mong muốn là kiểm soát liều dùng dược phẩm theo sáng chế, bằng cách xem xét các yếu tố sau: loại và dạng liều dùng của oligome đối nghĩa theo sáng chế được chứa trong dược phẩm; các tình trạng của đối tượng bao gồm tuổi, thể trọng, v.v.; đường dùng; và các đặc tính và mức độ của bệnh. Liều dùng hàng ngày được tính toán dưới dạng lượng oligome đối nghĩa theo sáng chế thường trong khoảng từ $0,1$

mg đến 10 g/người, và tốt hơn là 1 mg đến 1 g/người. Khoảng trị số này đôi khi có thể thay đổi phụ thuộc vào loại bệnh đích, đường dùng và phân tử đích. Do đó, liều dùng nhỏ hơn khoảng này có thể đủ trong một số trường hợp và ngược lại, liều dùng cao hơn khoảng này đôi khi có thể được yêu cầu. Dược phẩm có thể được dùng từ một đến vài lần một ngày hoặc ở các khoảng cách từ một ngày đến vài ngày.

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

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn có tham chiếu đến các ví dụ và các ví dụ thử nghiệm dưới đây, nhưng không được coi là bị giới hạn ở những ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất oligome đối nghĩa

Theo phương pháp được mô tả trong WO2013/100190, các oligome đối nghĩa được nêu trong Bảng 1 (PMO số 1 đến 7 (SEQ ID NO: 2 đến 8)) mà nhắm đích trình tự bazơ một phần của exon 50 và/hoặc intron 3' liền kề của nó (intron 50) trong gen dystrophin của người được tổng hợp. Chiều dài đầy đủ của mỗi oligome đối nghĩa là

từ 19 đến 21 mer. Giá trị lý thuyết của khối lượng phân tử của mỗi oligome đối nghĩa và giá trị phát hiện của chúng bằng ESI-TOF-MS cũng được thể hiện.

Ví dụ, trong Bảng 1, "H50_109-129" thể hiện rằng khi bazơ đầu tận cùng 5' của exon 50 trong gen dystrophin của người được tính là bazơ thứ nhất và các bazơ xuôi dòng của nó theo hướng 3' được đánh số theo thứ tự, thì oligome đối nghĩa nhắm đích trình tự của các bazơ thứ 109 đến 129. Vì chiều dài đầy đủ của exon 50 là 109 bazơ, nên trình tự của bazơ thứ 110 đến 130 trong trình tự bazơ đích là trình tự bazơ trong intron 50 trong ví dụ này.

Bảng 2

Bảng 1 Các oligome đối nghĩa được tổng hợp (PMO số 1 đến 7)

PMO số	Trình tự bazơ đích	Chiều dài đầy đủ	Trình tự bazơ của PMO	Khối lượng phân tử		SEQ ID NO
				Giá trị theo lý thuyết	Giá trị được phát hiện	
1	H50_109-129	21	ATGGGATCCAGTATACTTACA	6946, 42	6946, 25	2
2	H50_110-129	20	ATGGGATCCAGTATACTTAC	6607, 30	6607, 72	3
3	H50_110-128	19	TGGGATCCAGTATACTTAC	6268, 18	6268, 26	4
4	H50_111-129	19	ATGGGATCCAGTATACTTA	6292, 19	6291, 8	5
5	H50_107-125	19	GATCCAGTATACTTACAGG	6277, 19	6276, 75	6
6	H50_108-126	19	GGATCCAGTATACTTACAG	6277, 19	6277, 13	7
7	H50_112-130	19	AATGGGATCCAGTATACTT	6292, 19	6292, 97	8

Ví dụ 2: Thử nghiệm hoạt tính bỏ qua exon của oligome đối nghĩa

Thử nghiệm bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin của người *in vitro*

(1) Phương pháp thử nghiệm

Sử dụng kit Amaxa Cell Line Nucleofector L và Nucleofector II (Lonza), 0,1 đến 1 μ M của mỗi oligome đối nghĩa trong bảng 1 được chuyển nhiễm với $3,5 \times 10^5$ của các tế bào RD (đòng tế bào sacôm cơ vân của người, CCL-136, được mua từ ATCC)). Chương trình xung được sử dụng để chuyển nhiễm là T-030.

Sau khi chuyển nhiễm, các tế bào RD được nuôi cấy trong ba đêm trong 2 mL môi trường thiết yếu tối thiểu của Eagle (Eagle's Minimal Essential Medium - EMEM) (Sigma, sau đây gọi là như vậy) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (fetal bovine serum -FBS) (Invitrogen) trong điều kiện 37°C và CO₂ 5%.

Các tế bào RD đã được chuyển nhiễm được rửa một lần bằng PBS (Nissui, dưới đây gọi là như vậy) và 350 μ L đệm RA1 (Takara Bio Inc.) chứa 1% 2-mercaptoetanol (Nacalai Tesque, Inc.) được bổ sung vào các tế bào này. Sau khi các tế bào được để ở nhiệt độ trong phòng trong vài phút để dung giải các tế bào, sản phẩm dung giải được thu vào thiết bị lọc NucleoSpin (nhãn hiệu đã đăng ký) (Takara Bio Inc.). Dịch đồng nhất được sản xuất bằng cách ly tâm ở $11.000 \times g$ trong 1 phút. ARN tổng số được chiết xuất từ các tế bào theo quy trình được đính kèm với ARN NucleoSpin (nhãn hiệu đã đăng ký) (Takara Bio Inc.). Nồng độ ARN tổng được chiết được xác định bằng cách sử dụng NanoDrop ONE (Thermo Fisher Scientific Inc.).

PCR theo thời gian thực một bước được thực hiện với 400 ng ARN tổng đã chiết bằng cách sử dụng kit PCT thời gian thực một bước QIAGEN (Qiagen) và thiết bị chu trình nhiệt. Dung dịch phản ứng được chuẩn bị theo quy trình đi kèm với kit. Thiết bị chu trình nhiệt được sử dụng là TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio Inc.). Chương trình PCR thời gian thực được sử dụng là như sau.

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

95°C, 15 phút: hoạt hóa polymeraza, vô hoạt transcriptaza ngược, biến tính nhiệt cADN

[94°C, 30 giây; 60°C, 30 giây; 72°C, 1 phút] $\times$ 35 chu trình: Khuếch đại PCR

72°C, 10 phút: kéo dài lần cuối

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

Đoạn mỗi xuôi: 5'- AACAACCGGATGTGGAAGAG -3' (SEQ ID NO: 9)

Đoạn mỗi ngược: 5'- TTGGAGATGGCAGTTTCCTT -3' (SEQ ID NO: 10)

Sản phẩm phản ứng, 1 μ L PCR trên đây được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.) và MultiNA (Shimadzu Corp.).

Mức polynucleotit của sợi thể hiện rằng exon 50 đã bị bỏ qua (mức polynucleotit "A") và mức polynucleotit của sợi thể hiện rằng exon 50 không bị bỏ qua (mức polynucleotit "B") được đo dưới dạng các cường độ tín hiệu của sợi. Dựa

trên các giá trị đo “A” và “B” này, hiệu quả bỏ qua được xác định bằng phương trình (1) nêu trên.

(2) Các kết quả thử nghiệm

Fig. 1 đến 3 cho thấy kết quả về hiệu quả bỏ qua exon 50 thu được đối với mỗi oligome đối nghĩa. Bảng 2 đến Bảng 4 dưới đây cho thấy giá trị của nồng độ hữu hiệu (EC_{50}) trong đó mỗi oligome đối nghĩa thể hiện hiệu quả bỏ qua ES 50%, được tính toán từ các kết quả này. Thử nghiệm này cho thấy rằng PMO số 1 đến 4 trong số các oligome đối nghĩa có hiệu quả bỏ qua ES cao và giá trị EC_{50} thấp và do đó, gây ra sự bỏ qua exon 50 một cách hiệu quả.

Trong số các oligome đối nghĩa có chiều dài đầy đủ ngắn tới 19 mer, như trong PMO số 3 và 4, PMO số 5 đến 7 có hiệu quả bỏ qua thấp và giá trị EC_{50} cao. Mức độ chồng lấp cũng lớn giữa các trình tự bazơ được nhắm đích bởi PMO số 3 và 4 và PMO số 5 đến 7. Do đó, hiệu quả của PMO số 3 và 4 đối với việc bỏ qua exon 50 là đáng kể.

Các kết quả này đã chứng minh rằng oligome đối nghĩa theo sáng chế, ngay cả khi chiều dài của nó là ngắn so với giải pháp kỹ thuật đã biết, có thể gây ra sự bỏ qua exon 50 với hiệu quả cao.

Bảng 3

Bảng 2 EC_{50} của các oligome đối nghĩa (PMO số 1 và 2)

PMO số	EC_{50} (μ M)	EC_{50} (μ g/mL)
1	0, 45	3, 12
2	0, 49	3, 22

Bảng 4

Bảng 3 EC_{50} của các oligome đối nghĩa (PMO số 1, 3 và 4)

PMO số	EC_{50} (μ M)	EC_{50} (μ g/mL)
1	0, 31	2, 16
3	0, 45	2, 82
4	0, 52	3, 28

Bảng 5

Bảng 4 EC₅₀ của các oligome đối nghĩa (PMO số 1, 5, 6 và 7)

PMO số	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ g/mL)
1	0,41	2,87
5	16,08	100,99
6	3,13	9,78
7	1,23	7,75

Ví dụ 3: Thử nghiệm khả năng hòa tan của oligome đối nghĩa

Thử nghiệm khả năng hòa tan của oligome đối nghĩa trong nước muối sinh lý

Trong số các oligome đối nghĩa có hiệu quả bỏ qua ES cao trong Ví dụ 2, mỗi oligome đối nghĩa của PMO số 2, 3 và 4 mà có chiều dài đầy đủ ngắn từ 19 đến 20 mer và được tổng hợp thuận tiện đã được thử nghiệm về khả năng hòa tan trong nước muối sinh lý của nó để xác minh thêm tính hữu ích cho ứng dụng y tế.

(1) Phương pháp thử nghiệm

45 μL nước muối sinh lý được thêm vào chai mẫu chứa 4,5 mg mỗi oligome đối nghĩa nêu trên và khuấy bằng cách sử dụng sóng siêu âm và xoay để chuẩn bị dung dịch nước muối sinh lý 100 mg/mL. Trình tự mà không gây ra sự kết tủa khi để ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ được đánh giá là có độ hòa tan cao.

(2) Các kết quả thử nghiệm

Tất cả các oligome đối nghĩa được thử nghiệm đều thể hiện độ hòa tan bằng hoặc cao hơn 100 mg/mL trong nước muối sinh lý. Các oligome đối nghĩa này là các oligome đối nghĩa rất hữu ích làm thuốc vì hiệu quả bỏ qua exon 50 cao cũng như khả năng hòa tan cao trong nước muối sinh lý của chúng.

Các kết quả này đã chứng minh rằng oligome đối nghĩa theo sáng chế có các đặc tính vật lý tuyệt vời làm thuốc trong khi vẫn duy trì hoạt tính để tạo ra sự bỏ qua exon 50 trong gen dystrophin với hiệu quả cao.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Các kết quả thử nghiệm trong các ví dụ thử nghiệm đã chứng minh rằng các oligome đối nghĩa theo sáng chế gây ra sự bỏ qua exon 50 với hiệu quả cao một cách rõ rệt trong các tế bào RD. Do đó, các oligome đối nghĩa theo sáng chế là cực kỳ hữu ích để điều trị DMD.

Văn bản danh mục trình tự kèm theo

SEQ ID NO: 1 đến 10: các axit nucleic tổng hợp

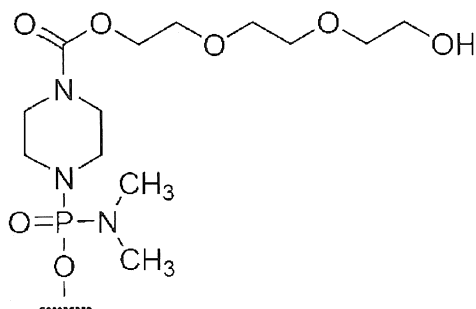
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Oligome đối nghĩa chỉ chứa trình tự bazơ của SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 5 hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó, trong đó oligome đối nghĩa này là (i) oligonucleotit chứa ít nhất một nucleotit có gốc đường được cải biến hoặc gốc liên kết phosphat được cải biến, hoặc (ii) oligome morpholino.
2. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 1, trong đó oligome đối nghĩa này chỉ chứa trình tự bazơ của SEQ ID NO: 4.
3. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 1, trong đó oligome đối nghĩa này chỉ chứa trình tự bazơ của SEQ ID NO: 5.
4. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 1, trong đó oligome đối nghĩa là oligonucleotit.
5. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 4, trong đó oligonucleotit chứa ít nhất một nucleotit có gốc đường được cải biến, và trong đó gốc đường được cải biến là riboza trong đó nhóm 2'-OH được thay bằng OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br, hoặc I (trong đó R là alkyl hoặc aryl, và R' là alkylen).
6. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 4, trong đó oligonucleotit chứa ít nhất một nucleotit có gốc liên kết phosphat được cải biến, và trong đó gốc liên kết phosphat được cải biến này là liên kết phosphorothioat, liên kết phosphorodithioat, liên kết alkylphosphonat, liên kết phosphoramidat, hoặc liên kết boranophosphat.

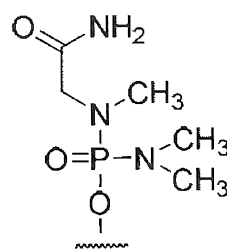
7. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 1, trong đó oligome đối nghĩa là oligome morpholino.

8. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 7, trong đó oligome đối nghĩa là oligome morpholino phosphorodiamidat.

9. Oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 7, trong đó đầu 5' của oligome morpholino có công thức hóa học bất kỳ trong số các công thức hóa học từ (1) đến (3) dưới đây:



(1)



(2)



(3)

10. Dược phẩm chứa (i) oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 1, và (ii) chất mang được dụng, chất phụ gia được dụng, hoặc dung môi chứa nước.

11. Dược phẩm chứa (i) oligome đối nghĩa hoặc muối được dụng hoặc hydrat của nó theo điểm 1, và (ii) chất mang để thúc đẩy sự phân phối oligome đối nghĩa đến các mô cơ.

12. Dược phẩm theo điểm 11, trong đó chất mang là polyme cation.

Fig. 1

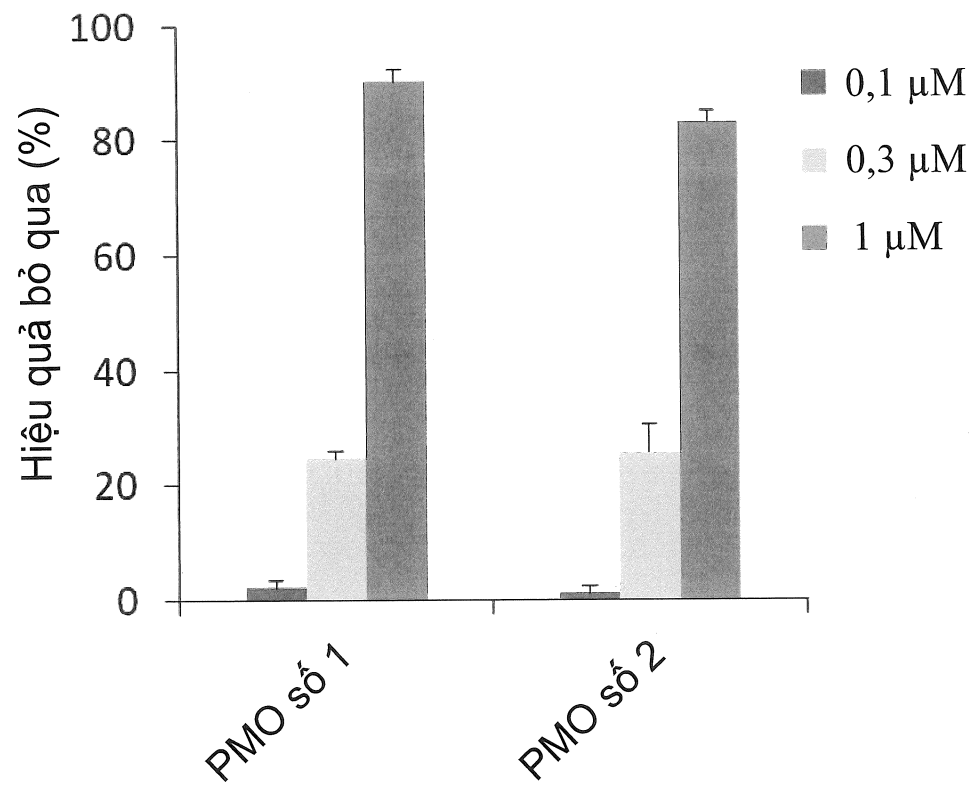


Fig. 2

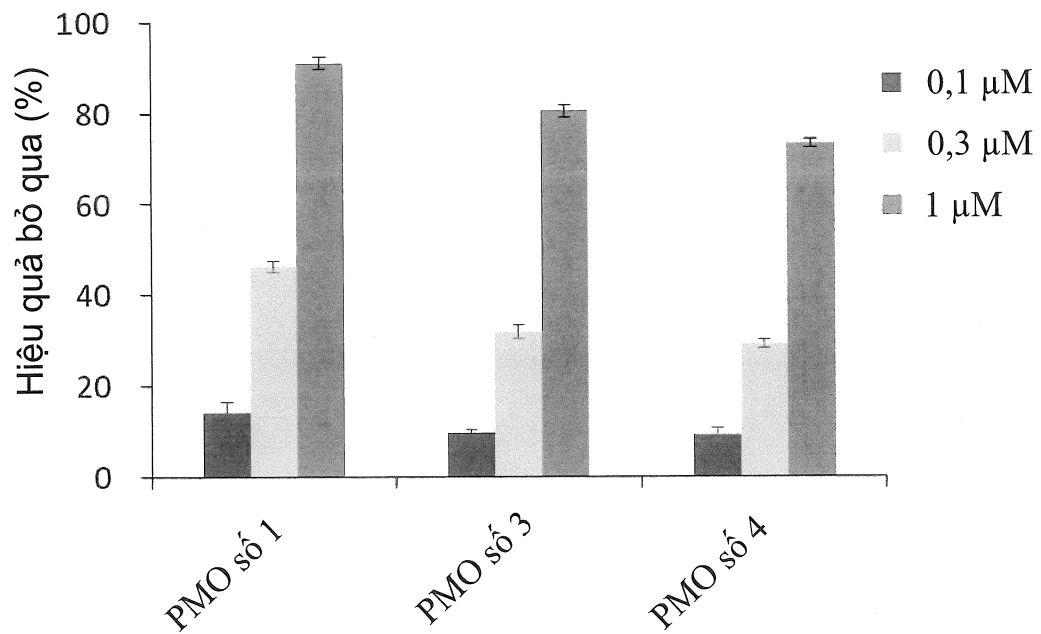
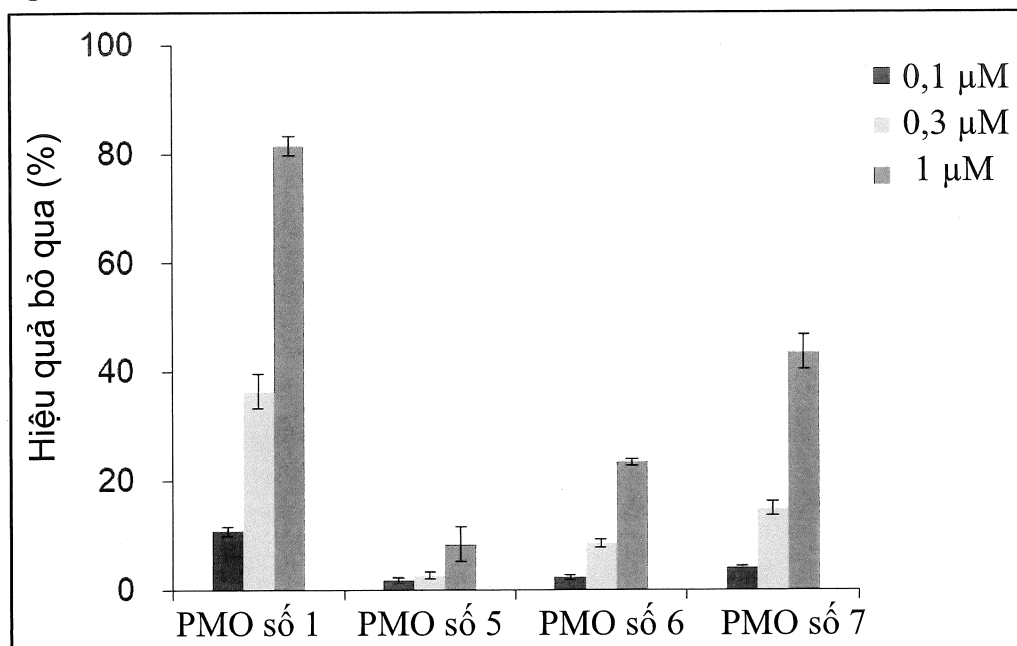


Fig. 3



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Nippon Shinyaku Co., Ltd.
National Center of Neurology and Psychiatry
- <120> Oligome đổi nghĩa gây ra sự bỏ qua exon 50 và được phẩm chứa oligome đổi nghĩa này
- <130> G2506WO
- <140> PCT/JP2020/048803
<141> 25-12-2020
- <150> JP2019-236704
<151> 26-12-2019
- <160> 10
- <170> Patent phiên bản 3.5
- <210> 1
<211> 139
<212> ADN
<213> Nhân tạo
- <220>
<223> Axit nucleic tổng hợp
- <400> 1
aggaagttag aagatctgag ctctgagtgg aaggcggtaa accgtttact tcaagagctg
60

agggcaaagc agcctgacct agctcctgga ctgaccacta ttggagcctg taagtatact
120

ggatcccatt ctctttggc
139
- <210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Nhân tạo
- <220>
<223> Axit nucleic tổng hợp
- <400> 2
atgggatcca gtatacttac a
21

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 3
atgggatcca gtatacttac
20

<210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 4
tgggatccag tatacttac
19

<210> 5
<211> 19
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 5
atgggatcca gtatactta
19

<210> 6
<211> 19
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 6
gatccagtat acttacagg
19

<210> 7
<211> 19
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 7
ggatccagta tacttacag
19

<210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 8
aatgggatcc agtatactt
19

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 9
aacaaccgga tgtggaagag
20

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Axit nucleic tổng hợp

<400> 10
ttggagatgg cagtttcctt
20