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

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

(11) **1-0032568**

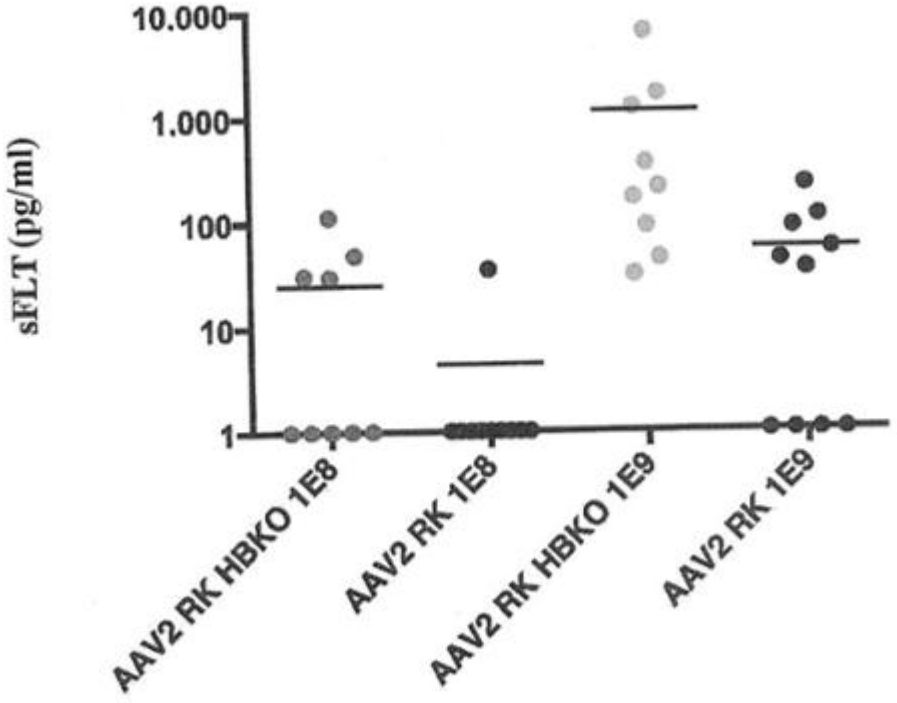
(51)[2020.01] A61K 35/761; A61P 27/02; C12N 7/01; C12N 15/09; A61P 27/06

(13) **B**

(21) 1-2016-04600
(22) 02/05/2015
(86) PCT/US2015/028966 02/05/2015
(87) WO2015/168666 A2 05/11/2015
(30) 61/988,131 02/05/2014 US; 62/114,575 10/02/2015 US
(45) 25/07/2022 412
(43) 25/05/2017 350A
(73) GENZYME CORPORATION (US)
500 Kendall Street Cambridge, Massachusetts 02142, US
(72) SCARIA, Abraham (US); SULLIVAN, Jennifer (US); STANEK, Lisa, M (US).
(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) HẠT VIRUT KẾT HỢP AĐENO TÁI TỔ HỢP (RAAV)

(57) Sáng chế đề cập đến hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) được cải thiện (ví dụ, rAAV2, rAAVrh8R, *v.v.*) dùng cho liệu pháp gen tăng cường của rối loạn ở mắt hoặc rối loạn CNS trong đó rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế của các axit amin mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) biến thể để cải thiện sự chuyển cho mắt và CNS; ví dụ để cải thiện liệu pháp gen võng mạc và cải thiện liệu pháp gen CNS.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh thoái hóa võng mạc là mục tiêu có triển vọng đối với liệu pháp gen qua trung gian vectơ kết hợp ađeno (AAV). Vectơ AAV có thể làm trung gian cho sự biểu hiện gen lâu dài trong võng mạc và gây ra đáp ứng miễn dịch tối thiểu làm cho các vectơ này trở thành sự lựa chọn hấp dẫn để chuyển gen cho mắt. Võng mạc là mô nhạy cảm ánh sáng ở phía sau của mắt mà bao gồm nhiều loại tế bào bao gồm tế bào tiếp nhận kích thích ánh sáng, tế bào biểu mô sắc tố võng mạc và tế bào hạch võng mạc. Loại tế bào đích và đường truyền vectơ đối với vectơ liệu pháp gen AAV sẽ phụ thuộc vào dấu hiệu bệnh. Ví dụ, thử nghiệm lâm sàng Pha I đối với thoái hóa điểm vàng do tuổi tác sử dụng phương pháp chuyển trong thủy tinh thể của vectơ để đạt được sự truyền của tế bào hạch võng mạc và thử nghiệm lâm sàng gần đây đối với sự điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh mù lòa bẩm sinh Leber Typ 2, một dạng của viêm võng mạc sắc tố, sử dụng phương pháp chuyển dưới võng mạc của gen RPE65 để chuyển nạp tế bào biểu mô sắc tố võng mạc.

Theo cách sử dụng này, cần phải phát triển các chất và phương pháp mới để cải thiện sự chuyển AAV cho mắt.

Vectơ dựa trên virut kết hợp ađeno (AAV) cũng trở thành hệ vectơ được ưu tiên cho liệu pháp gen thần kinh, có dữ liệu ghi nhận tốt về độ an toàn trong nhiều thử nghiệm lâm sàng (Kaplitt, M.G. *et al.* (2007) *Lancet* 369:2097-2105; Eberling, J.L. *et al.* (2008) *Neurology* 70:1980-1983; Fiandaca, M.S. *et al.* (2009) *Neuroimage.* 47 Suppl 2:T27-35). Tuy nhiên, sự điều trị hiệu quả của rối loạn thần kinh bị cản trở nhiều bởi các vấn đề có liên quan đến sự chuyển vectơ AAV vào quần thể tế bào bị

rối loạn. Vấn đề chuyển này đặc biệt khó giải quyết đối với các rối loạn liên quan đến hệ thần kinh trung ương (CNS). Theo đó, vẫn cần phải tăng cường sự chuyển AAV vào CNS.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một số khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp chuyển axit nucleic khác loại cho mắt của cá thể bao gồm bước sử dụng hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) vào dưới võng mạc của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên việc đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh 2 (AAV2). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm tăng hiệu quả chuyển nạp bằng hạt rAAV của tế bào ở mắt hoặc CNS. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm tăng hiệu quả chuyển nạp bằng hạt rAAV của tế bào ở mắt hoặc CNS bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%, ví dụ, khi so với capsit rAAV tham chiếu có chứa protein capsit AAV kiểu dại. Theo một số phương án, tế bào của mắt là tế bào võng mạc, tế bào tiếp nhận kích thích ánh sáng, tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, tế bào lưỡng cực, tế bào ngang, tế bào không có sợi nhánh, tế bào muller và/hoặc tế bào hạch. Theo một số phương án, tế bào của CNS là tế bào thần kinh đệm ít gai, tế bào hình sao, nơron, tế bào nhu mô não, tế bào thần kinh đệm, tế bào ống nội tủy, và/hoặc tế bào Purkinje.

Theo một số phương án, hạt AAV theo sáng chế có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin ở vị trí 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAV2 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với các SEQ ID NO:2, 4 và/hoặc 6. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R532. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484 và R487 hoặc ở các vị trí R585 và R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế R484A và R487A hoặc sự thế R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo các phương án khác, capsit AAV có chứa sự thế axit amin R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV-2. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV1, capsit AAV2, capsit AAV3, capsit AAV6, capsit AAV8, capsit AAVrh8R, capsit AAV9, hoặc capsit AAVrh10.

Theo một số phương án, hạt AAV theo sáng chế có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin ở vị trí 485, 488, 528, 533, 586 hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt AAV theo sáng chế có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin ở vị trí 485, 488, 528, hoặc 533, đánh số

dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin không tích điện dương bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin kỵ nước được thế bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc alanin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo một số phương án, sự thế axit amin là ở vị trí 485, 488, 528, 533, hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt AAV theo sáng chế có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin ở vị trí 485, 488, 528, hoặc 533, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R485, R488, R533, hoặc T589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV nêu trong SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tươngđồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, sự thế một axit amin có chứa sự thế R533A, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R.

Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV1, AAV6, hoặc AAV9 và trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin ở vị trí 485, 488, 528, 533, 586 và/hoặc

589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV1, AAV6, hoặc AAV9; và/hoặc trong đó hạt rAAV có chứa capsit AAV8 hoặc AAVrh10 và trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin ở vị trí 487, 490, 535, 588 và/hoặc 591, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV8 hoặc AAVrh10.

Theo một số phương án, hạt AAV theo sáng chế có chứa capsit có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết với HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ việc liên kết với HSPG) hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2 và vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được chọn từ nhóm gồm có chất chống oxy hóa, yếu tố dinh dưỡng thần kinh, yếu tố chống chết tế bào theo chương trình, yếu tố chống tạo mạch, và yếu tố chống viêm. Theo các phương án khác, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được chọn từ nhóm gồm có: Prph2, RPE65, AIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, Clarin,, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NFκB, Enđostatin, Angiostatin, sFlt, sPDGF-R, IL10, kháng-IL17, sIL17R, IL1-ra, kháng-TGFβ, sTNF-R I, sTNF-R II, và IL4. Theo các phương án khác, axit nucleic khác loại mã hóa cho axit nucleic trị liệu. Theo các phương án khác, axit nucleic trị liệu là siARN, shARN ARNi, miARN, ARN đối nghĩa, ribozym hoặc ADNzym. Theo một số phương án, vectơ rAAV là vectơ rAAV tự bổ sung.

Theo một số phương án, hạt AAV theo sáng chế có chứa capsit có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết với HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ việc liên kết với HSPG) hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2 và axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu, trong đó axit nucleic khác loại chịu sự kiểm soát của trình tự vùng khởi đầu mà

được biểu hiện ở võng mạc. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được liên kết có điều khiển với vùng khởi đầu thích hợp cho sự biểu hiện của polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu ở một hoặc nhiều loại tế bào võng mạc. Theo một số phương án, tế bào võng mạc là tế bào tiếp nhận kích thích ánh sáng, tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, tế bào lưỡng cực, tế bào ngang, tế bào không có sợi nhánh, tế bào muller và/hoặc tế bào hạch. Theo một số phương án, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu rhođopsin kinaza (RK), vùng khởi đầu opsin, vùng khởi đầu virut cự bào (CMV), vùng khởi đầu β-actin ở gà (CBA).

Theo một số phương án, hạt AAV theo sáng chế có chứa capsit có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết với HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ việc liên kết với HSPG) hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2 và axit nucleic khác loại để chuyển axit nucleic khác loại vào võng mạc của cá thể. Theo một số phương án, cá thể là người. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được sử dụng để điều trị rối loạn ở mắt được chọn từ nhóm gồm có: bệnh thoái hóa võng mạc khởi phát sớm nặng do gen lặn trên nhiễm sắc thể thường (bệnh mù lòa bẩm sinh Leber), chứng mù màu bẩm sinh, bệnh Stargardt, bệnh Best, bệnh Doyne, chứng loạn dưỡng nón, viêm võng mạc sắc tố, võng mạc tách bẩm sinh di truyền liên kết trên nhiễm sắc thể X, hội chứng Usher, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác teo, AMD tạo mạch mới, thoái hóa điểm vàng do tiểu đường, bệnh võng mạc tiểu đường tăng sinh (PDR), phù thũng điểm vàng trong mắt, bệnh hắc võng mạc trung tâm thanh dịch, sự bong võng mạc, viêm bên trong mắt, bệnh glôcôm, và viêm màng mạch nho phía sau.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sự chuyển nạp rAAVh của tế bào sau khi chuyển dưới võng mạc hạt rAAV vào mắth của cá thể so với sự chuyển nạp của tế bào bằng rAAV có chứa capsit kiểu dại, phương pháp này bao gồm bước kết hợp một hoặc nhiều sự thế axit amin ở protein capsit AAV ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều

vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2; trong đó hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV và vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sự biểu hiện của axit nucleic khác loại sau khi chuyển dưới võng mạc hạt rAAV vào mắt của cá thể, phương pháp này bao gồm bước kết hợp một hoặc nhiều sự thế axit amin ở protein capsit AAV ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2; trong đó hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV và vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV.

Theo một số phương án, hạt rAAV có sự chuyển nạp được cải thiện và/hoặc sự biểu hiện được cải thiện của axit nucleic khác loại có chứa capsit AAV typ huyết thanh 2 (AAV2). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%.

Theo một số phương án, hạt rAAV có sự chuyển nạp được cải thiện và/hoặc sự biểu hiện được cải thiện của axit nucleic khác loại có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAV2 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin

hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với các SEQ ID NO:2, 4 và/hoặc 6. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484 và R487 hoặc ở các vị trí R585 và R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế R484A và R487A hoặc sự thế R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo các phương án khác, capsit AAV có chứa sự thế axit amin R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV-2. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV1, capsit AAV2, capsit AAV3, capsit AAV6, capsit AAV8, capsit AAVrh8R, capsit AAV9, hoặc capsit AAVrh10.

Theo một số phương án, hạt rAAV có sự chuyển nạp được cải thiện và/hoặc sự biểu hiện được cải thiện của axit nucleic khác loại có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 485, 488, 528, 533, 586 hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt AAV theo sáng chế có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin ở vị trí 485, 488, 528, hoặc 533, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin không tích điện

dương bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin kỵ nước được thế bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc alanin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc alanin đối với gốc arginin hoặc lysin. Theo một số phương án, sự thế axit amin là ở vị trí 485, 488, 528, 533, hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt AAV theo sáng chế có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin ở vị trí 485, 488, 528, hoặc 533, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R485, R488, R533, hoặc T589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV nêu trong SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tươngđồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, sự thế một axit amin có chứa sự thế R533A, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R.

Theo một số phương án, hạt rAAV có sự chuyển nạp được cải thiện và/hoặc sự biểu hiện được cải thiện của axit nucleic khác loại có chứa capsit có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết với HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với HSPG) hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2 và vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được chọn từ nhóm gồm có chất chống oxy hóa, yếu tố dinh dưỡng thần kinh, yếu tố chống chết tế bào theo chương trình, yếu tố chống tạo mạch, và yếu tố chống viêm. Theo các phương án khác, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được chọn từ nhóm gồm có: Prph2, RPE65, AIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a,

Clarin,, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NFκB, Enđostatin, Angiostatin, sFlt, sPDGF-R, IL10, kháng-IL17, sIL17R, IL1-ra, kháng-TGFβ, sTNF-R I, sTNF-R II, và IL4. Theo các phương án khác, axit nucleic khác loại mã hóa cho axit nucleic trị liệu. Theo các phương án khác, axit nucleic trị liệu là siARN, shARN ARNi, miARN, ARN đối nghĩa, ribozym hoặc ADNzym. Theo một số phương án, vectơ rAAV là vectơ rAAV tự bổ sung.

Theo một số phương án, hạt rAAV có sự chuyển nạp được cải thiện và/hoặc sự biểu hiện được cải thiện của axit nucleic khác loại có chứa capsit có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết với HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với HSPG) hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2 và axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu, trong đó axit nucleic khác loại chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mà được biểu hiện ở võng mạc. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được liên kết có điều khiển với vùng khởi đầu thích hợp cho sự biểu hiện của polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu ở một hoặc nhiều loại tế bào võng mạc. Theo một số phương án, tế bào võng mạc là tế bào nhận kích thích ánh sáng, tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, và/hoặc tế bào hạch. Theo một số phương án, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu rhođopsin kinaza (RK), vùng khởi đầu opsin, vùng khởi đầu virut cự bào (CMV), vùng khởi đầu β-actin ở gà (CBA).

Theo một số phương án, hạt rAAV có sự chuyển nạp được cải thiện và/hoặc sự biểu hiện được cải thiện của axit nucleic khác loại có chứa có chứa capsit có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết với HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với HSPG) hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2 và axit nucleic khác loại để chuyển axit nucleic khác loại vào võng mạc của cá thể. Theo một số phương án, cá thể là người. Theo một số phương án, axit nucleic

khác loại được sử dụng để điều trị rối loạn ở mắt được chọn từ nhóm gồm có: bệnh thoái hóa võng mạc khởi phát sớm nặng do gen lặn trên nhiễm sắc thể thường (bệnh mù lòa bẩm sinh Leber), chứng mù màu bẩm sinh, bệnh Stargardt, bệnh Best, bệnh Doyne, chứng loạn dưỡng nón, viêm võng mạc sắc tố, võng mạc tách bẩm sinh di truyền liên kết trên nhiễm sắc thể X, hội chứng Usher, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác teo, AMD tạo mạch mới, thoái hóa điểm vàng do tiểu đường, bệnh võng mạc tiểu đường tăng sinh (PDR), phù thũng điểm vàng trong mắt, bệnh hắc võng mạc trung tâm thanh dịch, sự bong võng mạc, viêm bên trong mắt, bệnh glôcôm, và viêm màng mạch nho phía sau.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị rối loạn ở mắt ở cá thể (*ví dụ*, người) bao gồm bước chuyển hợp phần có chứa hạt rAAV vào võng mạc của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh 2 (AAV2). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước chuyển dưới võng mạc hạt rAAV có chứa vectơ rAAV mã hóa cho axit nucleic khác loại được sử dụng trong việc điều trị rối loạn ở mắt ở cá thể (*ví dụ*, người), trong đó hạt rAAV có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAV2 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một số

phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với các SEQ ID NO:2, 4 và/hoặc 6. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484 và R487 hoặc ở các vị trí R585 và R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế R484A và R487A hoặc sự thế R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo các phương án khác, capsit AAV có chứa sự thế axit amin R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV-2. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV1, capsit AAV2, capsit AAV3, capsit AAV6, capsit AAV8, capsit AAVrh8R, capsit AAV9, hoặc capsit AAVrh10.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước chuyển dưới võng mạc hạt rAAV có chứa vectơ rAAV mã hóa cho axit nucleic khác loại được sử dụng trong việc điều trị rối loạn ở mắt ở cá thể (*ví dụ*, người), trong đó hạt rAAV có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 485, 488, 528, 533, 586 hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt AAV theo sáng chế có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin ở vị trí 485, 488, 528, hoặc 533, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự

thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin không tích điện dương bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin kỵ nước được thế bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc alanin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc alanin đối với gốc arginin hoặc lysin. Theo một số phương án, sự thế axit amin là ở vị trí 485, 488, 528, 533, hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt AAV theo sáng chế có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin ở vị trí 485, 488, 528, hoặc 533, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R485, R488, R533, hoặc T589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV nêu trong SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tươngđồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, sự thế một axit amin có chứa sự thế R533A, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước chuyển dưới võng mạc hạt rAAV có chứa vectơ rAAV mã hóa cho axit nucleic khác loại được sử dụng trong việc điều trị rối loạn ở mắt ở cá thể (*ví dụ*, người) và capsit có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết với HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ

sự liên kết với HSPG) hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được chọn từ nhóm gồm có chất chống oxy hóa, yếu tố dinh dưỡng thần kinh, yếu tố chống chết tế bào theo chương trình, yếu tố chống tạo mạch, và yếu tố chống viêm. Theo các phương án khác, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được chọn từ nhóm gồm có: Prph2, RPE65, AIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, Clarin,, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NFκB, Enđostatin, Angiostatin, sFlt, sPDGF-R, IL10, kháng-IL17, sIL17R, IL1-ra, kháng-TGFβ, sTNF-R I, sTNF-R II, và IL4. Theo các phương án khác, axit nucleic khác loại mã hóa cho axit nucleic trị liệu. Theo các phương án khác, axit nucleic trị liệu là siARN, shARN ARNi, miARN, ARN đối nghĩa, ribozym hoặc ADNzym. Theo một số phương án, vectơ rAAV là vectơ rAAV tự bổ sung.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước chuyển dưới võng mạc hạt rAAV có chứa vectơ rAAV mã hóa cho axit nucleic khác loại được sử dụng trong việc điều trị rối loạn ở mắt ở cá thể (*ví dụ*, người) và capsit có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết với HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với HSPG) hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, trong đó axit nucleic khác loại chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mà được biểu hiện ở võng mạc. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được liên kết có điều khiển với vùng khởi đầu thích hợp cho sự biểu hiện của polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu ở một hoặc nhiều loại tế bào võng mạc. Theo một số phương án, tế bào võng mạc là tế bào nhận kích thích ánh sáng, tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, và/hoặc tế bào hạch. Theo một số phương án, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu rhođopsin kinaza (RK), vùng khởi đầu opsin, vùng khởi đầu virut cự bào (CMV), vùng khởi đầu β-actin ở gà (CBA).

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước chuyển dưới võng mạc hạt rAAV có chứa vectơ rAAV mã hóa cho axit nucleic khác loại được sử dụng trong việc điều trị rối loạn ở mắt ở cá thể (*ví dụ*, người) và capsit có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết với HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với HSPG) hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, trong đó rối loạn ở mắt được chọn từ nhóm gồm có: bệnh thoái hóa võng mạc khởi phát sớm nặng do gen lặn trên nhiễm sắc thể thường (bệnh mù lòa bẩm sinh Leber), chứng mù màu bẩm sinh, bệnh Stargardt, bệnh Best, bệnh Doyne, chứng loạn dưỡng nón, viêm võng mạc sắc tố, võng mạc tách bẩm sinh di truyền liên kết trên nhiễm sắc thể X, hội chứng Usher, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác teo, AMD tạo mạch mới, thoái hóa điểm vàng do tiểu đường, bệnh võng mạc tiểu đường tăng sinh (PDR), phù thũng điểm vàng trong mắt, bệnh hắc võng mạc trung tâm thanh dịch, sự bong võng mạc, viêm bên trong mắt, bệnh glôcôm, và viêm màng mạch nho phía sau.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước chuyển dưới võng mạc hợp phần có chứa hạt rAAV, trong đó hạt rAAV có chứa vectơ rAAV mã hóa cho axit nucleic khác loại được sử dụng trong việc điều trị rối loạn ở mắt ở cá thể (*ví dụ*, người) và capsit có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết với HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với HSPG) hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số phương án, nồng độ của hạt trong hợp phần nằm trong khoảng từ khoảng 1 x 10^6 DRP/ml đến khoảng 1 x 10^{14} DRP/ml. Theo một số phương án, hợp phần của hạt rAAV hữu hiệu trong việc điều trị thị lực của cá thể. Theo một số phương án, thị lực được đánh giá bằng vi đo thị trường, đo thị trường thích nghi tối, đánh giá tính di động nhìn, thị lực, ERG, hoặc đánh giá khả năng đọc. Theo một số phương án, phương pháp này dẫn đến sự cải thiện của thị lực của cá thể. Theo một số phương án, phương pháp này dẫn đến sự ngăn ngừa hoặc làm

chậm sự tiến triển của sự suy giảm của thị lực của người do sự tiến triển của rối loạn ở mắt.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hệ thống để chuyển dưới võng mạc vectơ vào mắt của cá thể, có chứa a) hợp phần có chứa lượng hữu hiệu của hạt rAAV, trong đó i) protein capsit của hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và ii) vectơ có chứa axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc ARN trị liệu và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV; và b) dụng cụ để chuyển rAAV qua võng mạc. Theo một số phương án, dụng cụ này có chứa ống thông dò có lỗ khoan nhỏ và ống tiêm, trong đó ống thông dò có lỗ khoan nhỏ có khổ từ 27 đến 45. Theo một số phương án, hợp phần của hạt rAAV được chứa trong ống tiêm. Theo một số phương án, ống thông dò được gắn vào ống tiêm. Theo một số phương án, nồng độ của hạt trong hợp phần nằm trong khoảng từ khoảng 1 x 10^6 DRP/ml đến khoảng 1 x 10^{14} DRP/ml.

Theo một số phương án, hạt rAAV của hệ thống có chứa capsit AAV2 có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm tăng hiệu quả chuyển nạp bằng hạt rAAV của tế bào ở mắt hoặc CNS. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm tăng hiệu quả chuyển nạp bằng hạt rAAV của tế bào ở mắt hoặc CNS bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%, *ví dụ,* khi so với capsit rAAV tham chiếu có chứa protein capsit AAV kiểu dại. Theo một số phương án, tế bào của

mắt là tế bào võng mạc, tế bào tiếp nhận kích thích ánh sáng, tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, tế bào lưỡng cực, tế bào ngang, tế bào không có sợi nhánh, tế bào muller và/hoặc tế bào hạch. Theo một số phương án, tế bào của CNS là tế bào thần kinh đệm ít gai, tế bào hình sao, nơron, tế bào nhu mô não, tế bào thần kinh đệm, tế bào ống nội tủy, và/hoặc tế bào Purkinje.

Theo một số phương án, hạt rAAV của hệ thống có chứa capsit AAV2 có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAV2 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với các SEQ ID NO:2, 4 và/hoặc 6. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484 và R487 hoặc ở các vị trí R585 và R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế R484A và R487A hoặc sự thế R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo các phương án khác, capsit AAV có chứa sự thế axit amin R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV-2. Theo

một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV1, capsit AAV2, capsit AAV3, capsit AAV6, capsit AAV8, capsit AAVrh8R, capsit AAV9, hoặc capsit AAVrh10.

Theo một số phương án, hạt rAAV của hệ thống có chứa capsit AAV2 có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 485, 488, 528, 533, 586 hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin không tích điện dương bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin kỵ nước được thế bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc alanin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc alanin đối với gốc arginin hoặc lysin. Theo một số phương án, sự thế axit amin là ở vị trí 485, 488, 528, 533, hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R485, R488, R533, hoặc T589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV nêu trong SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tươngđồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với SEQ ID NO:11. Theo

một số phương án, sự thế một axit amin có chứa sự thế R533A, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R.

Theo một số phương án, hạt rAAV của hệ thống có chứa capsit AAV có một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết) hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2 và vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được chọn từ nhóm gồm có chất chống oxy hóa, yếu tố dinh dưỡng thần kinh, yếu tố chống chết tế bào theo chương trình, yếu tố chống tạo mạch, và yếu tố chống viêm. Theo các phương án khác, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được chọn từ nhóm gồm có: Prph2, RPE65, AIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, Clarin,, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NFκB, Enđostatin, Angiostatin, sFlt, sPDGF-R, IL10, kháng-IL17, sIL17R, IL1-ra, kháng-TGFβ, sTNF-R I, sTNF-R II, và IL4. Theo các phương án khác, axit nucleic khác loại mã hóa cho axit nucleic trị liệu. Theo các phương án khác, axit nucleic trị liệu là siARN, ARNi, miARN, ARN đối nghĩa, ribozym hoặc ADNzym. Theo một số phương án, vectơ rAAV là vectơ rAAV tự bổ sung.

Theo một số phương án, hạt rAAV của hệ thống có chứa capsit AAV có một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết) hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2 và vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại, trong đó axit nucleic khác loại chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mà được biểu hiện ở võng mạc. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được liên kết có điều khiển với vùng khởi đầu thích hợp cho sự biểu hiện của polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu ở một hoặc nhiều loại tế bào

võng mạc. Theo một số phương án, tế bào võng mạc là tế bào nhận kích thích ánh sáng, tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, và/hoặc tế bào hạch. Theo một số phương án, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu rhođopsin kinaza (RK), vùng khởi đầu opsin, vùng khởi đầu virut cự bào (CMV), vùng khởi đầu β-actin ở gà (CBA).

Theo một số phương án, hạt rAAV của hệ thống có chứa capsit AAV có một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết) hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2 và vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại được sử dụng để chuyển axit nucleic khác loại vào võng mạc của cá thể. Theo một số phương án, cá thể là người. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được sử dụng để điều trị rối loạn ở mắt được chọn từ nhóm gồm có: bệnh thoái hóa võng mạc khởi phát sớm nặng do gen lặn trên nhiễm sắc thể thường (bệnh mù lòa bẩm sinh Leber), chứng mù màu bẩm sinh, bệnh Stargardt, bệnh Best, bệnh Doyne, chứng loạn dưỡng nón, viêm võng mạc sắc tố, võng mạc tách bẩm sinh di truyền liên kết trên nhiễm sắc thể X, hội chứng Usher, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác teo, AMD tạo mạch mới, thoái hóa điểm vàng do tiểu đường, bệnh võng mạc tiểu đường tăng sinh (PDR), phù thũng điểm vàng trong mắt, bệnh hắc võng mạc trung tâm thanh dịch, sự bong võng mạc, viêm bên trong mắt, bệnh glôcôm, và viêm màng mạch nho phía sau.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để chuyển axit nucleic khác loại vào hệ thần kinh trung ương (CNS) của cá thể bao gồm bước sử dụng hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) cho CNS của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sự chuyển nạp rAAV của tế bào trong hệ thần

kinh trung ương (CNS) của cá thể so với sự chuyển nạp của tế bào bằng rAAV có chứa capsit kiểu dại, phương pháp này bao gồm bước sử dụng hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) cho CNS của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sự biểu hiện của axit nucleic khác loại trong hệ thần kinh trung ương (CNS) của cá thể, phương pháp này bao gồm bước sử dụng hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) cho CNS của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV. Theo các khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị rối loạn của hệ thần kinh trung ương (CNS) của cá thể bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của hợp phần có chứa hạt rAAV vào CNS của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, axit nucleic khác loại được biểu hiện ở mức độ biểu hiện tăng lên, khi so với mức độ biểu hiện của axit nucleic khác loại của hạt rAAV có chứa capsit rAAV tham chiếu. Theo một số phương án, sự biểu hiện của axit nucleic được tăng lên bằng ít nhất là khoảng 10%, ít nhất là khoảng 25%, ít nhất là khoảng 50%, ít nhất là khoảng 75%, hoặc ít nhất là khoảng 100%. Theo một số phương án, hạt rAAV làm giảm viêm thần kinh,

khi so với hạt rAAV có chứa capsit rAAV tham chiếu. Theo một số phương án, viêm thần kinh được làm giảm bằng ít nhất là khoảng 10%, ít nhất là khoảng 25%, ít nhất là khoảng 50%, ít nhất là khoảng 75%, hoặc ít nhất là khoảng 100%. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh 2 (AAV2). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan, khi so với sự liên kết của hạt rAAV có chứa capsit rAAV tham chiếu vào heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%, khi so với sự liên kết của hạt rAAV có chứa capsit tham chiếu vào heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, capsit rAAV tham chiếu có chứa capsit hoặc protein capsit rAAV kiểu dại. Theo một số phương án, capsit rAAV tham chiếu có chứa capsit hoặc protein capsit rAAV mà thiếu một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm tăng hiệu quả chuyển nạp bằng hạt rAAV của tế bào ở mắt hoặc CNS. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm tăng hiệu quả chuyển nạp bằng hạt rAAV của tế bào ở mắt hoặc CNS bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%, *ví dụ,* khi so với capsit rAAV tham chiếu có chứa protein capsit AAV kiểu dại. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV1, capsit AAV2, capsit AAV3, capsit AAV6, capsit AAV8, capsit AAVrh8R, capsit AAV9, hoặc capsit AAVrh10.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, việc sử dụng gồm tiêm trực tiếp vào tủy sống và/hoặc sử dụng trong não. Theo một số

phương án, sử dụng trong não là ở vị trí được chọn từ nhóm gồm có não, hành tủy, cầu não, tiểu não, khoang trong sọ, màng não xung quanh não, màng cứng, màng nhện, màng mềm, dịch não tủy (CSF) của không gian dưới màng nhện xung quanh não, nhân tiểu não sâu của tiểu não, hệ thống não thất của não, không gian dưới màng nhện, thể vân, vỏ não, vách ngăn, đồi não, vùng dưới đồi, và nhu mô của não. Theo một số phương án, việc sử dụng là tiêm trong não thất vào ít nhất là một não thất bên. Theo một số phương án, việc sử dụng là tiêm nội tủy mạc trong vùng cổ, ngực, và/hoặc thắt lưng. Theo một số phương án, việc sử dụng là tiêm trong thể vân. Theo một số phương án, việc sử dụng là tiêm trong đồi. Theo một số phương án, việc sử dụng là tiêm nhu mô. Theo một số phương án, việc sử dụng gồm có tiêm trực tiếp vào tủy sống, dùng trong sọ, và/hoặc trong não. Theo một số phương án, hạt rAAV được sử dụng ở vị trí đơn lẻ.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, hạt rAAV được chuyển bằng cách chuyển hướng đích. Theo một số phương án, hạt rAAV được chuyển bằng cách chuyển tăng cường đối lưu. Theo một số phương án, hạt rAAV được sử dụng bằng cách sử dụng hệ thống chuyển CED. Theo một số phương án, hệ thống chuyển CED có chứa ống thông dò và/hoặc bơm. Theo một số phương án, ống thông dò là ống thông dò chống hồi lưu hoặc ống thông dò từng bậc. Theo một số phương án, bơm là bơm vận hành bằng tay. Theo một số phương án, bơm là bơm thẩm thấu. Theo một số phương án, bơm là bơm truyền.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, heparan sulfat proteoglycan được biểu hiện trên một hoặc nhiều tế bào của CNS. Theo một số phương án, một hoặc nhiều tế bào của CNS là tế bào thần kinh đệm ít gai, tế bào hình sao, nơron, tế bào nhu mô não, tế bào thần kinh đệm, tế bào ống nội tủy, và/hoặc tế bào Purkinje. Theo một số phương án, heparan sulfat proteoglycan được biểu hiện trên nơron.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, axit nucleic khác loại được biểu hiện ở một hoặc nhiều tế bào của CNS. Theo một số

phương án, một hoặc nhiều tế bào của CNS là tế bào thần kinh đệm ít gai, tế bào hình sao, nơron, tế bào nhu mô não, tế bào thần kinh đệm, tế bào ống nội tủy, và/hoặc tế bào Purkinje. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được biểu hiện ở nơron. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được biểu hiện chuyên biệt ở nơron.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở 448, 451, 484, 487, 527, 532, 585 và/hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAV2 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R347, R350, K390, K395, R448, R451, R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với các SEQ ID NO:2, 4 và/hoặc 6. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế R347A, R350A, K390A, K395A, R448A, R451A, R484A, R487A, K527A, K532A, R585A và/hoặc R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484 và R487 hoặc ở các vị trí R585 và R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự

thế axit amin có chứa sự thế R484A và R487A hoặc sự thế R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế axit amin R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế axit amin K532A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 485, 488, 528, 533, 586 hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin không tích điện dương bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin kỵ nước được thế bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc alanin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc alanin đối với gốc arginin hoặc lysin. Theo một số phương án, sự thế axit amin là ở vị trí 485, 488, 528, 533, hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R485, R488, R533, hoặc T589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV nêu trong SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tươngđồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với

SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, sự thế một axit amin có chứa sự thế R533A, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho gen kết hợp CNS. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được chọn từ nhóm gồm có enzym, yếu tố dinh dưỡng thần kinh, polypeptit mà bị thiếu hụt hoặc bị đột biến ở cá thể mắc rối loạn liên quan đến CNS, chất chống oxy hóa, yếu tố chống chết tế bào theo chương trình, yếu tố chống tạo mạch, và yếu tố chống viêm, alpha-synuclein, axit beta-glucosiđaza (GBA), beta-galactosiđaza-1 (GLB1), iđuronat 2-sulfataza (IDS), galactosylxeramiđaza (GALC), manosiđaza, alpha-D-manosiđaza (MAN2B1), beta-manosiđaza (MANBA), pseuđoarylsulfataza A (ARSA), N-axetylglucosamin-1-phosphotransferaza (GNPTAB), axit sphingomyelinaza (ASM), protein Niemann-Pick C (NPC1), axit alpha-1,4-glucosiđaza (GAA), dưới đơn vị hexosaminiđaza beta, HEXB, N-sulfoglucosamin sulfohyđrolaza (MPS3A), N-alpha-axetylglucosaminiđaza (NAGLU), heparin axetyl-CoA, alpha-glucosaminiđaza N-axetyltransferaza (MPS3C), N-axetylglucosamin-6-sulfataza (GNS), alpha-N-axetylgalactosaminiđaza (NAGA), beta-glucuroniđaza (GUSB), dưới đơn vị hexosaminiđaza alpha (HEXA), huntingtin (HTT), axit lipaza của lysosom (LIPA), Aspartylglucosaminiđaza, Alpha-galactosiđaza A, Palmitoyl protein thioesteraza, Tripeptiđyl peptiđaza, protein xuyên màng của lysosom, chất vận chuyển xystein, axit xeramiđaza, axit alpha-L-fucosiđaza, cathepsin A, alpha-L-iđuroniđaza, Arylsulfataza B, Arylsulfataza A, N-axetylgalactosamin-6-sulfat, axit beta-galactosiđaza, hoặc alpha-neuramiđaza. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được chọn từ nhóm gồm có protein ức chế sự chết tế bào theo chương trình ở nơron (NAIP), yếu tố sinh trưởng thần kinh (NGF), yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc thần kinh đệm (GDNF), yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc não (BDNF), yếu tố dinh dưỡng thần kinh ở thể mi (CNTF), tyrosin hyđroxylaza (TH), GTP-xyclohyđrolaza (GTPCH), axit amin đecarboxylaza (AADC), chất chống oxy

hóa, polypeptit chống tạo mạch, polypeptit kháng viêm, và aspartoaxylaza (ASPA). Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho axit nucleic trị liệu. Theo một số phương án, axit nucleic trị liệu là siARN, shARN, ARNi, miARN, ARN đối nghĩa, ribozym hoặc ADNzym. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mà được biểu hiện ở một hoặc nhiều tế bào của CNS. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu được chọn từ nhóm gồm có vùng khởi đầu rất sớm virut cự bào (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, vùng khởi đầu phosphoglyxerat kinaza- 1 (PGK), vùng khởi đầu virut khỉ 40 (SV40), vùng khởi đầu CK6, vùng khởi đầu transthyretin (TTR), vùng khởi đầu TK, vùng khởi đầu đáp ứng tetraxyclin (TRE), vùng khởi đầu HBV, vùng khởi đầu hAAT, vùng khởi đầu LSP, vùng khởi đầu đặc hiệu gan khảm (LSP), vùng khởi đầu E2F, vùng khởi đầu telomeraza (hTERT); vùng khởi đầu vùng tăng cường virut cự bào/beta-actin ở gà/β-globin ở thỏ (CAG), vùng khởi đầu yếu tố kéo dài 1-alpha (EFl-alpha), vùng khởi đầu β-glucuroniđaza ở người, vùng khởi đầu β-actin ở gà (CBA), vùng khởi đầu LTR virut gây ung thư mô liên kết Rous phiên mã ngược (RSV), vùng khởi đầu đihyđrofolat ređuctaza, và vùng khởi đầu 13-actin. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được liên kết có điều khiển với vùng khởi đầu thích hợp để biểu hiện của polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu ở một hoặc nhiều tế bào của CNS. Theo một số phương án, một hoặc nhiều tế bào của CNS có chứa một hoặc nhiều tế bào của não. Theo một số phương án, một hoặc nhiều tế bào của CNS là tế bào thần kinh đệm ít gai, tế bào hình sao, nơron, tế bào nhu mô não, tế bào thần kinh đệm, tế bào ống nội tủy, và/hoặc tế bào Purkinje. Theo một số phương án, tế bào của não là nơron.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, vectơ rAAV là vectơ rAAV tự bổ sung. Theo một số phương án, vectơ có chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa cho axit nucleic khác loại và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa cho trình tự bổ sung của axit nucleic, trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trong cùng một sợi với trình tự axit nucleic thứ hai dọc theo gần hết hoặc toàn bộ chiều dài của nó. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic

thứ nhất và trình tự axit nucleic thứ hai được liên kết bằng ITR AAV đột biến, trong đó ITR AAV đột biến có chứa đột biến làm khuyết của vùng D và có chứa đột biến của trình tự phân giải cuối.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, cá thể là người.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu được sử dụng để điều trị rối loạn của CNS. Theo một số phương án, rối loạn của CNS là bệnh dự trữ lysosom (LSD), bệnh Huntington, chứng động kinh, bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, đột quỵ, thoái hóa hạch nền-vỏ não (CBD), thoái hóa hạch-vỏ nền (CBGD), sa sút trí tuệ trán-thái dương (FTD), bệnh teo đa hệ thống (MSA), chứng liệt trên nhân tiến triển (PSP) hoặc bệnh ung thư não. Theo một số phương án, rối loạn là bệnh dự trữ lysosom được chọn từ nhóm gồm có bệnh Aspartylglusoaminuria, bệnh Fabry, Bệnh Batten ở Trẻ em (CNL1), Bệnh Batten ở Trẻ em Muộn Cổ điển (CNL2), Bệnh Batten ở Thiếu niên (CNL3), bệnh dạng Batten CNL4, bệnh dạng Batten CNL5, bệnh dạng Batten CNL6, bệnh dạng Batten CNL7, bệnh dạng Batten CNL8, bệnh loạn dưỡng xystin, bệnh Farber, bệnh Fucosidosis, bệnh Galactosidosialidosis, bệnh Gaucher typ 1, bệnh Gaucher typ 2, bệnh Gaucher typ 3, bệnh GM1 gangliosidosis, bệnh Hunter, bệnh Krabbe, bệnh α mannosidosis, bệnh β mannosidosis, bệnh Maroteaux-Lamy, bệnh loạn dưỡng chất trắng não biến sắc, bệnh Morquio A, bệnh Morquio B, bệnh mucolipidosis II/III, bệnh Niemann-Pick A, bệnh Niemann-Pick B, bệnh Niemann-Pick C, bệnh Pompe, bệnh Sandhoff, bệnh Sanfillipo A, bệnh Sanfillipo B, bệnh Sanfillipo C, bệnh Sanfillipo D, bệnh Schindler, bệnh Schindler-Kanzaki, bệnh sialidosis, bệnh Sly, bệnh Tay-Sachs, và bệnh Wolman. Theo một số phương án, rối loạn của CNS là bệnh Huntington hoặc bệnh Parkinson.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh Huntington ở cá thể bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu hợp phần có chứa hạt

virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) cho thể vân của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu. Theo một số phương án, polypeptit trị liệu là polypeptit huntingtin hoặc mảnh của chúng. Theo một số phương án, polypeptit huntingtin hoặc mảnh của chúng là polypeptit huntingtin chức năng hoặc mảnh chức năng của chúng. Theo một số phương án, axit nucleic trị liệu có chứa ARNi được định hướng vào huntingtin. Theo một số phương án, ARNi là miARN.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh Parkinson ở cá thể bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu hợp phần có chứa hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) cho thể vân của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu. Theo một số phương án, polypeptit trị liệu là TH, GTPCII, GDNF, BDNF, và/hoặc AADC; hoặc mảnh của chúng. Theo một số phương án, polypeptit trị liệu là AADC hoặc mảnh của chúng.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, axit nucleic khác loại được biểu hiện ở mức độ biểu hiện tăng lên, khi so với mức độ biểu hiện của axit nucleic khác loại của hạt rAAV có chứa capsit rAAV tham chiếu. Theo một số phương án, hạt rAAV làm giảm viêm thần kinh, khi so với hạt rAAV có chứa capsit rAAV tham chiếu. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ

huyết thanh 2 (AAV2). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan, khi so với sự liên kết của hạt rAAV có chứa capsit rAAV tham chiếu vào heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%, khi so với sự liên kết của hạt rAAV có chứa capsit tham chiếu vào heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, capsit rAAV tham chiếu có chứa capsit hoặc protein capsit rAAV kiểu dại. Theo một số phương án, capsit rAAV tham chiếu có chứa capsit hoặc protein capsit rAAV mà thiếu một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, hạt rAAV được chuyển bằng cách chuyển hướng đích. Theo một số phương án, hạt rAAV được chuyển bằng cách chuyển tăng cường đối lưu. Theo một số phương án, hạt rAAV được sử dụng bằng cách sử dụng hệ thống chuyển CED. Theo một số phương án, ống thông dò là ống thông dò chống hồi lưu hoặc ống thông dò từng bậc. Theo một số phương án, hệ thống chuyển CED có chứa ống thông dò và/hoặc bơm. Theo một số phương án, hạt rAAV được sử dụng bằng cách sử dụng hệ thống chuyển CED. Theo một số phương án, bơm là bơm vận hành bằng tay. Theo một số phương án, bơm là bơm thẩm thấu. Theo một số phương án, bơm là bơm truyền.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, heparan sulfat proteoglycan được biểu hiện trên một hoặc nhiều tế bào của CNS. Theo một số phương án, một hoặc nhiều tế bào của CNS là tế bào thần kinh đệm ít gai, tế bào hình

sao, nơron, tế bào nhu mô não, tế bào thần kinh đệm, tế bào ống nội tủy, và/hoặc tế bào Purkinje. Theo một số phương án, heparan sulfat proteoglycan được biểu hiện trên nơron.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, axit nucleic khác loại được biểu hiện ở một hoặc nhiều tế bào của CNS. Theo một số phương án, một hoặc nhiều tế bào của CNS là tế bào thần kinh đệm ít gai, tế bào hình sao, nơron, tế bào nhu mô não, tế bào thần kinh đệm, tế bào ống nội tủy, và/hoặc tế bào Purkinje. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được biểu hiện ở nơron. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được biểu hiện chuyên biệt ở nơron.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAV2 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R347, R350, K390, K395, R448, R451, R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với các SEQ ID NO:2, 4 và/hoặc 6. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế

R347A, R350A, K390A, K395A, R448A, R451A, R484A, R487A, K527A, K532A, R585A và/hoặc R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484 và R487 hoặc ở các vị trí R585 và R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế R484A và R487A hoặc sự thế R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế axit amin R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế axit amin K532A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 485, 488, 528, 533, 586 hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt AAV theo sáng chế có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin ở vị trí 485, 488, 528, hoặc 533, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin không tích điện dương bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin kỵ nước được thế bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc alanin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc alanin đối với gốc arginin hoặc lysin. Theo một số phương án, sự thế axit amin là ở vị trí 485, 488, 528, 533, hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong

SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R485, R488, R533, hoặc T589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV nêu trong SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tươngđồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, sự thế một axit amin có chứa sự thế R533A, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV1, capsit AAV2, capsit AAV3, capsit AAV6, capsit AAV8, capsit AAVrh8R, capsit AAV9, hoặc capsit AAVrh10.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, axit nucleic khác loại chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mà được biểu hiện ở một hoặc nhiều tế bào của CNS. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu được chọn từ nhóm gồm có vùng khởi đầu rất sớm virut cự bào (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, vùng khởi đầu phosphoglyxerat kinaza- 1 (PGK), vùng khởi đầu virut khỉ 40 (SV40), vùng khởi đầu CK6, vùng khởi đầu transthyretin (TTR), vùng khởi đầu TK, vùng khởi đầu đáp ứng tetraxyclin (TRE), vùng khởi đầu HBV, vùng khởi đầu hAAT, vùng khởi đầu LSP, vùng khởi đầu đặc hiệu gan khảm (LSP), vùng khởi đầu E2F, vùng khởi đầu telomeraza (hTERT); vùng khởi đầu vùng tăng cường virut cự bào/beta-actin ở gà/β-globin ở thỏ (CAG), vùng khởi đầu yếu tố kéo dài 1-alpha (EFl-alpha), vùng khởi đầu β-glucuroniđaza ở người, vùng khởi đầu β-actin ở gà (CBA), vùng khởi đầu LTR virut gây ung thư mô liên kết Rous phiên mã ngược (RSV), vùng khởi đầu đihyđrofolat ređuctaza, và vùng khởi đầu 13-actin. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được liên kết có điều khiển với vùng khởi đầu thích hợp để biểu hiện của polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu ở một hoặc nhiều tế bào của CNS. Theo một số phương án, một hoặc nhiều tế bào của CNS có chứa một hoặc nhiều tế bào của não. Theo một số phương án, một hoặc nhiều tế bào của CNS là tế bào thần kinh đệm ít

gai, tế bào hình sao, nơron, tế bào nhu mô não, tế bào thần kinh đệm, tế bào ống nội tủy, và/hoặc tế bào Purkinje. Theo một số phương án, tế bào của não là nơron.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, vectơ rAAV là vectơ rAAV tự bổ sung. Theo một số phương án, vectơ có chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa cho axit nucleic khác loại và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa cho trình tự bổ sung của axit nucleic, trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trong cùng một sợi với trình tự axit nucleic thứ hai dọc theo gần hết hoặc toàn bộ chiều dài của nó. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic thứ nhất và trình tự axit nucleic thứ hai được liên kết bằng ITR AAV đột biến, trong đó ITR AAV đột biến có chứa đột biến làm khuyết của vùng D và có chứa đột biến của trình tự phân giải cuối.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, cá thể là người.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất bộ kit để sử dụng trong phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, có chứa hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV), trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất bộ kit để chuyển axit nucleic khác loại vào hệ thần kinh trung ương (CNS) của cá thể có chứa hợp phần có chứa hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV), trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất bộ kit để điều trị rối loạn hệ thần kinh trung ương (CNS) ở cá thể có chứa hợp phần có chứa hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV), trong đó hạt

rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại để điều trị rối loạn CNS và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, rối loạn CNS là bệnh Huntington. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu. Theo một số phương án, polypeptit trị liệu là polypeptit huntingtin hoặc mảnh của chúng. Theo một số phương án, polypeptit huntingtin hoặc mảnh của chúng là polypeptit huntingtin chức năng hoặc mảnh chức năng của chúng. Theo một số phương án, axit nucleic trị liệu có chứa ARNi được định hướng vào huntingtin. Theo một số phương án, ARNi là miARN. Theo một số phương án, rối loạn CNS là bệnh Parkinson. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu. Theo một số phương án, polypeptit trị liệu là TH, GTPCII, GDNF, BDNF, và/hoặc AADC; hoặc mảnh của chúng. Theo một số phương án, polypeptit trị liệu là AADC hoặc mảnh của chúng.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) để sử dụng trong phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) để chuyển axit nucleic khác loại vào hệ thần kinh trung ương (CNS) của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) để điều trị rối loạn của hệ thần kinh trung ương (CNS) của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc

nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) để điều trị bệnh Huntington ở cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV, trong đó hạt rAAV được tạo chế phẩm để chuyển vào thể vân. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) để điều trị bệnh Parkinson ở cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV, trong đó hạt rAAV được tạo chế phẩm để chuyển vào thể vân. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) để điều trị bệnh Huntington ở cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV, trong đó hạt rAAV được tạo chế phẩm để chuyển vị trí đơn lẻ (*ví dụ,* vào CNS của cá thể). Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) để điều trị bệnh Parkinson ở cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1

của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV, trong đó hạt rAAV được tạo chế phẩm để chuyển vị trí đơn lẻ (*ví dụ,* vào CNS của cá thể).

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, axit nucleic khác loại được biểu hiện ở mức độ biểu hiện tăng lên, khi so với mức độ biểu hiện của axit nucleic khác loại của hạt rAAV có chứa capsit rAAV tham chiếu. Theo một số phương án, hạt rAAV làm giảm viêm thần kinh, khi so với hạt rAAV có chứa capsit rAAV có chứa capsit tham chiếu. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh 2 (AAV2). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan, khi so với sự liên kết của hạt rAAV có chứa capsit rAAV tham chiếu vào heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%, khi so với sự liên kết của hạt rAAV có chứa capsit tham chiếu vào heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, capsit rAAV tham chiếu có chứa capsit hoặc protein capsit rAAV kiểu dại. Theo một số phương án, capsit rAAV tham chiếu có chứa capsit hoặc protein capsit rAAV mà thiếu một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, heparan sulfat proteoglycan được biểu hiện trên một hoặc nhiều tế bào của CNS. Theo một số phương án, một hoặc nhiều tế bào của CNS là tế bào thần kinh đệm ít gai, tế bào hình sao, nơron, tế bào nhu mô não, tế bào thần kinh đệm, tế bào ống nội tủy, và/hoặc tế

bào Purkinje. Theo một số phương án, heparan sulfat proteoglycan được biểu hiện trên nơron.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, axit nucleic khác loại được biểu hiện ở một hoặc nhiều tế bào của CNS. Theo một số phương án, một hoặc nhiều tế bào của CNS là tế bào thần kinh đệm ít gai, tế bào hình sao, nơron, tế bào nhu mô não, tế bào thần kinh đệm, tế bào ống nội tủy, và/hoặc tế bào Purkinje. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được biểu hiện ở nơron. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được biểu hiện chuyên biệt ở nơron.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R347, R350, K390, K395, R448, R451, R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với các SEQ ID NO:2, 4 và/hoặc 6. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế R347A, R350A, K390A, K395A, R448A, R451A, R484A, R487A, K527A, K532A, R585A và/hoặc R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều

sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484 và R487 hoặc ở các vị trí R585 và R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế R484A và R487A hoặc sự thế R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế axit amin R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế axit amin K532A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV1, capsit AAV2, capsit AAV3, capsit AAV6, capsit AAV8, capsit AAVrh8R, capsit AAV9, hoặc capsit AAVrh10.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 485, 488, 528, 533, 586 hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin không tích điện dương bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin kỵ nước được thế bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc alanin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo một số phương án, sự thế axit amin là ở vị trí 485, 488, 528, 533, hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R485, R488, R533, hoặc T589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV nêu trong SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, hạt

rAAV có chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tươngđồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, sự thế một axit amin có chứa sự thế R533A, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, axit nucleic khác loại chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mà được biểu hiện ở một hoặc nhiều tế bào của CNS. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu được chọn từ nhóm gồm có vùng khởi đầu rất sớm virut cự bào (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, vùng khởi đầu phosphoglyxerat kinaza- 1 (PGK), vùng khởi đầu virut khỉ 40 (SV40), vùng khởi đầu CK6, vùng khởi đầu transthyretin (TTR), vùng khởi đầu TK, vùng khởi đầu đáp ứng tetraxyclin (TRE), vùng khởi đầu HBV, vùng khởi đầu hAAT, vùng khởi đầu LSP, vùng khởi đầu đặc hiệu gan khảm (LSP), vùng khởi đầu E2F, vùng khởi đầu telomeraza (hTERT); vùng khởi đầu vùng tăng cường virut cự bào/beta-actin ở gà/β-globin ở thỏ (CAG), vùng khởi đầu yếu tố kéo dài 1-alpha (EFl-alpha), vùng khởi đầu β-glucuroniđaza ở người, vùng khởi đầu β-actin ở gà (CBA), vùng khởi đầu LTR virut gây ung thư mô liên kết Rous phiên mã ngược (RSV), vùng khởi đầu đihyđrofolat ređuctaza, và vùng khởi đầu 13-actin. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được liên kết có điều khiển với vùng khởi đầu thích hợp để biểu hiện của polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu ở một hoặc nhiều tế bào của CNS. Theo một số phương án, một hoặc nhiều tế bào của CNS có chứa một hoặc nhiều tế bào của não. Theo một số phương án, một hoặc nhiều tế bào của CNS là tế bào thần kinh đệm ít gai, tế bào hình sao, nơron, tế bào nhu mô não, tế bào thần kinh đệm, tế bào ống nội tủy, và/hoặc tế bào Purkinje.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, vectơ rAAV là vectơ rAAV tự bổ sung. Theo một số phương án, vectơ có chứa trình tự axit

nucleic thứ nhất mã hóa cho axit nucleic khác loại và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa cho trình tự bổ sung của axit nucleic, trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trong cùng một sợi với trình tự axit nucleic thứ hai dọc theo gần hết hoặc toàn bộ chiều dài của nó. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic thứ nhất và trình tự axit nucleic thứ hai được liên kết bằng ITR AAV đột biến, trong đó ITR AAV đột biến có chứa đột biến làm khuyết của vùng D và có chứa đột biến của trình tự phân giải cuối.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, cá thể là người.

Theo một số phương án của các khía cạnh và các phương án nêu trên, hạt rAAV ở trong hợp phần. Theo một số phương án, hợp phần có chứa chất đệm và/hoặc tá dược dược dụng. Theo một số phương án, bộ kit hoặc hạt rAAV còn chứa hướng dẫn để chuyển hợp phần của hạt rAAV vào CNS. Theo một số phương án, bộ kit hoặc hạt rAAV còn chứa hướng dẫn để chuyển hợp phần của hạt rAAV vào thể vân.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt rAAV có chứa protein capsit AAVrh8R, trong đó protein capsit AAVrh8R có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin này làm tăng sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan so với hạt AAV có chứa protein capsit AAVrh8R kiểu dại, hoặc trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm tăng sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%. Theo một số phương án, sự thế axit amin là ở vị trí 586, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí A586, đánh

số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự thế axit amin có chứa sự thế A586R hoặc A586K, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV nêu trong SEQ ID NO:10.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng sự liên kết của hạt rAAV có chứa protein capsit AAVrh8R với heparan sulfat proteoglycan, bao gồm bước đưa một hoặc nhiều sự thế axit amin vào protein capsit, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin này làm tăng sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan so với hạt AAV có chứa protein capsit AAVrh8R kiểu dại. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm tăng sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%. Theo một số phương án, sự thế axit amin là ở vị trí 586, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí A586, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự thế axit amin có chứa sự thế A586R hoặc A586K, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV nêu trong SEQ ID NO:10.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để chuyển axit nucleic khác loại vào võng mạc của cá thể bao gồm bước sử dụng trong thủy tinh thể hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) vào cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sự chuyển nạp rAAV của tế bào sau khi chuyển trong

thủy tinh thể hạt rAAV vào mắt của cá thể so với sự chuyển nạp của tế bào bằng rAAV có chứa capsit kiểu dại, phương pháp này bao gồm bước kết hợp một hoặc nhiều sự thế axit amin ở protein capsit AAV ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2; trong đó hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV và vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sự biểu hiện của axit nucleic khác loại sau khi chuyển trong thủy tinh thể hạt rAAV vào mắt của cá thể, phương pháp này bao gồm bước kết hợp một hoặc nhiều sự thế axit amin ở protein capsit AAV ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2; trong đó hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV và vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị rối loạn ở mắt ở cá thể bao gồm bước chuyển trong thủy tinh thể hợp phần có chứa hạt rAAV vào võng mạc của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hệ thống để chuyển trong thủy tinh thểvectơ vào mắt của cá thể, có chứa a) hợp phần có chứa lượng hữu hiệu của hạt rAAV, trong đó i) protein capsit của hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, và ii) vectơ có chứa axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc ARN trị liệu và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV; và b) dụng cụ để chuyển trong thủy tinh thể rAAV. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanhrh8R, AAV1, AAV6, AAV8, AAV9,

hoặc AAVrh10. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất bộ kit để điều trị rối loạn ở mắt có chứa a) hợp phần có chứa hạt rAAV, trong đó hạt rAAV có chứa i) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, và ii) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại để điều trị rối loạn ở mắt và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV; và b) tá dược thích hợp để dùng trong thủy tinh thể. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAVrh8R, AAV1, AAV6, AAV8, AAV9, hoặc AAVrh10. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt rAAV có chứa protein capsit AAV1, trong đó protein capsit AAV1 có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin này làm tăng hiệu quả chuyển nạp của hạt rAAV vào tế bào trong mắt so với hạt AAV có chứa protein capsit AAV1 kiểu dại, hoặc trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt rAAV có chứa protein capsit AAV6, trong đó protein capsit AAV6 có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin này làm tăng hiệu quả chuyển nạp của hạt rAAV vào tế bào trong mắt so với hạt AAV có chứa kiểu dại protein capsit AAV6, hoặc trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt rAAV có chứa protein capsit AAV8, trong đó protein capsit AAV8 có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin này làm tăng hiệu quả chuyển nạp của hạt rAAV vào tế bào trong mắt so với hạt AAV có chứa protein capsit AAV8 kiểu dại, hoặc trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt rAAV có chứa protein capsit AAV9, trong đó protein capsit AAV9 có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin này

làm tăng hiệu quả chuyển nạp của hạt rAAV vào tế bào trong mắt so với hạt AAV có chứa protein capsit AAV9 kiểu dại, hoặc trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt rAAV có chứa protein capsit AAVrh10, trong đó protein capsit AAVrh10 có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin này làm tăng hiệu quả chuyển nạp của hạt rAAV vào tế bào trong mắt so với hạt AAV có chứa protein capsit AAVrh10 kiểu dại, hoặc trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt rAAV có chứa protein capsit AAV3, trong đó protein capsit AAV3 có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV1, capsit AAV2, capsit AAV3, capsit AAV6, capsit AAV8, capsit AAVrh8R, capsit AAV9, hoặc capsit AAVrh10. Theo một số phương án, hiệu quả chuyển nạp được tăng lên bằng ít nhất là khoảng 10%, ít nhất là khoảng 25%, ít nhất là khoảng 50%, ít nhất là khoảng 75%, hoặc ít nhất là khoảng 100%.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm tăng sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm tăng sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm tăng hiệu quả chuyển nạp của hạt rAAV đối với tế bào trong mắt hoặc hệ thần kinh trung ương, khi so với hạt AAV có chứa protein capsit AAVrh8R kiểu dại, bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%. Theo một số phương án, tế bào của mắt là tế bào võng mạc, tế bào tiếp nhận kích thích ánh sáng, tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, tế bào lưỡng cực, tế bào ngang, tế bào không

có sợi nhánh, tế bào muller và/hoặc tế bào hạch. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin không tích điện dương bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương thay thế gốc axit amin kỵ nước. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế bằng gốc arginin hoặc lysin. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc alanin, serin, glutamin, hoặc threonin bằng gốc arginin hoặc lysin. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh rh8R (AAVrh8R). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 586 và/hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí A586 và/hoặc T589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế A586R hoặc A586K, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế T589R hoặc T589K, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh 1 (AAV1). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 586 và/hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV1. Theo một số phương án, VP1 của AAV1 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:12. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí S586 và/hoặc T589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV1. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế S586R hoặc S586K, đánh số dựa trên VP1 của AAV1. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế T589R hoặc T589K, đánh số dựa trên VP1 của AAV1. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh 6 (AAV6). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 586 và/hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV6. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAV6 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:13.Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự

thế ở vị trí S586 và/hoặc T589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV6. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế S586R, đánh số dựa trên VP1 của AAV6. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế T589R hoặc T589K, đánh số dựa trên VP1 của AAV6. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh 8 (AAV8). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 588 và/hoặc 591, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV8. Theo một số phương án, VP1 của AAV8 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí Q588 và/hoặc T591, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV8. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế Q588R hoặc Q588K, đánh số dựa trên VP1 của AAV8. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế T591R, đánh số dựa trên VP1 của AAV8. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh 9 (AAV9). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 586 và/hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV9. Theo một số phương án, VP1 của AAV9 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:15. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí S586 và/hoặc A589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế S586R hoặc S586K, đánh số dựa trên VP1 của AAV9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế A589R hoặc A589K, đánh số dựa trên VP1 của AAV9. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh rh10 (AAVrh10). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 588 và/hoặc 591, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh10. Theo một số phương án, VP1 của AAVrh10 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí Q588 và/hoặc A591, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh10. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế Q588R hoặc Q588K, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh10. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế A591R hoặc A591K,

đánh số dựa trên VP1 của AAVrh10. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt rAAV có chứa protein capsit AAV3, trong đó protein capsit AAV3 có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm tăng hiệu quả chuyển nạp của hạt rAAV đối với tế bào trong mắt hoặc hệ thần kinh trung ương, khi so với hạt AAV có chứa protein capsit AAVrh8R kiểu dại, bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV1, capsit AAV2, capsit AAV3, capsit AAV6, capsit AAV8, capsit AAVrh8R, capsit AAV9, hoặc capsit AAVrh10. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được chọn từ nhóm gồm có chất chống oxy hóa, yếu tố dinh dưỡng thần kinh, yếu tố chống chết tế bào theo chương trình, yếu tố chống tạo mạch, và yếu tố chống viêm. Theo các phương án khác, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được chọn từ nhóm gồm có: Prph2, RPE65, AIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, Clarin,, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NFκB, Enđostatin, Angiostatin, sFlt, sPDGF-R, IL10, kháng-IL17, sIL17R, IL1-ra, kháng-TGFβ, sTNF-R I, sTNF-R II, và IL4. Theo các phương án khác, axit nucleic khác loại mã hóa cho axit nucleic trị liệu. Theo các phương án khác, axit nucleic trị liệu là siARN, shARN ARNi, miARN, ARN đối nghĩa, ribozym hoặc ADNzym. Theo một số phương án, vectơ rAAV là vectơ rAAV tự bổ sung. Theo một số phương án, hạt AAV theo sáng chế có chứa capsit có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi sự liên kết với HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ việc liên kết với HSPG) hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2 và axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu, trong đó axit nucleic khác loại chịu sự kiểm soát của trình tự

vùng khởi đầu mà được biểu hiện ở võng mạc. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được liên kết có điều khiển với vùng khởi đầu thích hợp cho sự biểu hiện của polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu ở một hoặc nhiều loại tế bào võng mạc. Theo một số phương án, tế bào võng mạc là tế bào tiếp nhận kích thích ánh sáng, tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, tế bào lưỡng cực, tế bào ngang, tế bào không có sợi nhánh, tế bào muller và/hoặc tế bào hạch. Theo một số phương án, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu rhođopsin kinaza (RK), vùng khởi đầu opsin, vùng khởi đầu virut cự bào (CMV), vùng khởi đầu β-actin ở gà (CBA). Theo một số phương án, cá thể là người. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được sử dụng để điều trị rối loạn ở mắt được chọn từ nhóm gồm có: bệnh thoái hóa võng mạc khởi phát sớm nặng do gen lặn trên nhiễm sắc thể thường (bệnh mù lòa bẩm sinh Leber), chứng mù màu bẩm sinh, bệnh Stargardt, bệnh Best, bệnh Doyne, chứng loạn dưỡng nón, viêm võng mạc sắc tố, võng mạc tách bẩm sinh di truyền liên kết trên nhiễm sắc thể X, hội chứng Usher, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác teo, AMD tạo mạch mới, thoái hóa điểm vàng do tiểu đường, bệnh võng mạc tiểu đường tăng sinh (PDR), phù thũng điểm vàng trong mắt, bệnh hắc võng mạc trung tâm thanh dịch, sự bong võng mạc, viêm bên trong mắt, bệnh glôcôm, và viêm màng mạch nho phía sau. Theo một số phương án, vectơ rAAV là vectơ rAAV tự bổ sung. Theo một số phương án, vectơ có chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa cho axit nucleic khác loại và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa cho trình tự bổ sung của axit nucleic, trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trong cùng một sợi với trình tự axit nucleic thứ hai dọc theo gần hết hoặc toàn bộ chiều dài của nó. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic thứ nhất và trình tự axit nucleic thứ hai được liên kết bằng ITR AAV đột biến, trong đó ITR AAV đột biến có chứa đột biến làm khuyết của vùng D và có chứa đột biến của trình tự phân giải cuối. Theo một số phương án, cá thể là người. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm tăng hiệu quả chuyển nạp của hạt rAAV đối với tế bào trong mắt hoặc hệ thần kinh trung ương, khi so với hạt AAV có chứa protein capsit AAVrh8R kiểu dại, bằng

từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%.

Tất cả các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong bản mô tả này, bao gồm các đơn sáng chế và công bố sáng chế, được kết hợp bằng cách viện dẫn đến toàn bộ tài liệu đó.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 chỉ ra các gốc capsit có liên quan đến sự liên kết heparan sulfat proteoglycan và các đột biến được đưa vào để tạo ra thể đột biến AAV2 HBKO. Sự đánh số được dựa trên trình tự axit amin VP1.

Hình 2 thể hiện sự giảm đi của sự chuyển nạp của tế bào 293 trong môi trường nuôi cấy quan sát được bằng hạt AAV2 đột biến HBKO (AAV2 HBKO CBA-sFLT02), so với hạt AAV2 kiểu dại (AAV2 CBA-sFLT02). Sự chuyển nạp được kiểm tra bằng cách đo hàm lượng của Flt hòa tan (sFLT) có mặt trong môi trường nuôi cấy tế bào 48 giờ sau khi tiêm bằng hạt AAV2 kiểu dại hoặc đột biến HBKO mang vectơ mà sử dụng vùng khởi đầu CBA để làm biểu hiện Flt.

Hình 3 thể hiện sự giảm đi của sự chuyển nạp của tế bào 293 và tế bào Hela trong môi trường nuôi cấy quan sát được bằng hạt AAV2 đột biến HBKO (AAV2 HBKO CBA-GFP), khi so với hạt AAV2 kiểu dại (AAV2 CBA-GFP). Sự chuyển nạp được kiểm tra bằng chụp ảnh huỳnh quang của tế bào 48 giờ sau khi tiêm bằng hạt AAV2 kiểu dại hoặc đột biến HBKO mang vectơ mà sử dụng vùng khởi đầu CBA để làm biểu hiện EGFP.

Các Hình 4A & 4B thể hiện sự chuyển nạp quan sát được khi tiêm trong thủy tinh thể (**Hình 4A**) hoặc dưới võng mạc (**Hình 4B**) hạt AAV2 kiểu dại hoặc hạt AAV2 đột biến HBKO. Sự chuyển nạp được kiểm tra bằng sự biểu hiện của Flt hòa tan (sFLT) sau khi chuyển nạp bằng vectơ mã hóa cho Flt. Số lượng hệ gen vectơ được tiêm được chỉ ra đối với mỗi thí nghiệm (10^8 hoặc 10^9 vg).

Hình 5 thể hiện rằng hạt AAV2 đột biến HBKO không thể chuyển nạp vào mắt chuột sau khi tiêm trong thủy tinh thể. Chuột được tiêm trong thủy tinh thể hạt AAV2 kiểu dại (AAV2 CBA-GFP) hoặc đột biến HBKO (AAV2 HBKO CBA-GFP) mang vectơ mà sử dụng vùng khởi đầu CBA để làm biểu hiện EGFP, và các phần được chụp ảnh bằng kính hiển vi huỳnh quang.

Hình 6 thể hiện rằng hạt AAV2 đột biến HBKO (AAV2 CBA HBKO) gây ra sự tăng lên đáng kể của sự chuyển nạp sau khi tiêm dưới võng mạc, khi so với hạt kiểu dại (AAV2 CBA). Sự chuyển nạp được kiểm tra bằng sự biểu hiện của Flt hòa tan (sFLT) sau khi tiêm bằng hạt AAV2 mang vectơ mà sử dụng vùng khởi đầu CBA để làm biểu hiện Flt. Số lượng hệ gen vectơ được tiêm được chỉ ra (10^8 hoặc 10^9 vg).

Hình 7 thể hiện rằng hạt AAV2 đột biến HBKO (AAV2 HBKO CBA-GFP) gây ra sự tăng lên đáng kể của sự chuyển nạp của tế bào nhận kích thích ánh sáng (như được gắn nhãn) sau khi tiêm dưới võng mạc, khi so với hạt kiểu dại (AAV2 CBA-GFP). Sự chuyển nạp được đo bằng chụp ảnh huỳnh quang sự biểu hiện GFP sau khi chuyển nạp bằng hạt AAV2 mang vectơ mà sử dụng vùng khởi đầu CBA để làm biểu hiện EGFP.

Hình 8 thể hiện rằng hạt AAV2 đột biến HBKO (AAV2 RK HBKO) gây ra sự tăng lên đáng kể của sự chuyển nạp của tế bào tiếp nhận kích thích ánh sáng sau khi tiêm dưới võng mạc, khi so với hạt kiểu dại (AAV2 RK). Sự chuyển nạp được kiểm tra bằng sự biểu hiện của Flt hòa tan (sFLT) sau khi tiêm bằng hạt AAV2 mang vectơ mà sử dụng vùng khởi đầu rhođopsin kinaza (RK) để làm biểu hiện Flt. Số lượng hệ gen vectơ được tiêm được chỉ ra (10^8 hoặc 10^9 vg).

Các Hình 9A&9B thể hiện sự biểu hiện của EGFPe trong não chuột 30 ngày sau khi tiêm trong thể vân của AAV2 HBKO-EGFP (**Hình 9A**), so với AAV2-EGFP (**Hình 9B**) ở chuột kiểu dại. Trong mỗi bảng, sự biểu hiện của EGFP được làm cho diễn ra bằng vùng khởi đầu CBA và được làm cho có thể nhìn thấy được bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang.

Các Hình 10A&10B thể hiện sự biểu hiện của GFPe trong não chuột 30 ngày sau khi tiêm trong thể vân của AAV2 HBKO-miARN-Htt-GFP (**Hình 10A**), so với AAV1- miARN-Htt-GFP (**Hình 10B**) ở con chuột YAC128 HD. Vectơ miARN-Htt-GFP dùng để chỉ các cấu trúc mà biểu hiện miARN nhân tạo hướng đích vào vùng báo cáo Htt và GFP ở người. Trong mỗi bảng, sự biểu hiện của GFP được làm cho diễn ra bằng vùng khởi đầu CBA và được làm cho có thể nhìn thấy được bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang ở ba độ phóng đại khác nhau (4X, 10X, và 20X, như được gắn nhãn).

Hình 11A thể hiện phân tích qPCR của *HTT* hàm lượng mARN ở người trong các lỗ não chuột thể vân 30 ngày sau khi tiêm AAV1-miARN-Htt và AAV2 HBKO-miARN-Htt, khi so với đối chứng không được điều trị.

Hình 11B thể hiện phân tích thẩm tách Western của hàm lượng protein Htt ở người trong các lỗ não chuột vỏ não 30 ngày sau khi tiêm AAV1-miARN-Htt và AAV2 HBKO-miARN-Htt, khi so với đối chứng không được điều trị.

Các Hình 12A-12C thể hiện sự biểu hiện của Iba1 ở thể vân chuột YAC128 30 ngày sau khi tiêm bằng AAV2 HBKO-miARN-Htt-GFP (**Hình 12B**) hoặc AAV1-miARN-Htt-GFP (**Hình 12C**), so với đối chứng không được điều trị (**Hình 12A**).

Các Hình 13A-13C thể hiện sự biểu hiện của GFP ở thể vân chuột YAC128 30 ngày sau khi tiêm bằng AAV2 HBKO-miARN-Htt-GFP (**Hình 13B**) hoặc AAV1-miARN-Htt-GFP (**Hình 13C**), so với đối chứng không được điều trị (**Hình 13A**).

Hình 14 so sánh các gốc capsit có liên quan đến sự liên kết heparan sulfat proteoglycan giữa capsit AAV2 và capsit AAVrh8R. Việc đánh số được dựa trên trình tự axit amin VP1.

Hình 15 thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng axit amin của AAV2 và AAVrh8R ở các gốc chịu trách nhiệm về sự liên kết heparan của AAV2. Vị trí của sự cải biến capsit arginin AAVrh8R được khoanh tròn.

Hình 16A thể hiện sự chuyển nạp *in vitro* được cải thiện của tế bào HeLa thể hiện bởi thể đột biến AAVrh8R A586R, khi so với AAVrh8R kiểu dại. Sự chuyển nạp được kiểm tra bằng sFLT02 trong môi trường nuôi cấy 48 giờ sau khi nhiễm bằng vectơ AAVrh8R hoặc vectơ được cải biến arginin AAVrh8R.

Hình 16B thể hiện sự chuyển nạp *in vitro* giảm dần của tế bào HeLaRC32 thể hiện bởi thể đột biến AAVrh8R R533A, khi so với AAVrh8R kiểu dại. Sự chuyển nạp được kiểm tra bằng sFLT02 trong môi trường nuôi cấy 48 giờ sau khi nhiễm bằng vectơ AAVrh8R hoặc vectơ được cải biến arginin AAVrh8R.

Các Hình 17A-17D thể hiện mức độ của sự chuyển nạp *in vitro* được thể hiện bằng các thể đột biến AAVrh8R A586R và R533A, khi so với AAVrh8R kiểu dại. Thể đột biến AAVrh8R A586R (**Hình 17B**) thể hiện sự chuyển nạp *in vitro* tăng lên của tế bào NS1, khi so với AAVrh8R kiểu dại (**Hình 17A**). Thể đột biến AAVrh8R R533A (**Hình 17D**) thể hiện sự chuyển nạp *in vitro* giảm đi của tế bào HeLa, khi so với AAVrh8R kiểu dại (**Hình 17C**). Sự chuyển nạp được kiểm tra bằng sự biểu hiện EGFP ở tế bào 48 giờ sau khi nhiễm bằng vectơ AAVrh8R hoặc vectơ được cải biến arginin AAVrh8R.

Các Hình 18A & 18B thể hiện mức độ của sự chuyển nạp dưới võng mạc ở con chuột C57Bl6 được thể hiện bằng các thể đột biến AAVrh8R A586R và R533A. (**Hình 18A**) thể đột biến AAVrh8R A586R thể hiện sự chuyển nạp dưới võng mạc giảm đi, khi so với AAVrh8R kiểu dại. Vectơ AAV2 cũng được thử nghiệm. (**Hình 18B**) thể đột biến AAVrh8R R533A thể hiện sự chuyển nạp dưới võng mạc tăng lên, khi so với AAVrh8R kiểu dại và con chuột chưa quen thí nghiệm. Sự chuyển nạp được kiểm tra bằng sFLT02 trong dịch tan võng mạc của con chuột C57Bl6 30 ngày sau khi dùng vectơ AAVrh8R hoặc vectơ được cải biến arginin AAVrh8R dưới võng mạc.

Hình 19 thể hiện hàm lượng của sFLT02 trong dịch tan võng mạc của con chuột C57Bl6 30 ngày sau khi dùng vectơ AAV2, vectơ AAVrh8R hoặc vectơ AAVrh8R-A586R trong thủy tinh thể.

Hình 20 thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng axit amin ở các gốc chịu trách nhiệm về sự liên kết heparan của AAV2 với AAVrh8R, AAV1, AAV6, AAV8, AAV9, và AAVrh10.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được mô tả trong bản mô tả này, các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng sự cải biến ở hạt rAAV tương ứng với các axit amin 484, 487, 532, 585, và/hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, chứng tỏ sự chuyển nạp tăng lên của tế bào sau khi dùng cho mắt hoặc CNS của đối tượng. Không bị ràng buột bởi lý thuyết bất kỳ, người ta tin rằng các hạt rAAV này đã làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với HSPG hoặc làm cải biến điện tích trên capsit do đó việc dùng hạt rAAV dẫn đến sự chuyển nạp tăng lên của tế bào trong mắt hoặc CNS của đối tượng. Do đó sáng chế đề xuất phương pháp chuyển axit nucleic khác loại vào mắt hoặc CNS của cá thể bao gồm bước sử dụng hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) vào mắt hoặc CNS của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV. Theo một số phương án, sự thế axit amin dẫn đến sự liên kết với HSPG giảm đi hoặc bị loại bỏ.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp chuyển axit nucleic khác loại vào mắt của cá thể bao gồm bước sử dụng hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) vào dưới võng mạc của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sự chuyển nạp rAAV của tế bào sau khi chuyển dưới võng mạc hạt rAAV vào mắt của cá thể so với sự chuyển nạp của tế bào bằng rAAV có chứa capsit kiểu dại, phương pháp này bao gồm bước kết hợp một hoặc nhiều sự thế axit amin ở protein capsit AAV ở một hoặc

nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan; trong đó hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV và vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV. Theo một số phương án, sự thế axit amin dẫn đến sự liên kết với HSPG giảm đi hoặc bị loại bỏ. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit có chứa sự thế R585A và R588A của rAAV2, đánh số dựa trên VP1 của AAV2 (SEQ ID NO:1). Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit có chứa sự thế A586R và/hoặc R533A của AAVrh8R, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R (SEQ ID NO:9).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sự biểu hiện của axit nucleic khác loại sau khi chuyển dưới võng mạc hạt rAAV vào mắt của cá thể, phương pháp này bao gồm bước kết hợp một hoặc nhiều sự thế axit amin ở protein capsit AAV ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan; trong đó hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV và vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV. Theo một số phương án, sự thế axit amin dẫn đến sự liên kết với HSPG giảm đi hoặc bị loại bỏ. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit có chứa sự thế R585A và R588A của rAAV2, đánh số dựa trên VP1 của AAV2 (SEQ ID NO:1). Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit có chứa sự thế A586R và/hoặc R533A của AAVrh8R, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R (SEQ ID NO:9).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện sự biểu hiện của axit nucleic khác loại sau khi chuyển dưới võng mạc hạt rAAV vào mắt của cá thể, phương pháp này bao gồm bước kết hợp một hoặc nhiều sự thế axit amin ở protein capsit AAV ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan; trong đó hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV và vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV. Sự cải thiện của sự chuyển nạp là khi so với hạt rAAV có chứa capsit kiểu dại. Theo một số phương án, sự thế axit amin dẫn đến sự liên kết với HSPG giảm đi hoặc bị loại bỏ. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit có chứa sự thế R585A và R588A của capsit rAAV2, đánh số dựa trên VP1 của AAV2 (SEQ ID NO:1). Theo một số phương án,

hạt rAAV có chứa capsit có chứa sự thế A586R và/hoặc R533A của AAVrh8R, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R (SEQ ID NO:9).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị rối loạn ở mắt ở cá thể bao gồm bước chuyển hợp phần có chứa lượng hữu hiệu của hạt rAAV vào võng mạc của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV. Theo một số phương án, sự thế axit amin dẫn đến sự liên kết với HSPG giảm đi hoặc bị loại bỏ. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit có chứa sự thế R585A và R588A của rAAV2, đánh số dựa trên VP1 của AAV2 (SEQ ID NO:1). Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit có chứa sự thế A586R và/hoặc R533A của AAVrh8R, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R (SEQ ID NO:9).

Sáng chế còn đề xuất hệ thống để chuyển dưới võng mạc vectơ vào mắt của cá thể, có chứa a) hợp phần có chứa lượng hữu hiệu của hạt rAAV, trong đó i) protein capsit của hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và ii) vectơ có chứa axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc ARN trị liệu và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV; và b) dụng cụ để chuyển rAAV qua võng mạc. Theo một số phương án, sự thế axit amin dẫn đến sự liên kết với HSPG giảm đi hoặc bị loại bỏ. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit có chứa sự thế R585A và R588A của rAAV2, đánh số dựa trên VP1 của AAV2 (SEQ ID NO:1). Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit có chứa sự thế A586R và/hoặc R533A của AAVrh8R, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R (SEQ ID NO:9).

Theo một số khía cạnh, sáng chế còn đề xuất phương pháp chuyển axit nucleic khác loại vào hệ thần kinh trung ương (CNS) của cá thể bao gồm bước sử dụng hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) cho CNS của cá thể. Hạt rAAV có chứa (a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở

một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và (b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV. Các phương pháp này thể hiện sự biểu hiện axit nucleic khác loại và/hoặc sự chuyển nạp rAAV của tế bào được cải thiện sau khi chuyển hạt rAAV vào CNS của cá thể, *ví dụ,* khi so với sự chuyển nạp của tế bào bằng rAAV có chứa capsit kiểu dại. Ngoài ra, các phương pháp theo sáng chế có khả năng gây nhiễm các tế bào cụ thể (*ví dụ,* nơron) trong khi vẫn đạt được hiệu quả chuyển nạp lan rộng và mạnh mẽ. Các hạt rAAV và các phương pháp này thích hợp để sử dụng trong việc điều trị rối loạn CNS, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh Huntington. Theo một số phương án, sự thế axit amin dẫn đến sự liên kết với HSPG giảm đi hoặc bị loại bỏ. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit có chứa sự thế R585A và R588A của rAAV2, đánh số dựa trên VP1 của AAV2 (SEQ ID NO:1). Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit có chứa sự thế A586R và/hoặc R533A của AAVrh8R, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R (SEQ ID NO:9).

Sáng chế còn đề xuất bộ kit chứa hạt rAAV hoặc hợp phần chứa hạt rAAV có (a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và (b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV. Các bộ kit này hữu dụng để chuyển axit nucleic khác loại vào mắt hoặc CNS của cá thể, cũng như là để điều trị rối loạn mắt hoặc CNS ở cá thể (*ví dụ,* điều trị bệnh võng mạc hoặc bệnh Huntington).

I. Các Kỹ Thuật Chung

Các kỹ thuật và quy trình được mô tả hoặc được viện dẫn trong bản mô tả này nhìn chung đã được hiểu rõ và được áp dụng phổ biến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng hệ phương pháp thông thường, như, ví dụ, các phương pháp được sử dụng rộng rãi được mô tả trong tài liệu *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in*

Molecular Biology (F.M. Ausubel, *et al.* eds., 2003); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., 1995); *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow and Lane, eds., 1988); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley and Sons, 2010); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1996); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., J. Wiley and Sons, 2002); *Immunobiology* (C.A. Janeway *et al.*, 2004); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); và *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 2011).

II. Định nghĩa

"Vectơ," như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ plasmit hoặc virut tái tổ hợp có chứa axit nucleic cần được chuyển vào tế bào chủ, in vitro hoặc in vivo.

Thuật ngữ "polynucleotit" hoặc "axit nucleic" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ dạng polyme của nucleotit có chiều dài bất kỳ, hoặc là ribonucleotit hoặc là đeoxyribonucleotit. Do đó, thuật ngữ này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ADN

hoặc ARN sợi đơn, sợi kép hoặc đa sợi, ADN hệ gen, cADN, thể lai ADN-ARN, hoặc polyme có chứa bazơ purin và pyrimiđin, hoặc các bazơ nucleotit tự nhiên, được cải biến về mặt hóa học hoặc hóa sinh, không tự nhiên, hoặc được tạo dẫn xuất khác. Khung polynucleotit có thể có chứa nhóm đường và phosphat (như có thể thường được tìm thấy trong ARN hoặc ADN), hoặc nhóm đường và phosphat được cải biến hoặc được thế. Theo cách khác, khung polynucleotit có thể có chứa polyme có các dưới đơn vị tổng hợp như phosphoramiđat và do đó có thể là oligođeoxynucleosit phosphoramiđat (P-NH_2) hoặc oligome phosphoramiđat-phosphođieste hỗn hợp. Ngoài ra, polynucleotit sợi kép có thể thu được từ sản phẩm polynucleotit sợi đơn của quá trình tổng hợp hóa học bằng cách tổng hợp sợi bổ sung và ủ các sợi này trong điều kiện thích hợp, hoặc bằng cách tổng hợp sợi bổ sung de novo bằng cách sử dụng ADN polymeraza với đoạn mồi thích hợp.

Thuật ngữ "polypeptit" và "protein" được sử dụng thay thế lẫn nhau để chỉ polyme của các gốc axit amin, và không bị giới hạn ở chiều dài tối thiểu. Các polyme của các gốc axit amin như vậy có thể chứa các gốc axit amin tự nhiên hoặc không tự nhiên, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, peptit, oligopeptit, đime, trime, và multime của các gốc axit amin. Cả protein chiều dài đầy đủ và mảnh của nó đều được bao gồm bởi định nghĩa này. Thuật ngữ này cũng bao gồm các cải biến sau khi biểu hiện của polypeptit, ví dụ, sự glycosyl hóa, sialyl hóa, axetyl hóa, phosphoryl hóa, và các cải biến tương tự. Ngoài ra, đối với các mục đích của sáng chế, "polypeptit" chỉ protein bao gồm các cải biến, như sự mất, sự thêm, và sự thế (thường là bảo toàn trong tự nhiên), đối với trình tự tự nhiên, với điều kiện là protein giữ được hoạt tính mong muốn. Các cải biến này có thể là chủ ý, như thông qua đột biến định hướng vị trí, hoặc có thể là ngẫu nhiên, như thông qua các đột biến của vật chủ sản xuất protein hoặc các lỗi do sự khuếch đại PCR.

"Vectơ virut tái tổ hợp" chỉ vectơ polynucleotit tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều trình tự khác loại (*tức là*, trình tự axit nucleic không có nguồn gốc từ virut). Trong trường hợp của vectơ AAV tái tổ hợp, axit nucleic tái tổ hợp được củng cố bên

sườn bởi ít nhất là một trình tự đoạn lặp cuối đảo ngược (ITR). Theo một số phương án, axit nucleic tái tổ hợp được củng cố bên sườn bởi hai ITR.

"Vectơ AAV tái tổ hợp (vectơ rAAV)" dùng để chỉ vectơ polynucleotit có chứa một hoặc nhiều trình tự khác loại (*tức là*, trình tự axit nucleic không có nguồn gốc từ AAV) mà được củng cố bên sườn bởi ít nhất là một trình tự đoạn lặp cuối đảo ngược AAV (ITR). Các vectơ rAAV như vậy có thể được sao chép và được đóng gói vào các hạt virut lây nhiễm khi có mặt trong tế bào chủ đã được lây nhiễm virut hỗ trợ thích hợp (hoặc tế bào chủ biểu hiện chức năng hỗ trợ thích hợp) và biểu hiện sản phẩm gen rep và cap AAV (*tức là* protein Rep và Cap AAV). Khi vectơ rAAV được kết hợp vào polynucleotit lớn hơn (*ví dụ*, trong nhiễm sắc thể hoặc trong vectơ khác như plasmit được sử dụng để tách dòng hoặc chuyển nhiễm), thì vectơ rAAV có thể được gọi là "tiền vectơ" mà có thể được "giải phóng" bởi sự sao chép và bao trong capsit trong sự có mặt của chức năng đóng gói AAV và chức năng hỗ trợ thích hợp. Vectơ rAAV có thể ở dạng bất kỳ trong số nhiều dạng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit, nhiễm sắc thể nhân tạo thẳng, được tạo phức hợp với lipit, được bao nang trong liposom, và được bọc capsit trong hạt virut, *ví dụ,* hạt AAV. Vectơ rAAV có thể được đóng gói vào capsit virut AAV để tạo ra "hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (hạt rAAV)".

"Virut rAAV" hoặc "hạt virut rAAV" dùng để chỉ hạt virut gồm có ít nhất là một protein capsit AAV và hệ gen vectơ rAAV được bọc capsit.

"Khác loài" nghĩa là thu được từ thực thể khác biệt về mặt kiểu gen so với kiểu gen của phần còn lại của thực thể mà nó được so sánh với hoặc nó được đưa vào hoặc được kết hợp vào đó. Ví dụ, polynucleotit được đưa bởi kỹ thuật thiết kế di truyền vào loại tế bào khác là polynucleotit khác loại (và, khi được biểu hiện, có thể mã hóa polypeptit khác loại). Tương tự, trình tự tế bào (*ví dụ*, gen hoặc một phần của nó) được kết hợp vào vectơ virut là trình tự nucleotit khác loại so với vectơ này.

Thuật ngữ "gen chuyển" chỉ polynucleotit được đưa vào tế bào và có khả năng được phiên mã thành ARN và tùy ý, được dịch mã và/hoặc được biểu hiện trong điều

kiện thích hợp. Theo một số khía cạnh, gen chuyển tạo ra tính chất mong muốn cho tế bào mà nó được đưa vào, hoặc theo cách khác dẫn đến kết quả trị liệu hoặc chẩn đoán mong muốn. Theo khía cạnh khác, nó có thể được phiên mã thành phân tử mà làm trung hòa sự có thể thiệp ARN, chẳng hạn như miARN, siARN, hoặc shARN.

Thuật ngữ "hạt hệ gen (gp)," "thể tương đương hệ gen," hoặc "bản sao hệ gen" như được sử dụng liên quan đến độ chuẩn virut, chỉ số lượng virion chứa hệ gen ADN AAV tái tổ hợp, bất kể tính lây nhiễm hoặc chức năng. Số lượng hạt hệ gen trong chuẩn bị vectơ cụ thể có thể được xác định bằng các quy trình như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế trong bản mô tả này, hoặc ví dụ, trong tài liệu Clark *et al.* (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk *et al.* (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278.

Thuật ngữ "hệ gen vectơ (vg)" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể dùng để chỉ một hoặc nhiều polynucleotit có chứa tập hợp của các trình tự polynucleotit của vectơ, *ví dụ,* vectơ virut. Hệ gen vectơ có thể được bọc capsit trong hạt virut. Tùy thuộc vào vectơ virut cụ thể, hệ gen vectơ có thể có chứa ADN sợi đơn, ADN sợi kép, hoặc ARN sợi đơn, hoặc ARN sợi kép. Hệ gen vectơ có thể bao gồm các trình tự nội sinh kết hợp với vectơ virut cụ thể và/hoặc trình tự khác loại bất kỳ được cài xen vào vectơ virut cụ thể thông qua kỹ thuật tái tổ hợp. Ví dụ, hệ gen vectơ AAV tái tổ hợp có thể bao gồm ít nhất là một trình tự ITR củng cố bên sườn vùng khởi đầu, đoạn nhồi, trình tự được quan tâm (*ví dụ,* ARNi), và trình tự polyađenyl hóa. Hệ gen vectơ hoàn chỉnh có thể bao gồm tập hợp hoàn chỉnh của các trình tự polynucleotit của vectơ. Theo một số phương án, độ chuẩn axit nucleic của vectơ virut có thể được đo theo đơn vị vg/ml. Các phương pháp thích hợp để đo độ chuẩn này là đã biết trong lĩnh vực (*ví dụ,* PCR định lượng).

Thuật ngữ "đơn vị lây nhiễm (iu)," "hạt lây nhiễm," hoặc "đơn vị sao chép," như được sử dụng liên quan đến độ chuẩn virut, chỉ số lượng hạt vectơ AAV tái tổ hợp lây nhiễm và có khả năng sao chép như được xác định bởi thử nghiệm tâm lây

nhiễm, còn được gọi là thử nghiệm tâm sao chép, như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu McLaughlin *et al.* (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973.

Thuật ngữ "đơn vị tải nạp (tu)" như được sử dụng liên quan đến độ chuẩn virut, chỉ số lượng hạt vectơ AAV tái tổ hợp lây nhiễm dẫn đến tạo ra sự sản xuất sản phẩm gen chuyển chức năng như được xác định trong thử nghiệm chức năng được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế trong bản mô tả này, hoặc ví dụ, trong tài liệu Xiao *et al.* (1997) *Exp. Neurobiol*, 144:113-124; hoặc trong tài liệu Fisher *et al.* (1996) *J. Virol.*, 70:520-532 (thử nghiệm LFU).

Trình tự "đoạn lặp cuối ngược chiều" hoặc trình tự "ITR" là thuật ngữ đã được hiểu rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và chỉ trình tự tương đối ngắn được tìm thấy ở đầu tận cùng của hệ gen virut theo hướng ngược lại.

Trình tự "đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR) AAV", một thuật ngữ đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, là trình tự gồm khoảng 145 nucleotit có mặt ở cả hai đầu tận cùng của hệ gen AAV sợi đơn tự nhiên. 125 nucleotit ngoài cùng của ITR có thể có mặt trong một trong hai hướng, dẫn đến tính không đồng nhất giữa các hệ gen AAV khác nhau và giữa hai đầu của một hệ gen AAV. 125 nucleotit ngoài cùng này cũng chứa một vài vùng ngắn hơn tự bổ sung (được ký hiệu là vùng A, A', B, B', C, C' và D), cho phép xảy ra sự bắt cặp bazơ nội chuỗi trong phần này của ITR.

"Trình tự phân tách cuối" hoặc "trs" là trình tự trong vùng D của ITR AAV được phân cắt bởi protein rep AAV trong quá trình sao chép ADN virut. Trình tự phân tách cuối đột biến là chống lại sự phân cắt bởi Protein rep AAV.

"Virut hỗ trợ" cho AAV dùng để chỉ virut cho phép AAV (là parvovirut khiếm khuyết) được sao chép và đóng gói bởi tế bào chủ. Nhiều virut hỗ trợ như vậy đã được xác định, bao gồm ađenovirut, virut herpes và poxvirut như virut gây bệnh đậu mùa. Ađenovirut bao gồm nhiều nhóm phụ khác nhau, mặc dù Ađenovirut typ 5 của nhóm phụ C (Ad5) được sử dụng phổ biến nhất. Nhiều ađenovirut có nguồn gốc từ người, động vật có vú không phải người và chim là đã được biết đến và có sẵn ở các cơ quan lưu giữ như ATCC. Virut thuộc họ herpes, cũng có sẵn ở các cơ quan lưu giữ

như ATCC, bao gồm, ví dụ, virut gây bệnh mụn giộp (HSV), virut Epstein-Barr (EBV), virut cự bào (CMV) và virut gây bệnh giả dại (PRV).

"Tỷ lệ phần trăm (%) độ tương đồng trình tự" so với trình tự polypeptit hoặc axit nucleic tham chiếu được định nghĩa là phần trăm của các gốc axit amin hoặc nucleotit trong trình tự ứng viên giống với gốc axit amin hoặc nucleotit trong trình tự polypeptit hoặc axit nucleic tham chiếu, sau khi sắp xếp thẳng hàng các trình tự này và đưa vào các quãng cách, nếu cần, để đạt được phần trăm độ tương đồng trình tự tối đa, và không xem xét sự thay thế bảo toàn là một phần của độ tương đồng trình tự. Sự sắp xếp thẳng hàng để xác định tỷ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự axit amin hoặc axit nucleic có thể đạt được bằng nhiều cách thuộc kỹ năng trong lĩnh vực, ví dụ như, bằng cách sử dụng các chương trình phần mềm máy tính có sẵn công khai, ví dụ, các chương trình được mô tả trong tài liệu Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al*, eds, 1987), Supp. 30, phần 7.7.18, Bảng 7.7,1, và bao gồm phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Ví dụ về chương trình sắp xếp thẳng hàng là ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pennsylvania). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các thông số thích hợp để xác định sự sắp xếp thẳng hàng, bao gồm thuật toán bất kỳ cần thiết để đạt được sự sắp xếp thẳng hàng tối đa trên toàn bộ chiều dài của các trình tự được so sánh. Đối với các mục đích trong bản mô tả này, % độ tương đồng trình tự axit amin của trình tự axit amin đã cho A so với trình tự axit amin đã cho B (mà theo cách khác có thể được diễn đạt là trình tự axit amin đã cho A có hoặc có chứa % độ tương đồng trình tự axit amin nhất định so với trình tự axit amin đã cho B) được tính như sau: 100 nhân với phân số X/Y, trong đó X là số lượng gốc axit amin được tính điểm là bắt cặp tương đồng bởi chương trình sắp xếp thẳng hàng trình tự trong sự sắp xếp thẳng hàng của A và B theo chương trình đó, và trong đó Y là tổng số lượng gốc axit amin trong B. Cần phải hiểu rằng khi chiều dài của trình tự axit amin A không bằng chiều dài của trình tự axit amin B, % độ tương đồng trình tự axit amin của A so với B sẽ không bằng % độ tương đồng trình tự axit amin của B so với A. Cho các mục đích trong bản mô tả này, % độ tương đồng trình tự axit nucleic của trình tự axit nucleic C

đã cho so với trình tự axit nucleic D đã cho (mà theo cách khác có thể diễn đạt là trình tự axit nucleic C đã cho có hoặc có chứa % độ tương đồng trình tự axit nucleic nhất định so với trình tự axit nucleic D đã cho) được tính như sau: 100 nhân với phân số W/Z, trong đó W là số lượng nucleotit được tính điểm là bắt cặp tương đồng bởi chương trình sắp xếp thẳng hàng trình tự trong sự sắp xếp thẳng hàng C và D theo chương trình đó, và trong đó Z là tổng số lượng các nucleotit trong D. Cần phải hiểu rằng khi chiều dài của trình tự axit nucleic C không bằng chiều dài của trình tự axit nucleic D, % độ tương đồng trình tự axit nucleic của C so với D sẽ không bằng % độ tương đồng trình tự axit nucleic của D so với C.

Phân tử (*ví dụ*, axit nucleic hoặc protein) hoặc tế bào "được phân lập" nghĩa là nó được xác định và được tách riêng và/hoặc được thu hồi từ thành phần của môi trường tự nhiên của nó.

"Lượng hữu hiệu" là lượng đủ để thu được kết quả có lợi hoặc mong muốn, bao gồm các kết quả lâm sàng (*ví dụ*, sự cải thiện của các triệu chứng, đạt được các điểm mút lâm sàng, và kết quả tương tự). Lượng hữu hiệu có thể được sử dụng trong một hoặc nhiều lần sử dụng. Đối với tình trạng bệnh, lượng hữu hiệu là lượng đủ để cải thiện, làm ổn định, hoặc làm chậm sự phát triển của bệnh.

"Cá thể" hoặc "đối tượng" là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật đã thuần hóa (*ví dụ*, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), động vật linh trưởng (*ví dụ*, người và động vật linh trưởng không phải người như khỉ), thỏ, và động vật gặm nhấm (*ví dụ,* chuột nhắt và chuột cống). Theo một số phương án nhất định, cá thể hoặc đối tượng là người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "điều trị" là phương pháp thu được kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn. Đối với mục đích của sáng chế này, các kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, làm giảm nhẹ các triệu chứng, làm giảm phạm vi của bệnh, làm ổn định (*ví dụ*, không xấu đi) tình trạng của bệnh, ngăn chặn sự lây lan (*ví dụ*, di căn) của bệnh, làm trễ hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc làm dịu tình trạng bệnh, và làm

thuyên giảm (một phần hoặc toàn bộ), dù có thể phát hiện được hay không phát hiện được. "Điều trị" cũng có thể có nghĩa là kéo dài sự sống sót so với sự sống sót bình thường nếu không nhận được điều trị.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều trị dự phòng" dùng để chỉ việc điều trị, trong đó cá thể đã được biết là hoặc được nghi ngờ là có hoặc có nguy cơ có rối loạn nhưng không biểu hiện triệu chứng hoặc chỉ có các triệu chứng tối thiểu của rối loạn này. Cá thể trải qua điều trị dự phòng có thể được điều trị trước khi khởi phát các triệu chứng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, chất "trị liệu" (*ví dụ,* polypeptit trị liệu, axit nucleic, hoặc gen chuyển) là chất tạo ra kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn, chẳng hạn như các kết quả lâm sàng ví dụ được mô tả ở trên. Như vậy, chất trị liệu có thể được sử dụng trong việc điều trị như được mô tả ở trên.

Thuật ngữ "võng mạc trung tâm" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ điểm vàng phía ngoài và/hoặc điểm vàng phía trong và/hoặc hố thị giác. Thuật ngữ "loại tế bào võng mạc trung tâm" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ loại tế bào của võng mạc trung tâm, chẳng hạn như, ví dụ, RPE và tế bào nhận kích thích ánh sáng.

Thuật ngữ "điểm vàng" dùng để chỉ vùng của võng mạc trung tâm ở động vật linh trưởng mà chứa nồng độ tương đối cao của tế bào nhận kích thích ánh sáng, cụ thể là tế bào hình que và tế bào hình nón, so với võng mạc ngoại vi. Thuật ngữ "điểm vàng phía ngoài" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể cũng dùng để chỉ "điểm vàng ngoại vi". Thuật ngữ "điểm vàng phía trong" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể cũng dùng để chỉ "điểm vàng trung tâm".

Thuật ngữ "hố thị giác" dùng để chỉ vùng nhỏ trong võng mạc trung tâm của động vật linh trưởng có đường kính xấp xỉ bằng hoặc nhỏ hơn 0,5 mm mà chứa nồng độ tương đối cao của tế bào nhận kích thích ánh sáng, cụ thể là tế bào hình nón, khi so với võng mạc ngoại vi và điểm vàng.

Thuật ngữ "không gian dưới võng mạc" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ vị trí ở võng mạc ở giữa tế bào nhận kích thích ánh sáng và tế bào biểu mô sắc tố võng mạc. Không gian dưới võng mạc có thể là không gian tiềm năng, chẳng hạn như trước khi tiêm dịch lỏng dưới võng mạc bất kỳ. Không gian dưới võng mạc có thể còn chứa dịch lỏng mà được tiêm vào không gian tiềm năng này. Trong trường hợp này, dịch lỏng "tiếp xúc với không gian dưới võng mạc." Tế bào mà "tiếp xúc với không gian dưới võng mạc" bao gồm tế bào tiếp giáp với không gian dưới võng mạc, chẳng hạn như RPE và tế bào nhận kích thích ánh sáng.

Thuật ngữ "mụn" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ không gian dịch lỏng ở trong không gian dưới võng mạc của mắt. Mụn theo sáng chế có thể được tạo ra bằng mũi tiêm đơn lẻ của dịch lỏng vào trong không gian đơn lẻ, bằng nhiều mũi tiêm của một hoặc nhiều dịch lỏng vào cùng một không gian, hoặc bằng nhiều mũi tiêm vào nhiều không gian, mà khi được tái định vị tạo ra không gian dịch lỏng tổng cộng hữu dụng để đạt được hiệu quả trị liệu trên phần mong muốn của không gian dưới võng mạc.

"Vùng khởi đầu rhođopsin kinaza (RK)" dùng để chỉ trình tự polynucleotit có nguồn gốc từ gen rhođopsin kinaza (*ví dụ,* RK ở người, được biểu diễn bởi GenBank Entrez Gene ID 6011) mà gây ra sự biểu hiện cụ thể là ở tế bào nhận kích thích ánh sáng hình que và hình nón, cũng như là các dòng tế bào võng mạc chẳng hạn như WERI Rb-1. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "vùng khởi đầu rhođopsin kinaza" có thể chỉ trình tự khởi đầu nguyên vẹn hoặc mảnh của trình tự khởi đầu này đủ để điều khiển sự biểu hiện đặc hiệu tế bào nhận kích thích ánh sáng, như các trình tự được mô tả trong Khani, S.C., *et al.* (2007) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48(9):3954-61 and Young, J.E., *et al.* (2003) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44(9):4076-85. Theo một số phương án, vùng khởi đầu RK kéo dài từ -112 đến +180 so với vị trí bắt đầu phiên mã.

"Vùng khởi đầu β-actin (CBA) ở gà" dùng để chỉ trình tự polynucleotit có nguồn gốc từ gen β-actin ở gà (*ví dụ, Gallus gallus* beta actin, được biểu diễn bởi

GenBank Entrez Gene ID 396526). Như được sử dụng trong bản mô tả này, "vùng khởi đầu β-actin ở gà" có thể dùng để chỉ vùng khởi đầu chứa yếu tố tăng cường sớm virut cự bào (CMV), vùng khởi đầu và exon và intron thứ nhất của gen β-actin ở gà, và vùng nhận nối của gen beta-globin ở thỏ, chẳng hạn như các trình tự được mô tả trong Miyazaki, J., *et al.* (1989) *Gene* 79(2):269-77. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vùng khởi đầu CAG" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vùng tăng cường sớm CMV/vùng khởi đầu beta actin (CAG) ở gà" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau.

Việc viện dẫn đến "khoảng" giá trị hoặc thông số trong bản mô tả này bao gồm (và mô tả) các phương án nhằm vào *bản thân*giá trị hoặc thông số đó. Ví dụ, phần mô tả đề cập đến "khoảng X" bao gồm phần mô tả về "X."

Như được sử dụng trong bản mô tả này, dạng số ít bao gồm cả sự viện dẫn đến dạng số nhiều trừ khi có quy định khác.

Cần phải hiểu rằng các khía cạnh và phương án của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này bao gồm "có chứa," "gồm," và/hoặc "về cơ bản gồm" các khía cạnh và phương án.

III.Hạt virut

Heparan sulfat proteoglycan (HSPG) đã được biết trong lĩnh vực là đóng vai trò làm thụ thể tế bào đối với hạt AAV2 (Summerford, C. and Samulski, R.J. (1998) *J. Virol.* 72(2):1438-45). Sự liên kết giữa hạt AAV2 và HSPG ở màng tế bào phục vụ cho việc gắn hạt vào tế bào. Các protein bề mặt tế bào khác chẳng hạn như thụ thể yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi và αvβ5 integrin có thể cũng làm thuận lợi cho sự lây nhiễm tế bào. Sau khi liên kết, hạt AAV2 có thể đi vào tế bào thông qua các cơ chế bao gồm nhập bào qua trung gian thụ thể thông qua hố phủ clathrin. Hạt AAV2 có thể được giải phóng từ túi nhập bào khi axit hóa nội bào. Điều này cho phép hạt AAV2 di chuyển vào vùng quanh nhân và sau đó là nhân tế bào. Hạt AAV3 cũng đã biết là liên kết heparan (Rabinowitz, J.E., *et al.* (2002) *J. Virol.* 76(2):791-801).

Quy trình liệu pháp gen đối với rối loạn của mắt đòi hỏi sự chuyển cục bộ của vectơ vào tế bào trong mắt (*ví dụ*, tế bào của võng mạc). Tế bào mà sẽ là đích điều trị target ở các bệnh này có thể bao gồm, *không kể những cái khác*, một hoặc nhiều tế bào của mắt (*ví dụ,* tế bào tiếp nhận kích thích ánh sáng, nơron thị giác, *v.v.*). Các phương pháp và bộ kit theo sáng chế dựa trên, ít nhất là một phần, phát hiện rằng capsit rAAV cụ thể (*ví dụ,* capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan) cho phép phân bố vectơ lan rộng giữa các tế bào của mắt. Như vậy, các capsit này có thể đặc biệt có lợi để chuyển axit nucleic khác loại vào mắt của cá thể, cải thiện sự chuyển nạp rAAV của tế bào sau khi chuyển hạt rAAV vào mắt của cá thể, cải thiện sự biểu hiện của axit nucleic khác loại sau khi chuyển hạt rAAV vào mắt của cá thể, và/hoặc điều trị rối loạn của mắt của cá thể bằng cách sử dụng hạt rAAV.

Tương tự như vậy, quy trình liệu pháp gen đối với rối loạn của CNS đòi hỏi sự chuyển cục bộ của vectơ vào tế bào trong CNS. Tế bào mà sẽ là đích điều trị ở các bệnh này có thể bao gồm, *không kể những cái khác*, một hoặc nhiều tế bào của não (*ví dụ,* nơron). Các phương pháp và bộ kit theo sáng chế dựa trên, ít nhất là một phần, phát hiện rằng capsit rAAV cụ thể (*ví dụ,* capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan) cho phép phân bố vectơ lan rộng giữa các tế bào của CNS. Như vậy, các capsit này có thể đặc biệt có lợi để chuyển axit nucleic khác loại vào hệ thần kinh trung ương (CNS) của cá thể, cải thiện sự chuyển nạp rAAV của tế bào sau khi chuyển hạt rAAV vào CNS của cá thể, cải thiện sự biểu hiện của axit nucleic khác loại sau khi chuyển hạt rAAV vào CNS của cá thể, và/hoặc điều trị rối loạn của CNS của cá thể bằng cách sử dụng hạt rAAV.

Capsit của AAV (*ví dụ*, AAV2, AAVrh8R, *v.v.*) đã được biết là bao gồmh ba protein capsit: VP1, VP2, và VP3. Các protein này chứa lượng đáng kể của trình tự axit amin gối và các trình tự đầu N duy nhất. Capsit AAV2 bao gồm 60 dưới đơn vị

được sắp xếp theo cấu trúc đối xứng hai mươi mặt (Xie, Q, *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(16):10405-10). VP1, VP2, và VP3 đã được phát hiện là có mặt ở tỷ lệ 1:1:10.

Sự liên kết giữa protein capsit AAV2 và HSPG đã được biết là diễn ra thông qua tương tác tĩnh điện giữa các gốc protein capsit AAV2 bazơ và các gốc glycosaminoglycan tích điện âm (Opie, SR *et al.*, (2003) *J. Virol.* 77:6995-7006; Kern, A *et al.*, (2003) *J. Virol.* 77:11072-11081). Các gốc capsit cụ thể tham gia vào các tương tác này bao gồm R484, R487, K532, R585, và R588. Các đột biến ở các gốc này đã được chứng minh là làm giảm sự liên kết AAV2 với tế bào HeLa và bản thân heparan (Opie, SR *et al.*, (2003) *J. Virol.* 77:6995-7006; Kern, A *et al.*, (2003) *J. Virol.* 77:11072-11081; WO 2004/027019 A2, bằng sáng chế Mỹ số 7,629,322). Ngoài ra, không bị ràng buộc bởi lý thuyết, người ta cho rằng (các) sự thế axit amin ở một hoặc nhiều gốc tương ứng với các axit amin 484, 487, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2 có thể điều biến tính chất chuyển nạp của các loại capsit AAV mà không liên kết với HSPG, hoặc có thể điều biến tính chất chuyển nạp của các loại capsit AAV độc lập đối với khả năng liên kết với HSPG của chúng.

Các khía cạnh nhất định của sáng chế liên quan đến việc chuyển axit nucleic khác loại vào mắt hoặc hệ thần kinh trung ương (CNS) của cá thể bao gồm bước sử dụng hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) vào mắt hoặc CNS của cá thể. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, hạt rAAV theo sáng chế có chứa capsit AAV typ huyết thanh 2 (AAV2). Theo một số phương án, hạt rAAV theo sáng chế có chứa capsit AAV typ huyết thanh rh8R (AAVrh8R).

Như được mô tả trong bản mô tả này, hạt rAAV có các đột biến ở protein capsit ở các gốc mà tương tác với HSPG hoặc ở một hoặc nhiều gốc tương ứng với các axit amin 484, 487, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2 thể hiện các tính chất có lợi, chẳng hạn như sự biểu hiện được tăng cường

và/hoặc viêm thần kinh giảm. Theo đó, theo một số phương án, khi chuyển, axit nucleic khác loại mã hóa bởi vectơ rAAV được biểu hiện ở mức độ biểu hiện tăng lên, khi so với mức độ biểu hiện của axit nucleic khác loại của hạt rAAV có chứa capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV tham chiếu (*ví dụ,* protein capsit rAAV kiểu dại). Theo một số phương án, sự biểu hiện của axit nucleic được tăng lên bằng ít nhất là khoảng 10%, ít nhất là khoảng 25%, ít nhất là khoảng 50%, ít nhất là khoảng 75%, hoặc ít nhất là khoảng 100%. Theo một số phương án, khi chuyển, hạt rAAV làm giảm viêm thần kinh, khi so với hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV tham chiếu (*ví dụ,* protein capsit rAAV kiểu dại). Theo một số phương án, viêm thần kinh được làm giảm bằng ít nhất là khoảng 10%, ít nhất là khoảng 25%, ít nhất là khoảng 50%, ít nhất là khoảng 75%, hoặc ít nhất là khoảng 100%. Protein capsit rAAV tham chiếu thích hợp có thể bao gồm protein capsit bất kỳ mà thiếu một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan (do đó capsit tham chiếu có thể chứa một hoặc nhiều sự thế "nền tảng" mà không làm thay đổi sự liên kết với HSPG).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp chuyển axit nucleic khác loại vào mắt của cá thể bao gồm bước sử dụng hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) vào không gian dưới võng mạc của cá thể trong đó hạt rAAV có chứa a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV.

Theo một số phương án, hạt rAAV theo sáng chế có chứa capsit AAV typ huyết thanh 2 (AAV2). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ VP1, VP2 và/hoặc VP3 của AAV2, trong đó sự thế amin làm thay đổi sự tương tác của hạt rAAV với HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với HSPG). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của VP1 AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit

amin của VP2 AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của VP3 AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của dạng kết hợp của VP1, VP2 và VP3 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ VP1, VP2 và/hoặc VP3 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ các protein capsit nêu trong SEQ ID NO:1, 3 và/hoặc 5. Theo một số phương án, hạt rAAV theo sáng chế có chứa protein capsit nêu trong SEQ ID NO:2, 4 và/hoặc 6.

Theo một số phương án, hạt rAAV theo sáng chế có chứa capsit typ huyết thanh AAV 3 (AAV3). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ VP1, VP2 và/hoặc VP3 của AAV3, trong đó sự thế amin làm thay đổi sự tương tác của hạt rAAV với HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với HSPG). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của VP1 AAV3. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của VP2 AAV3. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của VP3 AAV3. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của dạng kết hợp của VP1, VP2 và VP3 của AAV3. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ VP1, VP2 và/hoặc VP3 của AAV3. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin tương ứng với protein capsit nêu trong SEQ ID NO:7.

Theo một số phương án, hạt rAAV theo sáng chế có chứa capsit AAV typ huyết thanh rh8R (AAVrh8R), *ví dụ,* như được mô tả trong U.S. PG Pub. số 20090317417. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ VP1, VP2 và/hoặc VP3 của AAVrh8R, trong đó sự thế amin làm thay đổi sự tương tác của hạt rAAV với HSPG

(*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với HSPG). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của VP1 AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của VP2 AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của VP3 AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của dạng kết hợp của VP1, VP2 và VP3 của AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ VP1, VP2 và/hoặc VP3 của AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của protein capsit ví dụ như SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, hạt rAAV theo sáng chế có chứa protein capsit nêu trong các SEQ ID NO:10 và/hoặc 11.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 75%, hoặc khoảng ít nhất là 100%. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng ít nhất là 10%, khoảng ít nhất là 15%, khoảng ít nhất là 20%, khoảng ít nhất là 25%, khoảng ít nhất là 30%, khoảng ít nhất là 35%, khoảng ít nhất là 40%, khoảng ít nhất là 45%, khoảng ít nhất là 50%, khoảng ít nhất là 55%, khoảng ít nhất là 60%, khoảng ít nhất là 65%, khoảng ít nhất là 70%, khoảng ít nhất là 75%, khoảng ít nhất là 80%, khoảng ít nhất là 85%, khoảng ít nhất là 90%, khoảng ít nhất là 95%, hoặc khoảng ít nhất là 100% (khi so với sự liên kết của hạt rAAV có chứa capsit kiểu dại). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan bằng từ khoảng bất kỳ trong số các khoảng từ khoảng 10% đến khoảng 100%, từ khoảng 20% đến khoảng 100%, từ khoảng 30% đến khoảng 100%, từ khoảng 40% đến khoảng 100%, từ khoảng 50% đến khoảng 100%, từ khoảng 60% đến khoảng 100%, từ khoảng 70% đến khoảng 100%, từ khoảng 80% đến khoảng 100%, từ khoảng 90% đến khoảng 100%, từ khoảng 10% đến khoảng 90%, từ

khoảng 20% đến khoảng 90%, từ khoảng 30% đến khoảng 90%, từ khoảng 40% đến khoảng 90%, từ khoảng 50% đến khoảng 90%, từ khoảng 60% đến khoảng 90%, từ khoảng 70% đến khoảng 90%, từ khoảng 80% đến khoảng 90%, từ khoảng 10% đến khoảng 80%, từ khoảng 20% đến khoảng 80%, từ khoảng 30% đến khoảng 80%, từ khoảng 40% đến khoảng 80%, từ khoảng 50% đến khoảng 80%, từ khoảng 60% đến khoảng 80%, từ khoảng 70% đến khoảng 80%, từ khoảng 10% đến khoảng 70%, từ khoảng 20% đến khoảng 70%, từ khoảng 30% đến khoảng 70%, từ khoảng 40% đến khoảng 70%, từ khoảng 50% đến khoảng 70%, từ khoảng 60% đến khoảng 70%, từ khoảng 10% đến khoảng 60%, từ khoảng 20% đến khoảng 60%, từ khoảng 30% đến khoảng 60%, từ khoảng 40% đến khoảng 60%, từ khoảng 50% đến khoảng 60%, từ khoảng 10% đến khoảng 50%, từ khoảng 20% đến khoảng 50%, từ khoảng 30% đến khoảng 50%, từ khoảng 40% đến khoảng 50%, từ khoảng 10% đến khoảng 40%, từ khoảng 20% đến khoảng 40%, từ khoảng 30% đến khoảng 40%, từ khoảng 10% đến khoảng 30%, từ khoảng 20% đến khoảng 30%, hoặc từ khoảng 10% đến khoảng 20%, (khi so với sự liên kết của hạt rAAV có chứa capsit kiểu dại). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin không dẫn đến sự liên kết có thể phát hiện được của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan so với sự liên kết của hạt rAAV kiểu dại. Phương pháp đo sự liên kết của hạt AAV với HSPG là đã biết trong lĩnh vực; *ví dụ*, sự liên kết với môi trường sắc ký heparan sulfat hoặc sự liên kết với tế bào đã biết là biểu hiện HSPG trên bề mặt của nó. Ví dụ, xem tài liệu Opie, SR *et al.*, (2003) *J. Virol.* 77:6995-7006 và Kern, A *et al.*, (2003) *J. Virol.* 77:11072-11081.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt rAAV để chuyển axit nucleic trị liệu dưới võng mạc, trong đó hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin của protein capsit mà làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 532, 585 hoặc 588 của VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 532, 585 hoặc 588 của VP2 của AAV2, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một

số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 532, 585 hoặc 588 của VP3 của AAV2, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 532, 585 hoặc 588 của VP1 của AAV2, VP2 của AAV2, và/hoặc VP3 của AAV2, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, VP1 của rAAV2 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 532, 585 hoặc 588 của VP1 của AAV3, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 532, 585 hoặc 588 của VP2 của AAV3, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 532, 585 hoặc 588 của VP3 của AAV3, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 532, 585 hoặc 588 của VP1 của AAV3, VP2 của AAV3, và/hoặc VP3 của AAV3, đánh số dựa trên VP1 của rAAV2. Theo một số phương án, VP1 của rAAV2 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1.

Theo một số phương án, hạt AAV theo sáng chế có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin ở vị trí 485, 488, 528, 533, 586 hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương bằng gốc axit amin không tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin tích điện dương được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin không tích điện dương bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin kỵ nước được thế bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit

amin có chứa sự thế của gốc alanin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R533 và/hoặc A586, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R. Theo các phương án khác, capsit AAV có chứa sự thế axit amin A586R và/hoặc R533A, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV nêu trong các SEQ ID NO:10 và/hoặc 11.

Theo một số phương án theo sáng chế, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin tích điện dương (*ví dụ,* axit amin có chuỗi bên tích điện dương) bằng gốc axit amin không tích điện dương (*ví dụ,* axit amin không chứa chuỗi bên tích điện dương). Các axit amin tích điện dương bao gồm arginin, histiđin và lysin. Ví dụ về các gốc axit amin mà không tích điện dương bao gồm các axit amin tích điện âm (axit aspartic và axit glutamic), các axit amin có chuỗi bên phân cực không tích điện (serin, threonin, asparagin, và glutamin), các axit amin có chuỗi bên kỵ nước (alanin, valin, isoloxin, loxin, methionin, phenylalanin, tyrosin và tryptophan), glyxin, xystein, và prolin. Theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc axit amin tích điện dương của capsit AAV được thế bằng gốc axit amin kỵ nước. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc axit amin không tích điện dương bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo một số phương án, gốc axit amin kỵ nước được thế bằng gốc axit amin tích điện dương. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc alanin. Theo các phương án khác nữa, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588 của VP1, VP2 và/hoặc VP3, đánh số

dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588 của VP1, VP2 và/hoặc VP3 của AAV2, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484, R487, K527, K532, và/hoặc R588 của VP1, VP2 và/hoặc VP3 của AAV2, đánh số dựa trên SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa một hoặc nhiều sự thế R484A, R487A, R585A và/hoặc R588A của VP1, VP2 và/hoặc VP3 của AAV2, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588 của VP1, VP2 và/hoặc VP3 của AAV3, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa một hoặc nhiều sự thế R484A, R487A, R585A và/hoặc R588A của VP1, VP2 và/hoặc VP3 của AAV3, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV nêu trong các SEQ ID NO:2, 4 và/hoặc 6.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R485, R488, R533, A586 và/hoặc T589 của VP1, VP2 và/hoặc VP3, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí R485, R488, R533, A586 và/hoặc T589 của VP1, VP2 và/hoặc VP3, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R, đánh số dựa trên SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa một hoặc nhiều sự thế R533A và/hoặc A586R của VP1, VP2 và/hoặc VP3 của AAV2, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa protein capsit rAAV nêu trong các SEQ ID NO:10 và/hoặc 11.

Theo một số phương án, capsit AAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với HSPG. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với HSPG. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bẩy, tám, chín, hoặc mười sự thế axit amin mà làm giảm hoặc loại

bỏ sự liên kết với HSPG. Theo một số phương án, capsit AAV có một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bẩy, tám, chín, hoặc mười sự thế axit amin mà làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với HSPG. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế ở vị trí R484 và R487, đánh số dựa trên VP1 của rAAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có sự thế ở vị trí R484 và R487, đánh số dựa trên VP1 của rAAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế ở vị trí R585 và R588, đánh số dựa trên VP1 của rAAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có sự thế ở vị trí R585 và R588, đánh số dựa trên VP1 của rAAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế R484A và R487A, đánh số dựa trên VP1 của rAAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có sự thế R484A và R487A, đánh số dựa trên VP1 của rAAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của rAAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có sự thế R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của rAAV2.

Heparan sulfat proteoglycan (HSPGs) đã được biết là được biểu hiện ở nhiều mô trong toàn bộ cơ thể và đóng vai trò quan trọng trong nền ngoại bào, sự dính tế bào, và sự truyền tín hiệu tế bào. Theo một số phương án, heparan sulfat proteoglycan được biểu hiện trên một hoặc nhiều tế bào của CNS. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều tế bào của CNS là nơron.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt rAAV để chuyển CNS của axit nucleic trị liệu, trong đó hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin của protein capsit mà làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 347, 350, 390, 395, 448, 451, 484, 487, 527, 532, 585 và/hoặc 588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "đánh số dựa trên VP1 của AAV2" dùng để chỉ axit amin của protein capsit được chỉ định tương ứng với axit amin được chỉ định của VP1 của AAV2. Ví dụ, nếu một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 347, 350, 390, 395, 448, 451, 484, 487, 527, 532, 585 và/hoặc 588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2, thì một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở (các) axit amin của

protein capsit được chỉ định tương ứng với các axit amin 347, 350, 390, 395, 448, 451, 484, 487, 527, 532, 585 và/hoặc 588 của VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí R347, R350, K390, K395, R448, R451, R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 532, 585 hoặc 588 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 484, 487, 532, 585 hoặc 588 của VP1 của AAV2, VP2 của AAV2, và/hoặc VP3 của AAV2, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, VP1 của AAV2 (*ví dụ,* rAAV2) có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1.

Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế ở vị trí R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588, đánh số dựa trên VP1 của rAAV2. Theo một số phương án, hạt rAAV theo sáng chế có chứa protein capsit nêu trong các SEQ ID NO:2, 4 và/hoặc 6. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế ở vị trí R484 và R487 hoặc R585 và R588, đánh số dựa trên VP1 của rAAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế R484A và R487A hoặc sự thế R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế axit amin R585A và R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, capsit AAV có chứa sự thế axit amin K532A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế R347A, R350A, K390A, K395A, R448A, R451A, R484A, R487A, K527A, K532A, R585A và/hoặc R588A, đánh số dựa trên VP1 của AAV2.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt rAAV để chuyển CNS của axit nucleic trị liệu, trong đó hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin của protein capsit mà làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết của hạt rAAV vào heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, hạt rAAV theo sáng chế có chứa capsit AAV typ huyết thanh rh8R (AAVrh8R), *ví dụ,* như được mô tả trong U.S. PG Pub. số 20090317417. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ VP1, VP2 và/hoặc VP3 của

AAVrh8R, trong đó sự thế amin làm thay đổi sự tương tác của hạt rAAV với HSPG (*ví dụ*, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với HSPG). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của VP1 AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của VP2 AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của VP3 AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của dạng kết hợp của VP1, VP2 và VP3 của AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ VP1, VP2 và/hoặc VP3 của AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là sự thế của các gốc axit amin của protein capsit ví dụ như SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, hạt rAAV theo sáng chế có chứa protein capsit nêu trong các SEQ ID NO:10 và/hoặc 11.

Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh rh8R (AAVrh8R). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 586 và/hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh8R có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí A586 và/hoặc T589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế A586R, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế T589R hoặc T589K, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh8R.

Như thảo luận ở trên, không bị ràng buộc bởi lý thuyết, người ta cho rằng (các) sự thế axit amin ở một hoặc nhiều gốc tương ứng với các axit amin 484, 487, 532, 585 hoặc 588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2 có thể điều biến tính chất chuyển nạp của các loại capsit AAV mà không liên kết với HSPG, hoặc có thể điều biến tính chất chuyển nạp của các loại capsit AAV độc lập đối với khả năng liên kết với HSPG của chúng. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có

chứa một hoặc nhiều axit amin tương ứng với axit amin được thể hiện trên **Hình 20**. Ví dụ, theo một số phương án, một hoặc nhiều axit amin ở (các) vị trí tương ứng với các axit amin 585 và/hoặc 588 (đánh số dựa trên VP1 của AAV2) được thay thế bằng các gốc arginin (*ví dụ,* S586 và/hoặc T589 đối với AAV1 hoặc AAV6; S586 và/hoặc A589 đối với AAV9; A586 và/hoặc T589 đối với AAVrh8R; Q588 và/hoặc T591 đối với AAV8; và Q588 và/hoặc A591 đối với AAVrh10). Các capsit cải biến này có thể được sử dụng, *không kể những cái khác*, trong việc cải thiện sự chuyển nạp trong thủy tinh thể hướng đích vào võng mạc. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều axit amin (*ví dụ,* arginin hoặc lysin) ở (các) vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 527 và/hoặc 532 (đánh số dựa trên VP1 của AAV2) được thay thế bằng (các) axit amin không tích điện dương chẳng hạn như alanin (*ví dụ,* R485, R488, K528, và/hoặc K533 đối với AAV1 hoặc AAV6; R485, R488, K528, và/hoặc R533 đối với AAV9 hoặc AAVrh8R; và R487, R490, K530, và/hoặc R535 đối với AAV8 hoặc AAVrh10). Các capsit cải biến này có thể được sử dụng, *không kể những cái khác*, trong việc cải thiện sự chuyển nạp dưới võng mạc hoặc CNS.

Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh 1 (AAV1). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 586 và/hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV1. Theo một số phương án, VP1 của AAV1 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:12. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí S586 và/hoặc T589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV1. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế S586R hoặc S586K, đánh số dựa trên VP1 của AAV1. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế T589R, đánh số dựa trên VP1 của AAV1. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh 6 (AAV6). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 586 và/hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV6. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAV6 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:13. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí S586 và/hoặc T589, đánh số dựa trên sự đánh

số VP1 của AAV6. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế S586R hoặc S586K, đánh số dựa trên VP1 của AAV6. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế T589R, đánh số dựa trên VP1 của AAV6. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh 8 (AAV8). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 588 và/hoặc 591, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV8. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAV8 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí Q588 và/hoặc T591, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV8. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế Q588R hoặc Q588K, đánh số dựa trên VP1 của AAV8. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế T591R, đánh số dựa trên VP1 của AAV8. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh 9 (AAV9). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 586 và/hoặc 589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV9. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAV9 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:15. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí S586 và/hoặc A589, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế S586R hoặc S586K, đánh số dựa trên VP1 của AAV9. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế A589R hoặc A589K, đánh số dựa trên VP1 của AAV9. Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa capsit AAV typ huyết thanh rh10 (AAVrh10). Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin là ở vị trí 588 và/hoặc 591, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh10. Theo một số phương án, sự đánh số được dựa trên VP1 của AAVrh10 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế ở vị trí Q588 và/hoặc A591, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh10. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế Q588R hoặc Q588K, đánh số dựa trên VP1 của

AAVrh10. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế A591R, đánh số dựa trên VP1 của AAVrh10.

IV. Phương pháp điều trị

Quy trình liệu pháp gen đối với các bệnh võng mạc, chẳng hạn như LCA, viêm võng mạc sắc tố, và thoái hóa điểm vàng do tuổi tác đòi hỏi sự chuyển cục bộ của vectơ vào tế bào ở võng mạc. Tế bào mà sẽ là đích điều trị trong các bệnh này là tế bào nhận kích thích ánh sáng ở võng mạc hoặc tế bào của RPE nằm dưới võng mạc thần kinh cảm giác. Việc chuyển vectơ liệu pháp gen vào các tế bào này đòi hỏi phải tiêm vào không gian dưới võng mạc ở giữa võng mạc và RPE. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp chuyển vectơ liệu pháp gen rAAV vào tế bào của võng mạc tại đó vectơ rAAV được bọc capsit trong capsit AAV có chứa sự thế của một hoặc nhiều gốc axit amin mà tương tác với HSPG.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị rối loạn của CNS của cá thể bao gồm bước chuyển hợp phần có chứa hạt rAAV vào CNS của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa (a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và (b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV. Ngoài ra, phương pháp chuyển axit nucleic khác loại vào hệ thần kinh trung ương (CNS) của cá thể, phương pháp cải thiện sự chuyển nạp rAAV của tế bào sau khi chuyển hạt rAAV vào CNS của cá thể, và phương pháp cải thiện sự biểu hiện của axit nucleic khác loại sau khi chuyển của hạt rAAV vào CNS của cá thể được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để chuyển, *ví dụ,* axit nucleic khác loại, chẳng hạn như axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu. Các phương pháp này có thể được sử dụng, *không kể những cái khác*, trong việc điều trị rối loạn của CNS. Theo một số phương án, cá thể là người.

Vectơ trị liệu

Sáng chế đề xuất các phương pháp liệu pháp gen đối với rối loạn ở mắt trong đó hạt rAAV có chứa vectơ trị liệu được chuyển vào võng mạc của cá thể. sự chuyển nạp được cải thiện của tế bào của võng mạc có thể đạt được bằng cách bọc capsit cho vectơ rAAV trong capsit rAAV (*ví dụ*, hạt rAAV2, rAAVrh8R, *v.v.*) tại đó một hoặc nhiều axit amin của capsit mà tương tác với HSPG được thế do đó sự liên kết của hạt rAAV với HSPG được làm giảm hoặc loại bỏ. Vectơ có thể có chứa axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit (*ví dụ,* polypeptit trị liệu hoặc chẩn đoán) và/hoặc axit nucleic trị liệu. Axit nucleic mà mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc chẩn đoán và/hoặc axit nucleic trị liệu có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp và tái tổ hợp tiêu chuẩn. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit chẩn đoán. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế về axit nucleic mã hóa cho polypeptit trị liệu bao gồm: axit nucleic để thay thế cho gen bị mất hoặc bị đột biến đã biết là gây ra bệnh võng mạc, ví dụ *Prph2*, *RPE65*, *MERTK*, *RPGR*, *RP2*, *RPGRIP*, *CNGA3*, *CNGB3*, và *GNAT2*. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế khác về axit nucleic mã hóa cho polypeptit trị liệu bao gồm các axit nucleic mã hóa cho yếu tố dinh dưỡng thần kinh (chẳng hạn như *GDNF*, *CNTF*, *FGF2*, *PEDF*, *EPO*), gen chống chết tế bào theo chương trình (chẳng hạn như *BCL2*, *BCL-X*, *NFκB*), yếu tố chống tạo mạch (chẳng hạn như *Enđostatin*, *Angiostatin*, *sFlt*), và yếu tố kháng viêm (chẳng hạn như *IL10*, *IL1-ra*, *TGFβ, IL4*). Polypeptit trị liệu khác đối với rối loạn ở mắt bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở Myo7a, ABCA4, REP1, GUCY2D, PDE6C, RS1, RPGRIP, Lpcat1, AIPL1, RDH12, CHM. Theo một số phương án, polypeptit được mã hóa là biến thể ở người của polypeptit.

Axit nucleic theo sáng chế có thể mã hóa cho polypeptit mà là protein nội bào, neo trong màng tế bào, vẫn ở trong tế bào, hoặc được tiết bởi tế bào được chuyển nạp với vectơ theo sáng chế. Đối với polypeptit được tiết bởi tế bào mà tiếp nhận vectơ; polypeptit có thể hòa tan (*tức là.*, không gắn vào tế bào). Ví dụ, polypeptit hòa tan

không có vùng xuyên màng và được tiết từ tế bào. Kỹ thuật để xác định và loại bỏ trình tự axit nucleic mà mã hóa cho miền xuyên màng là đã biết trong lĩnh vực.

Vectơ mà có thể được sử dụng theo sáng chế còn bao gồm vectơ có chứa axit nucleic mà mã hóa cho ARN (*ví dụ*, ARNi, ribozym, miARN, siARN, ARN đối nghĩa) mà khi được phiên mã từ axit nucleic của vectơ có thể điều trị rối loạn ở mắt bằng cách gây trở ngại cho sự dịch mã hoặc sự phiên mã của protein bất thường hoặc dư kết hợp với tình trạng bệnh theo sáng chế. Ví dụ, axit nucleic theo sáng chế có thể mã hóa cho ARN mà điều trị bệnh bằng cách khử hoặc làm giảm đặc hiệu cao đối với mARN mã hóa cho protein bất thường và/hoặc dư. Các trình tự ARN trị liệu bao gồm ARNi, ARN ức chế nhỏ (siRNA), micrô ARN (miARN), và/hoặc ribozym (chẳng hạn như ribozym đầu búa và kẹp tóc) mà có thể điều trị các bệnh bằng cách khử hoặc làm giảm đặc hiệu cao mARN mã hóa cho protein bất thường và/hoặc dư, chẳng hạn như các mARN tồn tại ở nhiều dạng thoái hóa võng mạc di truyền. Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế của rối loạn ở mắt mà có thể được điều trị bằng các trình tự ARN trị liệu bao gồm, ví dụ, viêm võng mạc sắc tố trội nhiễm sắc thể thường (ADRP) và bệnh võng mạc tiểu đường. Ví dụ về các trình tự ARN trị liệu và axit nucleic mã hóa cho các trình tự mà có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm các trình tự được mô tả trong, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 6,225,291, phần bộc lộ của chúng được kết hợp ở đây chỉ nhằm mục đích tham khảo. Theo một số phương án, trình tự ARN trị liệu là miR-708. Theo một số phương án, miR-708 được sử dụng kết hợp với axit nucleic mã hóa cho rhođopsin kiểu dại, dưới dạng một phần của cùng vectơ rAAV hoặc dưới dạng một phần của vectơ rAAV thứ hai. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa cho rhođopsin kiểu dại thiếu trình tự đích miR-708 nằm trong vùng không dịch mã 3' của gen rhođopsin. Vectơ rAAV mã hóa cho miR-708 và/hoặc rhođopsin được đề xuất trong đơn sáng chế tạm thời Mỹ số 61/969,027, được nêu ở đây chỉ để tham khảo.

Các khía cạnh nhất định của sáng chế liên quan đến việc sử dụng hạt rAAV (*ví dụ,* vectơ trị liệu) mà có chứa (a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa

một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và (b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu. Như được sử dụng trong bản mô tả này, axit nucleic trị liệu có thể biểu hiện axit nucleic trị liệu bất kỳ theo sáng chế hoặc axit nucleic bất kỳ mà mã hóa cho polypeptit trị liệu theo sáng chế. Axit nucleic trị liệu có thể được sử dụng, ví dụ, để làm thuyên giảm triệu chứng, ngăn ngừa hoặc làm chậm sự tiến triển, và/hoặc điều trị rối loạn (*ví dụ,* rối loạn được mô tả trong bản mô tả này).

Sự chuyển nạp được cải thiện của tế bào của CNS có thể đạt được bằng cách bọc capsit vectơ rAAV trong capsit rAAV (*ví dụ*, rAAV2, rAAVrh8R, *v.v.*) tại đó một hoặc nhiều axit amin của capsit mà tương tác với HSPG được thế do đó sự liên kết của hạt rAAV với HSPG được làm giảm hoặc loại bỏ. Vectơ có thể có chứa axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit (*ví dụ,* polypeptit trị liệu hoặc chẩn đoán) và/hoặc axit nucleic trị liệu. Axit nucleic mà mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc chẩn đoán và/hoặc axit nucleic trị liệu có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp và tái tổ hợp tiêu chuẩn. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit chẩn đoán. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho gen kết hợp CNS.

Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho axit nucleic trị liệu. Theo một số phương án, axit nucleic trị liệu có thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở siARN, shARN, ARNi, a miARN, ARN đối nghĩa, ribozym hoặc ADNzym. Như vậy, axit nucleic trị liệu có thể mã hóa cho ARN mà khi được phiên mã từ axit nucleic của vectơ có thể điều trị rối loạn theo sáng chế (*ví dụ,* rối loạn của CNS) bằng cách làm cản trở sự dịch mã hoặc sự phiên mã của protein bất thường hoặc dư kết hợp với rối loạn theo sáng chế. Ví dụ, axit nucleic theo sáng chế có thể mã hóa cho ARN mà điều trị rối loạn bằng cách khử hoặc làm giảm đặc hiệu cao đối với mARN

mã hóa cho protein bất thường và/hoặc dư. Các trình tự ARN trị liệu bao gồm ARNi, ARN ức chế nhỏ (siRNA), micrô ARN (miARN), và/hoặc ribozym (chẳng hạn như ribozym đầu búa và kẹp tóc) mà có thể điều trị rối loạn bằng cách khử hoặc làm giảm đặc hiệu cao đối với mARN mã hóa cho protein bất thường và/hoặc dư.

Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu. Polypeptit trị liệu có thể, *ví dụ,* cung cấp hoạt tính polypeptit và/hoặc enzym mà có mặt hoặc không có mặt ở mức độ giảm đi trong tế bào hoặc sinh vật. Theo cách khác, polypeptit trị liệu có thể cung cấp hoạt tính polypeptit và/hoặc enzym mà gián tiếp làm trung hòa sự mất cân bằng trong tế bào hoặc sinh vật. Ví dụ, polypeptit trị liệu đối với rối loạn có liên quan đến sự tăng dần của chất chuyển hóa gây ra bởi sự thiếu hụt ở enzym hoặc hoạt tính chuyển hóa có thể cung cấp enzym hoặc hoạt tính chuyển hóa bị mất đi, hoặc nó có thể cung cấp enzym hoặc hoạt tính chuyển hóa thay thế mà dẫn đến sự giảm đi của chất chuyển hóa. Polypeptit trị liệu có thể còn được sử dụng để làm giảm hoạt tính của polypeptit (*ví dụ,* polypeptit mà được biểu hiện quá mức, được hoạt hóa bằng đột biến tăng chức năng, hoặc polypeptit mà hoạt tính của chúng bị mất điều hòa theo cách khác) bằng cách đóng vai trò làm, *ví dụ,* polypeptit trội âm tính.

Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được chọn từ enzym, yếu tố dinh dưỡng thần kinh, polypeptit mà bị thiếu hụt hoặc bị đột biến ở cá thể mắc rối loạn liên quan đến CNS, chất chống oxy hóa, yếu tố chống chết tế bào theo chương trình, yếu tố chống tạo mạch, và yếu tố chống viêm. Polypeptit này có thể được sử dụng để điều trị rối loạn của CNS bằng cách, *ví dụ,* cung cấp hoạt tính polypeptit và/hoặc enzym mà được làm giảm, không có, hoặc bị mất điều hòa trong rối loạn của CNS, làm thuyên giảm nguyên nhân và/hoặc triệu chứng của rối loạn CNS, và/hoặc làm giảm bớt sự hư hại đối với CNS gây ra bởi rối loạn CNS (*ví dụ,* sự chết tế bào theo chương trình, sự viêm, hoặc kiểu chết tế bào khác). Ví dụ không làm giới hạn sáng chế về axit nucleic mã hóa cho polypeptit trị liệu bao gồm: axit nucleic để thay thế cho gen bị mất hoặc bị đột biến đã biết là gây ra rối loạn của

CNS, ví dụ *Prph2*, *RPE65*, *MERTK*, *RPGR*, *RP2*, *RPGRIP*, *CNGA3*, *CNGB3*, và *GNAT2*. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế khác về axit nucleic mã hóa cho polypeptit trị liệu bao gồm các axit nucleic mã hóa cho yếu tố dinh dưỡng thần kinh (chẳng hạn như *GDNF*, *CNTF*, *FGF2*, *PEDF*, *EPO*), gen chống chết tế bào theo chương trình (chẳng hạn như *BCL2*, *BCL-X*, *NFκB*), yếu tố chống tạo mạch (chẳng hạn như *Enđostatin*, *Angiostatin*, *sFlt*), và yếu tố kháng viêm (chẳng hạn như *IL10*, *IL1-ra*, *TGFβ, IL4*). Polypeptit trị liệu khác đối với rối loạn CNS bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở Myo7a, ABCA4, REP1, GUCY2D, PDE6C, RS1, RPGRIP, Lpcat1, AIPL1, RDH12, CHM. Theo một số phương án, polypeptit được mã hóa là biến thể ở người của polypeptit. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa cho protein ức chế sự chết tế bào theo chương trình ở nơron (NAIP), yếu tố sinh trưởng thần kinh (NGF), yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc thần kinh đệm (GDNF), yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc não (BDNF), yếu tố dinh dưỡng thần kinh ở thể mi (CNTF), tyrosin hyđroxylaza (TH), GTP-xyclohyđrolaza (GTPCH), axit amin đecarboxylaza (AADC), chất chống oxy hóa, polypeptit chống tạo mạch, polypeptit kháng viêm, và/hoặc aspartoaxylaza (ASPA). Ví dụ về chất chống oxy hóa bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở SOD1; SOD2; Catalaza; các Sirtuin 1, 3, 4, hoặc 5; NRF2; PGC1a; GCL (dưới đơn vị xúc tác); GCL (dưới đơn vị cải biến); ađiponectin,; glutathion peroxiđaza 1; và neuroglobin. Ví dụ về polypeptit chống tạo mạch bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở angiostatin, Enđostatin, PEDF, thụ thể VEGF hòa tan, và thụ thể PDGF hòa tan. Ví dụ về polypeptit kháng viêm bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở IL-10, IL17R hòa tan, TNF-R hòa tan, TNF-R-Ig, chất ức chế IL-1, và chất ức chế IL18. Polypeptit ví dụ khác thuộc các nhóm này mà có thể được sử dụng để điều trị rối loạn của CNS được đề xuất *dưới đây*.

Axit nucleic theo sáng chế có thể mã hóa cho polypeptit mà là protein nội bào, neo trong màng tế bào, vẫn ở trong tế bào, hoặc được tiết bởi tế bào được chuyển nạp với vectơ theo sáng chế. Đối với polypeptit được tiết bởi tế bào mà tiếp nhận vectơ; polypeptit có thể hòa tan (*tức là.*, không gắn vào tế bào). Ví dụ, polypeptit hòa tan

không có vùng xuyên màng và được tiết từ tế bào. Kỹ thuật để xác định và loại bỏ trình tự axit nucleic mà mã hóa cho miền xuyên màng là đã biết trong lĩnh vực.

Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được liên kết có điều khiển với vùng khởi đầu. Vùng khởi đầu nêu làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vùng khởi đầu sớm qua trung gian virut cự bào (CMV), LTR RSV, MoMLV LTR, vùng khởi đầu phosphoglyxerat kinaza-1 (PGK), vùng khởi đầu simian virut 40 (SV40) và vùng khởi đầu CK6, vùng khởi đầu transthyretin (TTR), vùng khởi đầu TK, vùng khởi đầu đáp ứng với tetraxyclin (TRE), vùng khởi đầu HBV, vùng khởi đầu hAAT, vùng khởi đầu LSP, vùng khởi đầu thể khảm đặc hiệu gan (LSP), vùng khởi đầu E2F, vùng khởi đầu telomeraza (hTERT); vùng khởi đầu vùng tăng cường virut cự bào/beta-actin của gà/β-globin của thỏ (vùng khởi đầu CAG; Niwa *et al.*, *Gene*, 1991, 108(2):193-9) và vùng khởi đầu yếu tố kéo dài 1-alpha (EFl-alpha) (Kim *et al.*, *Gene*, 1990, 91(2):217-23 and Guo *et al.*, *Gene Ther.*, 1996, 3(9):802-10). Theo một số phương án, vùng khởi đầu bao gồm vùng khởi đầu β-glucuronidaza của người hoặc vùng tăng cường virut cự bào được liên kết với vùng khởi đầu β-actin của gà (CBA). Vùng khởi đầu có thể là vùng khởi đầu cơ định, cảm ứng hoặc kìm hãm. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vectơ tái tổ hợp có chứa axit nucleic mã hóa cho gen chuyển khác loại theo sáng chế được liên kết có điều khiển với vùng khởi đầu CBA. Các vùng khởi đầu ví dụ và mô tả có thể tìm thấy, *ví dụ,* trong U.S. PG Pub. 20140335054.

Ví dụ về vùng khởi đầu cấu trúc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vùng khởi đầu LTR virut gây ung thư mô liên kết Rous phiên mã ngược (RSV) (tùy ý với vùng tăng cường RSV), vùng khởi đầu virut cự bào (CMV) (tùy ý với vùng tăng cường CMV) [xem, *ví dụ*, Boshart *et al.*, Cell, 41:521-530 (1985)], vùng khởi đầu SV40, vùng khởi đầu đihyđrofolat ređuctaza, vùng khởi đầu 13-actin, vùng khởi đầu phosphoglyxerol kinaza (PGK), và vùng khởi đầu EFla [Invitrogen].

Vùng khởi đầu cảm ứng cho phép điều hòa sự biểu hiện gen và có thể được điều hòa bằng các hợp chất được cung cấp từ bên ngoài, các yếu tố môi trường chẳng

hạn như nhiệt độ, hoặc sự có mặt của tình trạng vật lý cụ thể, *ví dụ*, pha cấp tính, tình trạng biệt hóa cụ thể của tế bào, hoặc chỉ ở tế bào đang sao chép. Vùng khởi đầu cảm ứng và hệ thống cảm ứng có sẵn từ nhiều nguồn thương mại, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Invitrogen, Clontech và Ariad. Nhiều hệ thống khác đã được mô tả và có thể dễ dàng chọn được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ về vùng khởi đầu cảm ứng được điều hòa bởi vùng khởi đầu được cung cấp từ bên ngoài bao gồm vùng khởi đầu metallothionin cừu cảm ứng kẽm (MT), vùng khởi đầu virut gây khối u động vật có vú ở chuột cảm ứng đexamethason (Dex) (MMTV), hệ thống vùng khởi đầu T7 polymeraza (WO 98/10088); vùng khởi đầu côn trùng ecđyson (No *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 93:3346-3351 (1996)), hệ thống có thể kiềm chế tetraxyclin (Gossen *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992)), hệ thống cảm ứng tetraxyclin (Gossen *et al., Science*, 268:1766-1769 (1995), cũng xem tài liệu Harvey *et al., Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998)), hệ thống cảm ứng RU486 (Wang *et al., Nat. Biotech.*, 15:239-243 (1997) và Wang *et al., Gene Ther.*, 4:432-441 (1997)) và hệ thống cảm ứng rapamyxin (Magari *et al., J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872 (1997)). Các loại khác nữa của vùng khởi đầu cảm ứng mà có thể hữu dụng trong trường hợp này là các vùng khởi đầu cảm ứng mà được điều hòa bởi tình trạng sinh lý cụ thể, *ví dụ*, nhiệt độ, pha cấp tính, tình trạng biệt hóa cụ thể của tế bào, hoặc chỉ ở tế bào đang sao chép.

Theo phương án khác, vùng khởi đầu tự nhiên, hoặc mảnh của chúng, đối với gen chuyển sẽ được sử dụng. Vùng khởi đầu tự nhiên có thể được sử dụng khi mong muốn sự biểu hiện của gen chuyển cần bắt chước sự biểu hiện tự nhiên. Vùng khởi đầu tự nhiên có thể được sử dụng khi sự biểu hiện của gen chuyển phải được điều hòa tạm thời hoặc theo sự phát triển, hoặc theo phương thức đặc hiệu mô, hoặc đáp ứng với kích thích phiên mã cụ thể. Theo phương án khác, các yếu tố kiểm soát sự biểu hiện tự nhiên khác, chẳng hạn như yếu tố tăng cường, vị trí polyađenyl hóa hoặc các trình tự liên ứngKozak có thể còn được sử dụng để bắt chước sự biểu hiện tự nhiên.

Theo một số phương án, các trình tự điều hòa truyền khả năng biểu hiện gen đặc hiệu mô. Trong một số trường hợp, các trình tự điều hòa đặc hiệu mô liên kết các yếu tố phiên mã đặc hiệu mô mà gây ra sự phiên mã theo phương thức đặc hiệu mô. Các trình tự điều hòa đặc hiệu mô này (*ví dụ*, vùng khởi đầu, vùng tăng cường, *v.v.*) đã được biết rõ trong lĩnh vực. Các trình tự điều hòa đặc hiệu mô ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các vùng khởi đầu đặc hiệu mô sau đây: vùng khởi đầu nơron chẳng hạn như enolaza đặc hiệu nơron (NSE) (Andersen *et al.*, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993)), vùng khởi đầu gen chuỗi nhẹ neurofilament (Piccioli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)), và vùng khởi đầu gen vgf đặc hiệu nơron (Piccioli *et al.*, *Neuron*, 15:373-84 (1995)). Theo một số phương án, vùng khởi đầu đặc hiệu mô là vùng khởi đầu của gen được chọn từ: nhân nơron (NeuN), protein axit tơ thần kinh đệm (GFAP), polip tuyến (APC), và phân tử chuyển tiếp liên kết canxi đã ion hóa 1 (Iba-1). Các vùng khởi đầu đặc hiệu mô thích hợp khác sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Theo một số phương án, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu beta-actin ở gà.

Theo một số phương án, axit nucleic khác loại chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mà được biểu hiện ở một hoặc nhiều tế bào của CNS. Nhiều trình tự khởi đầu được liệt kê ở trên (*ví dụ,* vùng khởi đầu CBA) đã được biết trong lĩnh vực là được biểu hiện ở một hoặc nhiều tế bào của CNS. Theo một số phương án, trình tự khởi đầu có thể được biểu hiện khắp nơi ở sinh vật, và do đó có thể biểu hiện ở một hoặc nhiều tế bào của CNS do sự chuyển vào CNS của nó. Theo các phương án khác, trình tự khởi đầu mà biểu hiện đặc hiệu trong CNS, hoặc tập hợp con của một hoặc nhiều tế bào CNS, có thể được sử dụng. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được liên kết có điều khiển với vùng khởi đầu thích hợp để biểu hiện của polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu ở một hoặc nhiều tế bào của CNS. Như vậy, theo một số phương án, polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị rối loạn của CNS.

Theo một số phương án, vùng khởi đầu làm biểu hiện axit nucleic khác loại trong tế bào não. Tế bào não có thể dùng để chỉ tế bào não bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở nơron (chẳng hạn như nơron cảm giác, nơron vận động, nơron trung gian, nơron tiết đopamin, nơron có gai trung bình, nơron tiết cholin, nơron tiết GABA, nơron tháp, *v.v.*), tế bào thần kinh đệm (chẳng hạn như tiểu thần kinh đệm, thần kinh đệm, tế bào hình sao, tế bào thần kinh đệm ít gai, tế bào màng não thất, tế bào thần kinh đệm hướng tâm, *v.v.*), tế bào nhu mô não, tế bào tiểu thần kinh đệm, tế bào màng não thất, và/hoặc tế bào Purkinje. Theo một số phương án, vùng khởi đầu làm biểu hiện axit nucleic khác loại ở nơron. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại được biểu hiện chuyên biệt ở nơron (*ví dụ,* được biểu hiện ở nơron và không được biểu hiện ở tế bào khác của CNS, chẳng hạn như tế bào thần kinh đệm).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất vectơ rAAV để sử dụng trong phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị một hoặc nhiều khiếm khuyết gen (*ví dụ*, khiếm khuyết gen có thể di truyền, sự thay đổi gen sinh dưỡng, và dạng tương tự) ở động vật có vú, chẳng hạn như ví dụ, khiếm khuyết gen mà dẫn đến sự thiếu hụt polypeptit hoặc sự dư thừa polypeptit ở đối tượng, hoặc để điều trị hoặc làm giảm mức độ trầm trọng hoặc quy mô của sự thiếu hụt ở đối tượng biểu lộ rối loạn kết hợp với CNS có liên kết với sự thiếu hụt ở polypeptit này ở tế bào và mô. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước sử dụng vectơ rAAV mà mã hóa cho một hoặc nhiều peptit trị liệu, polypeptit trị liệu, ARN chức năng trị liệu, axit nucleic ức chế trị liệu, shARN trị liệu, microARN trị liệu, nucleotit đối nghĩa trị liệu, *v.v.* trong chất mang dược dụng vào đối tượng ở lượng và trong khoảng thời gian đủ để điều trị rối loạn kết hợp CNS ở đối tượng mắc hoặc nghi ngờ mắc rối loạn này.

Vectơ rAAV có thể có chứa dưới dạng gen chuyển, axit nucleic mã hóa cho protein hoặc ARN chức năng mà điều biến hoặc điều trị rối loạn kết hợp với CNS. Sau đây là danh mục không làm giới hạn sáng chế của các gen có liên quan đến rối loạn liên quan đến CNS: protein ức chế sự chết tế bào theo chương trình ở nơron

(NAIP), yếu tố sinh trưởng thần kinh (NGF), yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc thần kinh đệm (GDNF), yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc não (BDNF), yếu tố dinh dưỡng thần kinh ở thể mi (CNTF), tyrosin hyđroxylaza (TM, GTP-xyclohyđrolaza (GTPCH), aspartoaxylaza (ASPA), superoxit đismutaza (SOD1), chất chống oxy hóa, polypeptit chống tạo mạch, polypeptit kháng viêm, và axit amin đecorboxylaza (AADC). Ví dụ, gen chuyển hữu dụng trong việc điều trị bệnh Parkinson mã hóa cho TH, mà là enzym hạn chế tốc độ trong tổng hợp đopamin. Gen chuyển mã hóa cho GTPCII, mà tạo ra đồng yếu tố TII tetrahyđrobiopterin, có thể còn được sử dụng trong việc điều trị bệnh Parkinson. Gen chuyển mã hóa cho GDNF hoặc BDNF, hoặc AADC, mà làm thuận tiện cho sự chuyển hóa của L-Dopa thành DA, có thể còn được sử dụng để điều trị bệnh Parkinson. Đối với việc điều trị ALS, gen chuyển hữu dụng có thể mã hóa cho: GDNF, BDNF hoặc CNTF. Cũng để điều trị ALS, gen chuyển hữu dụng có thể mã hóa cho ARN chức năng, *ví dụ*, shARN, miARN, mà ức chế sự biểu hiện của SOD1. Đối với việc điều trị chứng thiếu máu cục bộ gen chuyển hữu dụng có thể mã hóa cho NAIP hoặc NGF. Gen chuyển mã hóa cho Beta-glucuroniđaza (GUS) có thể hữu dụng để điều trị các bệnh dự trữ lysosom nhất định (*ví dụ*, bệnh khuyết tật bệnh Mucopolysacharidosis typ VII (MPS VII)). Gen chuyển mã hóa cho gen hoạt hóa tiền dược chất, *ví dụ*, HSV-Tymiđin kinaza mà chuyển hóa ganciclovir thành nucleotit gây độc mà phá vỡ sự tổng hợp ADN và dẫn đến sự chết tế bào, có thể hữu dụng để điều trị các bệnh ung thư nhất định, *ví dụ*, khi được sử dụng kết hợp với tiền dược chất. Gen chuyển mã hóa cho opioit nội sinh, β-enđorphin này có thể hữu dụng để điều trị chứng đau. Ví dụ về chất chống oxy hóa bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở SOD1; SOD2; Catalaza; các Sirtuin 1, 3, 4, hoặc 5; NRF2; PGC1a; GCL (dưới đơn vị xúc tác); GCL (dưới đơn vị cải biến); ađiponectin,; glutathion peroxiđaza 1; và neuroglobin. Ví dụ về polypeptit chống tạo mạch bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở angiostatin, Enđostatin, PEDF, thụ thể VEGF hòa tan, và thụ thể PDGF hòa tan. Ví dụ về polypeptit kháng viêm bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở IL-10, IL17R hòa tan, TNF-R hòa tan, TNF-R-Ig, chất ức chế IL-1, và chất ức chế IL18. Các ví dụ khác về gen chuyển mà có thể được sử dụng trong vectơ

rAAV theo sáng chế sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực (Xem tài liệu, *ví dụ*, Costantini L C, *et al.*, *Gene Therapy* (2000) 7, 93-109).

Theo một số phương án, polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu được sử dụng để điều trị rối loạn của CNS. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, người ta cho rằng polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu có thể được sử dụng để làm giảm hoặc triệt tiêu sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của polypeptit mà sự tăng chức năng của chúng được kết hợp với rối loạn, hoặc làm tăng cường sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của polypeptit để bù lại sự thiếu hụt mà được kết hợp với rối loạn (*ví dụ,* đột biến ở gen mà sự biểu hiện của chúng thể hiện hoạt tính tương tự hoặc có liên quan). Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế của rối loạn theo sáng chế mà có thể được điều trị bằng polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu theo sáng chế (các gen ví dụ mà có thể được hướng đích hoặc được cung cấp được nêu trong ngoặc đơn đối với mỗi rối loạn) bao gồm đột quỵ (*ví dụ, caspaza-3, Beclin1, Ask1, PAR1, HIF1α, PUMA*, và/hoặc gen bất kỳ trong số các gen được mô tả Fukuda, A.M. and Badaut, J. (2013) *Genes (Basel)* 4:435-456), bệnh Huntington (thể đột biến *HTT*), chứng động kinh (*ví dụ, SCN1A, NMDAR, ADK,* và/hoặc gen bất kỳ trong số các gen được mô tả trong Boison, D. (2010) *Epilepsia* 51:1659-1668), bệnh Parkinson (alpha-synuclein), bệnh Lou Gehrig (còn được gọi là bệnh xơ cứng teo cơ một bên; *SOD1*), bệnh Alzheimer (tau, protein tiền chất amyloit), thoái hóa hạch nền-vỏ não hoặc CBD (tau), thoái hóa hạch-vỏ nền hoặc CBGD (tau), sa sút trí tuệ trán-thái dương hoặc FTD (tau), chứng liệt trên nhân tiến triển hoặc PSP (tau), bệnh teo đa hệ thống hoặc MSA (alpha-synuclein), bệnh ung thư não (*ví dụ,* gen sinh ung thư đột biến hoặc được biểu hiện quá mức có liên quan đến bệnh ung thư não), và bệnh dự trữ lysosom (LSD). Rối loạn theo sáng chế có thể bao gồm các rối loại mà bao gồm vùng lớn của vỏ não, *ví dụ,* lớn hơn một vùng chức năng của vỏ não, nhiều hơn một thùy của vỏ não, và/hoặc toàn bộ vỏ não. Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế khác về rối loạn theo sáng chế mà có thể được điều trị bằng polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu theo sáng chế bao gồm tổn thương não do chấn thương, rối loạn mất chức năng enzym, rối loạn tâm thần (bao gồm hội chứng căng thẳng sau chấn thương), bệnh thoái hóa thần kinh, và

rối loạn nhận thức (bao gồm chứng mất trí, chứng tự kỷ, và chứng trầm cảm). Rối loạn mất chức năng enzym bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chứng loạn dưỡng chất trắng não (bao gồm bệnh Canavan) và bệnh dự trữ lysosom bất kỳ được mô tả dưới đây.

Theo một số phương án, polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu được sử dụng để điều trị bệnh dự trữ lysosom. Như thường được biết đến trong lĩnh vực, bệnh dự trữ lysosom là rối loạn chuyển hóa di truyền hiếm gặp đặc trưng bởi sự thiếu hụt chức năng lysosom. Rối loạn thường do sự thiếu hụt ở enzym cần cho sự chuyển hóa mucopolysacarit, glycoprotein, và/hoặc lipit thích hợp gây ra, dẫn đến sự tích lũy đến mức gây bệnh của vật liệu tế bào dự trữ ở lysosom. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế về bệnh dự trữ lysosom theo sáng chế mà có thể được điều trị bằng polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu theo sáng chế (các gen ví dụ mà có thể được hướng đích hoặc được cung cấp được nêu trong ngoặc đơn đối với mỗi rối loạn) bao gồm bệnh Gaucher typ 2 hoặc typ 3 (axit beta-glucosiđaza, *GBA*), bệnh GM1 gangliosidosis (beta-galactosiđaza-1, *GLB1*), bệnh Hunter (iđuronat 2-sulfataza, *IDS*), bệnh Krabbe (galactosylxeramiđaza, *GALC*), bệnh mannosidosis (manosiđaza, chẳng hạn như alpha-D-manosiđaza, *MAN2B1*), bệnh β mannosidosis (beta-manosiđaza, *MANBA*), bệnh loạn dưỡng chất trắng não biến sắc (pseuđoarylsulfataza A, *ARSA*), bệnh mucolipidosis II/III (N-axetylglucosamin-1-phosphotransferaza, *GNPTAB*), bệnh Niemann-Pick A (axit sphingomyelinaza, *ASM*), bệnh Niemann-Pick C (protein Niemann-Pick C, *NPC1*), bệnh Pompe (axit alpha-1,4-glucosiđaza, *GAA*), bệnh Sandhoff (dưới đơn vị hexosaminiđaza beta, *HEXB*), bệnh Sanfilippo A (N-sulfoglucosamin sulfohyđrolaza, *MPS3A*), bệnh Sanfilippo B (N-alpha-axetylglucosaminiđaza, *NAGLU*), bệnh Sanfilippo C (heparin axetyl-CoA:alpha-glucosaminiđaza N-axetyltransferaza, *MPS3C*), bệnh Sanfilippo D (N-axetylglucosamin-6-sulfataza, *GNS*), bệnh Schindler (alpha-N-axetylgalactosaminiđaza, *NAGA*), bệnh Sly (beta-glucuroniđaza, *GUSB*), bệnh Tay-Sachs (dưới đơn vị hexosaminiđaza alpha, *HEXA*), và bệnh Wolman (axit lipaza của lysosom, *LIPA*).

Các bệnh dự trữ lysosom khác, cũng như là enzym khiếm khuyết có liên quan đến mỗi bệnh, được liệt kê trong Bảng 1 dưới đây. Theo một số phương án, các bệnh được liệt kê trong bảng dưới đây được điều trị bằng polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu theo sáng chế mà bù hoặc theo cách khác làm cân bằng sự thiếu hụt enzym tương ứng.

Bảng 1. Rối loạn dự trữ lysosom và enzym khiếm khuyết có liên quan.

Bệnh dự trữ lysosom	**Enzym khiếm khuyết**
Bệnh Aspartylglusoaminuria	Aspartylglucosaminiđaza
Bệnh Fabry	Alpha-galactosiđaza A
Bệnh Batten ở Trẻ em (CNL1)	Palmitoyl protein thioesteraza
Bệnh Batten ở Trẻ em Muộn Cổ điển (CNL2)	Tripeptiđyl peptiđaza
Bệnh Batten ở Thiếu niên (CNL3)	Protein xuyên màng lysosom
Bệnh Batten, các dạng khác (CNL4-CNL8)	Sản phẩm gen phức hợp
Bệnh loạn dưỡng xystin	Chất vận chuyển xystein
Bệnh Farber	Axit xeramiđaza
Bệnh Fucosidosis	Axit alpha-L-fucosiđaza
Bệnh Galactosidosialidosis	Protein bảo vệ/cathepsin A
Bệnh Gaucher typ 1, 2, và 3	Axit beta-glucosiđaza
Bệnh GM1 gangliosidosis	Axit beta-galactosiđaza
Bệnh Hunter	Iđuronat-2-sulfataza
Bệnh Hurler-Scheie	Alpha-L-iđuroniđaza
Bệnh Krabbe	Galactocerebrosiđaza

Bệnh alpha-mannosidosis	Axit alpha-manosiđaza
Bệnh beta-mannosidosis	Axit beta-manosiđaza
Bệnh Maroteaux-Lamy	Arylsulfataza B
Chứng loạn dưỡng chất trắng não biến sắc	Arylsulfataza A
Bệnh Morquio A	N-axetylgalactosamin-6-sulfat
Bệnh Morquio B	Axit beta-galactosiđaza
Bệnh Mucolipidosis II/III	N-axetylglucosamin-1-phosphotransferaza
Bệnh Niemann-Pick A, B	Axit sphingomyelinaza
Bệnh Niemann-Pick C	NPC-1
Axit pompe	alpha-glucosiđaza
Bệnh Sandhoff	beta-hexosaminiđaza B
Bệnh Sanfilippo A	Heparan N-sulfataza
Bệnh Sanfilippo B	alpha-N-axetylglucosaminiđaza
Bệnh Sanfilippo C	Axetyl-CoA:alpha-glucoasaminit N-axetyltransferaza
Bệnh Sanfilippo D	N-axetylglucosamin-6-sulfat
Bệnh Schindler	alpha-N-axetylgalactosaminiđaza
Bệnh Schindler-Kanzaki	alpha-N-axetylgalactosaminiđaza
Bệnh sialidosis	alpha-neuramiđaza
Bệnh Sly	beta-glucuroniđaza
Bệnh Tay-Sachs	beta-hexosaminiđaza A

Bệnh Wolman	Axit lipaza

Bệnh Huntington

Một ví dụ về bệnh mà vectơ này có thể có lợi là bệnh Huntington (HD), mà gây ra bởi đột biến mở rộng đoạn lặp CAG mà mã hóa cho đoạn lặp polyglutamin (polyQ) mở rộng trong protein huntingtin đột biến (mHTT). HD là đích hấp dẫn đối với liệu pháp dựa trên ADN và ARN bởi vì nó là bệnh trội nhiễm sắc thể thường bắt nguồn từ đột biến của alen đơn lẻ. Vectơ AAV có thể tạo ra hệ thống chuyển lý tưởng đối với axit nucleic trị liệu và cho phép sự biểu hiện liên tục và lâu của các phân tử làm giảm huntingtin trong não.

Như được mô tả trong bản mô tả này, việc dùng trong sọ của hạt rAAV (*ví dụ,* vectơ trị liệu) có protein capsit rAAV chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, mang lại sự chuyển nạp nơron lan rộng. Theo đó, các khía cạnh của sáng chế đề xuất phương pháp chuyển axit nucleic khác loại vào hệ thần kinh trung ương bằng cách sử dụng hạt virut tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này để điều trị bệnh Huntington. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp và hợp phần để điều trị bệnh Huntington ở cá thể bao gồm bước sử dụng cho động vật có vú dược phẩm theo sáng chế (*ví dụ,* dược phẩm có chứa hạt virut biến thể theo sáng chế). Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp và hợp phần để ức chế sự biểu hiện của htt ở động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm bước sử dụng cho cá thể này dược phẩm theo sáng chế (*ví dụ,* dược phẩm có chứa hạt virut biến thể theo sáng chế). Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp và hợp phần để ức chế sự tích lũy của htt trong tế bào của cá thể mắc bệnh Huntington bao gồm bước sử dụng cho cá thể này dược phẩm theo sáng chế (*ví dụ,* dược phẩm có chứa hạt virut biến thể theo sáng chế).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp và hợp phần để làm thuyên giảm triệu chứng của HD ở cá thể, bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan cho CNS của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa vectơ mã hóa cho ARNi mà ức chế sự biểu hiện và/hoặc sự tích lũy của HTTe trong cá thể. Theo một số phương án, các triệu chứng của HD bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, múa giật, cứng nhắc, mất kiểm soát cử động cơ thể, mất kiểm soát cơ, thiếu sự phối hợp, hiếu động, cử động mắt chậm, điệu bộ bất thường, không ổn định, dáng đi loạng choạng, biểu hiện nét mặt không bình thường, có vấn đề về tiếng nói, khó nhai và/hoặc nuốt, rối loạn giấc ngủ, cơn tai biến ngập máu, chứng mất trí, sự thiếu hụt nhận thức (*ví dụ,* các khả năng liên quan đến lập kế hoạch, suy nghĩ tóm tắt, sự linh hoạt, sự tuân thủ quy tắc, sự nhạy cảm giữa các cá nhân, sự tự kiểm soát, sự chú ý, học tập, và ghi nhớ), chứng trầm cảm, chứng lo âu, sự thay đổi tính cách, sự gây sự, hành vi ám ảnh, hành vi ám ảnh cưỡng chế, bị ám ảnh tình dục, chứng rối loạn tâm thần, tính lãnh đạm, tính dễ bị kích thích, có ý nghĩ tự sát, sụt cân, teo thần kinh cơ, suy tim, độ dung chịu glucoza giảm, teo tinh hoàn, và loãng xương.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc làm chậm sự tiến triển của HD. HD trội nhiễm sắc thể thường là bệnh di truyền mà có thể được xác định kiểu gen. Ví dụ, số lượng đoạn lặp CAG trong *HTT* có thể được xác định bằng phương pháp định cỡ đoạn lặp trên cơ sở PCR. Kiểu chẩn đoán này có thể được thực hiện ở giai đoạn bất kỳ của cuộc đời thông qua thử nghiệm trực tiếp thanh thiếu niên hoặc người trưởng thành (*ví dụ,* có xuất hiện các triệu chứng lâm sàng), sàng lọc trước sinh hoặc thử nghiệm loại trừ trước sinh (*ví dụ,* bằng cách lấy mẫu lông nhung màng đệm hoặc chọc ối), hoặc sàng lọc phôi trước cấy ghép. Ngoài ra, HD có thể được chẩn đoán bằng cách chụp ảnh não, tìm kiếm sự co lại của nhân đuôi và/hoặc hạch và/hoặc não thất mở rộng. Các triệu chứng này, kết hợp với tiền sử gia đình của HD và/hoặc các triệu chứng lâm sàng, có thể biểu thị HD.

Phương thức xác định sự cải thiện của các triệu chứng của HD là đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, Thang Phân Loại Bệnh Huntington Hợp Nhất (UHDRS) có thể được sử dụng để đánh giá chức năng vận động, chức năng nhận thức, hành vi bất thường, và khả năng thực hiện chức năng (xem tài liệu, *ví dụ,* Huntington Study Group (1996) *Movement Disorders* 11:136-42). Thang phân loại này được phát triển để tạo ra thử nghiệm toàn diện, đồng đều đối với nhiều mặt của bệnh lý học, kết hợp các yếu tố từ các thử nghiệm chẳng hạn như Thang Cuộc Sống Hàng Ngày và Hoạt Động HD, thang mức độ trầm trọng của chứng múa giật Marsden và Quinn, thang Mức Độ Độc Lập và Tàn Phế Cơ Thể, thang phân loại vận động HD (HDMRS), thang khả năng thực hiện chức năng HD (HDFCS), và đánh giá thần kinh định lượng (QNE). Các thử nghiệm hữu dụng khác để xác định sự cải thiện của các triệu chứng HD có thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở Đánh Giá Nhận Thức Montreal, chụp ảnh não (*ví dụ,* MRI), Thử Nghiệm Phân Loại Mức Độ Lưu Loát, Thử Nghiệm Tạo Vết, Tra Cứu Bản Đồ, Thử Nghiệm Đọc Từ Stroop, Nhiệm Vụ Gõ Nhẹ Tăng Tốc, và Thử Nghiệm Thể Thức Chữ Số Ký Hiệu.

Theo một số khía cạnh của sáng chế, các phương pháp và hợp phần được sử dụng để điều trị cho người mắc HD. Như được mô tả ở trên, HD được di truyền theo phương thức trội nhiễm sắc thể thường và gây ra bởi sự mở rộng đoạn lặp CAG trong gen *HTT*. HD khởi phát ở thiếu niên được di truyền nhiều nhất từ phía bố mẹ. Kiểu hình giống bệnh Huntington cũng tương quan với các locut di truyền khác, chẳng hạn như *HDL1, PRNP, HDL2, HDL3,* và *HDL4*. Người ta cho rằng các locut di truyền khác có thể cải biến sự biểu lộ của các triệu chứng HD, bao gồm các đột biến ở các gen *GRIN2A, GRIN2B, MSX1, GRIK2,* và *APOE* .

Hợp phần rAAV

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp phần có chứa hạt rAAV bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này. Nhìn chung, hợp phần để sử dụng trong phương pháp và hệ thống theo sáng chế có chứa lượng hữu hiệu của hạt rAAV có chứa vectơ rAAV mã hóa cho polypeptit và/hoặc ARN, tùy ý trong tá dược dược dụng. Hạt virut

có chứa capsit AAV (*ví dụ*, capsit AAV2 hoặc AAVrh8R) trong đó một hoặc nhiều axit amin mà tương tác với HSPG được thế do đó sự liên kết của hạt rAAV với HSPG được làm giảm hoặc loại bỏ. Như đã được biết rõ trong lĩnh vực, tá dược dược dụng là chất tương đối trơ mà làm thuận tiện cho việc sử dụng của chất có tác dụng dược lý và có thể được cung cấp dưới dạng dung dịch hoặc huyền phù lỏng, dưới dạng nhũ tương, hoặc dưới dạng chất rắn thích hợp để hòa tan hoặc tạo huyền phù trong chất lỏng trước khi sử dụng. Ví dụ, tá dược có thể tạo hình dạng hoặc độ đặc, hoặc hoạt động dưới dạng chất pha loãng. Tá dược thích hợp bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chất làm ổn định, chất làm ẩm và nhũ tương hóa, muối để làm thay đổi độ thẩm thấu, chất bao nang, chất đệm pH, và chất đệm. Các tá dược này bao gồm dược chất bất kỳ thích hợp để chuyển trực tiếp vào mắt mà có thể được sử dụng mà không gây độc. Tá dược dược dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sorbitol, hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất TWEEN, và chất lỏng chẳng hạn như nước, nước muối, glyxerol và etanol. Muối dược dụng có thể được bao gồm trong đó, ví dụ, muối axit khoáng chẳng hạn như hyđroclorua, hyđrobromua, phosphat, sulfat, và muối tương tự; và muối của axit hữu cơ chẳng hạn như axetat, propionat, malonat, benzoat, và muối tương tự. Thảo luận kỹ về tá dược dược dụng có trong tài liệu REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co, N.J. 1991).

Nhìn chung, các hợp phần này được tạo chế phẩm để dùng bằng cách tiêm dưới võng mạc. Theo đó, các hợp phần này có thể được kết hợp với tá dược lỏng dược dụng chẳng hạn như nước muối, dung dịch muối cân bằng Ringer (độ pH = 7,4), và tá dược lỏng tương tự. Mặc dùng không yêu cầu, hợp phần có thể tùy ý được cung cấp ở dạng liều đơn vị thích hợp để dùng lượng chính xác.

Các phương pháp chuyển dưới võng mạc của rAAV

Các phương pháp chuyển dưới võng mạc là đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, xem tài liệu WO 2009/105690, được kết hợp ở đây để tham khảo. Tóm lại, phương pháp chung để chuyển hạt rAAV (*ví dụ*, hạt rAAV2, rAAVrh8R, *v.v.*) vào dưới võng mạc của điểm vàng và hố thị giác có thể được minh họa bằng mô tả vắn tắt sau đây. Ví dụ

này chỉ để minh họa các đặc điểm nhất định của phương pháp, và không nhằm làm giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Nhìn chung, vectơ rAAV có thể được chuyển ở dạng của hợp phần được tiêm trong mắt (dưới võng mạc) dưới sự quan sát trực tiếp bằng cách sử dụng kính hiển vi phẫu thuật. Theo một số phương án vectơ được bọc capsit trong hạt rAAV trong đó hạt rAAV có chứa capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan (*ví dụ*, ức chế hoặc loại bỏ sự liên kết HSPG), và vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV. Quy trình này có thể gồm có lấy khối dịch kính sau đó là tiêm huyền phù vectơ rAAV vào không gian dưới võng mạc bằng cách sử dụng ống thông dò nhỏ thông qua một hoặc nhiều phẫu thuật cắt võng mạc nhỏ.

Tóm lại, ống thông dò truyền có thể được nối tại chỗ để duy trì thể tích cầu mắt bình thường bằng cách truyền (*ví dụ,* nước muối) thông qua phẫu thuật. Việc lấy khối dịch kính được thực hiện bằng cách sử dụng ống thông dò có kích thước lỗ thích hợp (ví dụ có khổ từ 20 đến 27), trong đó thể tích của gel thủy tinh mà được loại bỏ được thay thế bằng cách truyền nước muối hoặc dung dịch đẳng trương khác từ ống thông dò truyền. Việc lấy khối dịch kính được thực hiện theo cách có lợi bởi vì (1) việc loại bỏ vỏ não của nó (màng pha lê phía sau) làm thuận tiện cho sự thâm nhập vào võng mạc bằng ống thông dò; (2) việc loại bỏ và thay thế nó bằng dịch lỏng (*ví dụ,* nước muối) tạo ra không gian để điều tiết sự tiêm trong mắt của vectơ, và (3) việc loại bỏ có kiểm soát của nó làm giảm khả năng rách võng mạc và sự bong võng mạc ngoài ý muốn.

Theo một số phương án, hợp phần rAAV được tiêm trực tiếp vào không gian dưới võng mạc bên ngoài võng mạc trung tâm, bằng cách sử dụng ống thông dò có kích thước lỗ thích hợp (*ví dụ,* khổ 27-45), do đó tạo ra mụn trong không gian dưới võng mạc. Theo các phương án khác, việc tiêm dưới võng mạc của hợp phần rAAV được thực hiện sau khi tiêm dưới võng mạc thể tích nhỏ (*ví dụ,* từ khoảng 0,1 đến

khoảng 0,5 ml) của dịch lỏng thích hợp (chẳng hạn như nước muối hoặc dung dịch Ringer) vào không gian dưới võng mạc bên ngoài võng mạc trung tâm. Việc tiêm ban đầu này vào không gian dưới võng mạc thiết lập mụn dịch lỏng ban đầu ở trong không gian dưới võng mạc, gây ra sự bong võng mạc cục bộ ở vị trí của mụn ban đầu. Mụn dịch lỏng ban đầu này có thể làm thuận tiện cho sự chuyển hướng đích của hợp phần rAAV vào không gian dưới võng mạc (bằng cách xác định mặt phẳng tiêm trước khi chuyển rAAV), và làm giảm thiểu sự sử dụng rAAV có thể có cho màng trạch và khả năng dịch tiêm hoặc hồi lưu rAAV đi vào khoang thủy tinh thể. Theo một số phương án, mụn dịch lỏng ban đầu này có thể còn được tiêm với dịch lỏng có chứa một hoặc nhiều hợp phần rAAV và/hoặc một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung bằng cách sử dụng các dịch lỏng này trực tiếp cho mụn dịch lỏng ban đầu bằng cùng một ống thông dò hoặc bằng ống thông dò bổ sung có lỗ khoan nhỏ.

Việc dùng trong mắt của hợp phần rAAV và/hoặc thể tích nhỏ ban đầu của dịch lỏng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng ống thông dò có lỗ khoan nhỏ (*ví dụ,* khổ 27-45) được gắn vào ống tiêm. Theo một số phương án, pittông của ống tiêm này có thể được làm cho hoạt động bằng thiết bị cơ khí hóa, chẳng hạn như bằng cách nhấn bàn đạp chân. Ống thông dò có lỗ khoan nhỏ được đặt trước thông qua phẫu thuật mở củng mạc, ngang qua khoang thủy tinh thể và vào võng mạc ở vị trí định trước ở mỗi đối tượng theo diện tích của võng mạc cần được hướng đích (nhưng ở bên ngoài võng mạc trung tâm). Dưới sự trực quan hóa trực tiếp huyền phù vectơ được tiêm cơ học dưới võng mạc thần kinh cảm giác gây ra sự bong võng mạc cục bộ với sự cắt võng mạc không mở rộng tự lành. Như lưu ý ở trên, hợp phần rAAV có thể được tiêm trực tiếp vào không gian dưới võng mạc tạo ra mụn bên ngoài võng mạc trung tâm hoặc vectơ có thể được tiêm vào mụn ban đầu bên ngoài võng mạc trung tâm, làm cho nó mở rộng (và làm mở rộng diện tích bong võng mạc). Theo một số phương án, sự tiêm hợp phần rAAV được tiếp nối bằng sự tiêm dịch lỏng khác vào mụn.

Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, tốc độ và vị trí của (các) lần tiêm dưới võng mạc có thể dẫn đến lực trượt cục bộ mà có thể làm hỏng điểm vàng, hố thị giác và/hoặc tế bào RPE bên dưới. Sự tiêm dưới võng mạc có thể được thực hiện ở tốc độ mà làm giảm thiểu hoặc tránh được lực trượt. Theo một số phương án, hợp phần rAAV được tiêm trong thời gian khoảng 15-17 phút. Theo một số phương án, vectơ được tiêm trong thời gian khoảng 17-20 phút. Theo một số phương án, hợp phần rAAV được tiêm trong thời gian khoảng 20-22 phút. Theo một số phương án, hợp phần rAAV được tiêm ở tốc độ nằm trong khoảng từ 35 đến khoảng 65 µl/phút. Theo một số phương án, hợp phần rAAV được tiêm ở tốc độ nằm trong khoảng từ 35 µl/phút. Theo một số phương án, hợp phần rAAV được tiêm ở tốc độ nằm trong khoảng từ 40 µl/phút. Theo một số phương án, hợp phần rAAV được tiêm ở tốc độ nằm trong khoảng từ 45 µl/phút. Theo một số phương án, hợp phần rAAV được tiêm ở tốc độ nằm trong khoảng từ 50 µl/phút. Theo một số phương án, hợp phần rAAV được tiêm ở tốc độ nằm trong khoảng từ 55 µl/phút. Theo một số phương án, hợp phần rAAV được tiêm ở tốc độ nằm trong khoảng từ 60 µl/phút. Theo một số phương án, hợp phần rAAV được tiêm ở tốc độ nằm trong khoảng từ 65 µl/phút. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng tốc độ và thời gian tiêm của mụn có thể được định hướng bằng, ví dụ, thể tích của hợp phần rAAV hoặc kích thước của mụn cần để tạo ra sự bong võng mạc đủ để tiếp cận tế bào của võng mạc trung tâm, kích thước của ống thông dò dùng để chuyển hợp phần rAAV, và khả năng để duy trì một cách an toàn vị trí của ống thông dò theo sáng chế.

Theo một số phương án theo sáng chế, thể tích của hợp phần được tiêm vào không gian dưới võng mạc của võng mạc lớn hơn khoảng lượng bất kỳ trong số 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, 5 µl, 6 µl, 7 µl, 8 µl, 9 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl, 25 µl, 50 µl, 75 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 700 µl, 800 µl, 900 µl, hoặc 1 ml, hoặc lượng bất kỳ ở giữa chúng.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước sử dụng cho mắt (*ví dụ,* bằng cách dùng dưới võng mạc và/hoặc trong thủy tinh thể) lượng hữu hiệu của hạt

virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan có chứa vectơ mã hóa cho axit nucleic khác loại. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là ít nhất là khoảng giá trị bất kỳ trong số 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 10×10^{12}, 11×10^{12}, 15×10^{12}, 20×10^{12}, 25×10^{12}, 30×10^{12}, hoặc 50×10^{12} bản sao hệ gen/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là khoảng giá trị bất kỳ trong số từ 5×10^{12} đến 6×10^{12}, từ 6×10^{12} đến 7×10^{12}, từ 7×10^{12} đến 8×10^{12}, từ 8×10^{12} đến 9×10^{12}, từ 9×10^{12} đến 10×10^{12}, từ 10×10^{12} đến 11×10^{12}, từ 11×10^{12} đến 15×10^{12}, từ 15×10^{12} đến 20×10^{12}, từ 20×10^{12} đến 25×10^{12}, từ 25×10^{12} đến 30×10^{12}, từ 30×10^{12} đến 50×10^{12}, hoặc từ 50×10^{12} đến 100×10^{12} bản sao hệ gen/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là khoảng giá trị bất kỳ trong số từ 5×10^{12} đến 10×10^{12}, từ 10×10^{12} đến 25×10^{12}, hoặc từ 25×10^{12} đến 50×10^{12}bản sao hệ gen/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần ít nhất là khoảng giá trị bất kỳ trong số 5×10^{9}, 6×10^{9}, 7×10^{9}, 8×10^{9}, 9×10^{9}, 10×10^{9}, 11×10^{9}, 15×10^{9}, 20×10^{9}, 25×10^{9}, 30×10^{9}, hoặc 50×10^{9} đơn vị chuyển nạp /ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là khoảng giá trị bất kỳ trong số từ 5×10^{9} đến 6×10^{9}, từ 6×10^{9} đến 7×10^{9}, từ 7×10^{9} đến 8×10^{9}, từ 8×10^{9} đến 9×10^{9}, từ 9×10^{9} đến 10×10^{9}, từ 10×10^{9} đến 11×10^{9}, từ 11×10^{9} đến 15×10^{9}, từ 15×10^{9} đến 20×10^{9}, từ 20×10^{9} đến 25×10^{9}, từ 25×10^{9} đến 30×10^{9}, từ 30×10^{9} đến 50×10^{9} hoặc từ 50×10^{9} đến 100×10^{9} đơn vị chuyển nạp /ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là khoảng giá trị bất kỳ trong số 5×10^{9} đến 10×10^{9}, từ 10×10^{9} đến 15×10^{9}, từ 15×10^{9} đến 25×10^{9}, hoặc từ 25×10^{9} đến 50×10^{9} đơn vị chuyển nạp /ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần ít nhất là giá trị bất kỳ bằng từ khoảng 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 10×10^{10}, 11×10^{10}, 15×10^{10}, 20×10^{10}, 25×10^{10}, 30×10^{10}, 40×10^{10}, hoặc 50×10^{10} đơn vị gây nhiễm/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần ít nhất là giá trị bất kỳ nằm trongkhoảng từ 5×10^{10} đến 6×10^{10}, từ 6×10^{10} đến 7×10^{10}, từ 7×10^{10} đến 8×10^{10}, từ 8×10^{10} đến 9×10^{10}, từ 9×10^{10} đến 10×10^{10}, từ 10×10^{10} đến 11×10^{10}, từ 11×10^{10} đến 15×10^{10}, từ 15×10^{10} đến 20×10^{10}, từ 20×10^{10} đến

25×10^{10}, từ 25×10^{10} đến 30×10^{10}, từ 30×10^{10} đến 40×10^{10}, từ 40×10^{10} đến 50×10^{10}, hoặc từ 50×10^{10} đến 100×10^{10} đơn vị gây nhiễm/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần ít nhất là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 5×10^{10} đến 10×10^{10}, từ 10×10^{10} đến 15×10^{10}, từ 15×10^{10} đến 25×10^{10}, hoặc từ 25×10^{10} đến 50×10^{10} đơn vị gây nhiễm/ml.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước sử dụng cho mắt (*ví dụ,* bằng cách dùng dưới võng mạc và/hoặc trong thủy tinh thể) của cá thể (*ví dụ*, người) lượng hữu hiệu của hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, liều lượng của hạt virut được sử dụng cho cá thể ít nhất là khoảng giá trị bất kỳ trong số từ 1×10^8 đến khoảng 1×10^{13} bản sao hệ gen/kg khối lượng cơ thể. Theo một số phương án, liều lượng của hạt virut được sử dụng cho cá thể là khoảng giá trị bất kỳ trong số từ 1×10^8 đến khoảng 1×10^{13} bản sao hệ gen/kg khối lượng cơ thể.

Một hoặc nhiều (*ví dụ,* 2, 3, hoặc nhiều hơn) mụn có thể được tạo ra. Nhìn chung, tổng thể tích của mụn hoặc mụn được tạo ra bằng các phương pháp và hệ thống theo sáng chế không thể vượt quá thể tích dịch lỏng của mắt, ví dụ khoảng 4 ml ở đối tượng người bình thường. Tổng thể tích của mỗi mụn cụ thể có thể ít nhất là khoảng 0,3 ml, hoặc ít nhất là khoảng 0,5 ml để làm thuận tiện cho sự bong võng mạc có kích thước đủ để bộc lộ loại tế bào của võng mạc trung tâm và tạo ra mụn có sự phụ thuộc đủ đối với thao tác tối ưu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng khi tạo ra mụn theo các phương pháp và hệ thống theo sáng chế thì áp suất trong mắt thích hợp phải được duy trì để tránh sự hư hại đối với cấu trúc mắt. Kích thước của mỗi mụn cụ thể có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ khoảng 0,5 đến khoảng 1,2 ml, từ khoảng 0,8 đến khoảng 1,2 ml, từ khoảng 0,9 đến khoảng 1,2 ml, từ khoảng 0,9 đến khoảng 1,0 ml, từ khoảng 1,0 đến khoảng 2,0 ml, từ khoảng 1,0 đến khoảng 3,0 ml. Do đó, trong một ví dụ, để tiêm tổng cộng 3 ml huyền phù hợp phần rAAV, 3 mụn có khoảng 1 ml mỗi mụn có thể được thiết lập. Tổng thể tích của

tất cả các mụn kết hợp với nhau có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ khoảng 0,5 đến khoảng 3,0 ml, từ khoảng 0,8 đến khoảng 3,0 ml, từ khoảng 0,9 đến khoảng 3,0 ml, từ khoảng 1,0 đến khoảng 3,0 ml, từ khoảng 0,5 đến khoảng 1,5 ml, từ khoảng 0,5 đến khoảng 1,2 ml, từ khoảng 0,9 đến khoảng 3,0 ml, từ khoảng 0,9 đến khoảng 2,0 ml, từ khoảng 0,9 đến khoảng 1,0 ml.

Để chuyển nạp an toàn và hiệu quả cho diện tích của võng mạc đích (*ví dụ,* võng mạc trung tâm) bên ngoài rìa của vị trí gốc của mụn, mụn có thể được thao tác để định vị lại mụn vào diện tích đích để chuyển nạp. Việc thao tác mụn có thể diễn ra bởi sự phụ thuộc của mụn mà được tạo ra bởi thể tích của mụn, việc tái định vị của mắt chứa mụn, việc tái định vị của đầu của người có mắt này hoặc mắt chứa một hoặc nhiều mụn, và/hoặc bằng cách trao đổi dịch lỏng-không khí. Điều này có liên quan đặc biệt với võng mạc trung tâm vì diệ tích này thường ngăn cản sự tách ra bằng cách tiêm dưới võng mạc. Theo một số phương án sự trao đổi dịch lỏng-không khí được sử dụng để định vị lại mụn; dịch lỏng từ ống thông dò truyền được thay thế tạm thời bằng không khí, *ví dụ,* từ không khí thổi trên bề mặt của võng mạc. Vì thể tích của không khí chiếm chỗ dịch lỏng khoang thủy tinh thể từ bề mặt của võng mạc, dịch lỏng trong khoang thủy tinh có thể chảy ra ngoài ống thông dò. Sự thiếu áp suất tạm thời từ dịch lỏng khoang thủy tinh thể làm cho mụn di chuyển và đổ vào phần phụ thuộc của mắt. Bằng cách định vị cầu mắt một cách thích hợp, mụn của hợp phần rAAV dưới võng mạc được thao tác để bao gồm các diện tích liền kề (*ví dụ,* điểm vàng và/hoặc hố thị giác). Trong một số trường hợp, khối lượng của mụn là đủ để làm cho nó đổ vào, ngay cả khi không sử dụng sự trao đổi dịch lỏng-không khí. Sự chi chuyển của mụn vào mong muốn vị trí có thể còn được làm thuận tiện bằng cách làm thay đổi vị trí của đầu đối tượng, sao cho cho phép mụn đổ vào vị trí mong muốn trong mắt. Ngay khi đạt được cấu hình mong muốn của mụn, dịch lỏng được đưa trở lại khoang thủy tinh thể. Dịch lỏng là dịch lỏng thích hợp, *ví dụ*, nước muối sạch. Nhìn chung, hợp phần rAAV dưới võng mạc có thể được để in situ mà không cần khí nén retinopexy vào phẫu thuật cắt võng mạc và không cần nhét nút thấm trong mắt, và võng mạc sẽ tự động gắn lại trong khoảng 48 giờ.

Bằng cách chuyển nạp an toàn và hiệu quả tế bào mắt (*ví dụ,* RPE và/hoặc tế bào nhận kích thích ánh sáng *ví dụ,* điểm vàng và/hoặc hố thị giác) bằng vectơ có chứa trình tự polypeptit hoặc ARN trị liệu, các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị cá thể; *ví dụ*, người, có rối loạn ở mắt, trong đó tế bào được chuyển nạp sản xuất ra trình tự polypeptit hoặc ARN trị liệu ở lượng đủ để điều trị rối loạn ở mắt. Theo một số phương án, sự chuyển nạp của tế bào mắt được cải thiện bằng cách sử dụng hạt rAAV (*ví dụ*, hạt rAAV2, rAAVrh8R, *v.v.*) có chứa protein capsit AAV có chứa một hoặc nhiều sự thế của các axit amin mà tương tác với HSPG (*ví dụ*, ức chế hoặc loại bỏ sự liên kết với HSPG). Theo một số phương án, hạt rAAV chứng tỏ sự liên kết giảm với HSPG; *ví dụ*, được làm giảm nhiều hơn khoảng 10%, 25%, 50%, 75%, 100% hoặc số bất kỳ ở giữa chúng. Theo một số phương án, sự liên kết rAAV với HSPG được làm giảm bằng từ khoảng 5% đến khoảng 100%, bằng từ khoảng 10% đến khoảng 50%, bằng từ khoảng 10% đến khoảng 30%, bằng từ khoảng 25% đến khoảng 75%, bằng từ khoảng 25% đến khoảng 50%, hoặc bằng từ khoảng 30% đến khoảng 50%.

Lượng hữu hiệu của rAAV (theo một số phương án ở dạng hạt) được sử dụng, tùy thuộc vào mục đích của việc điều trị. Ví dụ, khi tỷ lệ phần trăm thấp của sự chuyển nạp có thể đạt được hiệu quả trị liệu mong muốn, thì mục đích của việc điều trị thường là đạt được hoặc vượt quá mức độ chuyển nạp này. Trong một số trường hợp, mức độ chuyển nạp có thể đạt được bằng sự chuyển nạp của chỉ khoảng từ 1 đến 5% tế bào đích, theo một số phương án ít nhất là khoảng 20% tế bào thuộc loại mô mong muốn, theo một số phương án ít nhất là khoảng 50%, theo một số phương án ít nhất là khoảng 80%, theo một số phương án ít nhất là khoảng 95%, theo một số phương án ít nhất là khoảng 99% của tế bào thuộc loại mô mong muốn. Như thảo luận ở trên, sự thế của một hoặc nhiều axit amin của capsit rAAV mà tương tác với HSPG làm cải thiện sự chuyển nạp rAAV. Theo hướng dẫn, số lượng hạt được sử dụng trong mỗi lần tiêm thường nằm trong khoảng từ khoảng $1x10^6$ đến khoảng $1x10^{14}$ hạt, từ khoảng $1x10^7$ đến $1x10^{13}$ hạt, từ khoảng $1x10^9$ đến $1x10^{12}$ hạt hoặc khoảng $1x10^{11}$ hạt. Hợp phần rAAV có thể được sử dụng bằng một hoặc nhiều lần

tiêm dưới võng mạc, trong cùng một quy trình hoặc cách quãng một số ngày, tuần, tháng, hoặc năm. Theo một số phương án, nhiều vectơ có thể được sử dụng để điều trị người.

Theo một số phương án, việc sử dụng cho võng mạc của lượng hữu hiệu của hạt virut rAAV có chứa capsit rAAV có một hoặc nhiều sự thế của các axit amin mà tương tác với HSPG gây chuyển nạp cho tế bào nhận kích thích ánh sáng ở hoặc ở gần vị trí dùng. Theo một số phương án, nhiều hơn khoảng bất kỳ trong số 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% hoặc 100% tế bào nhận kích thích ánh sáng được tải nạp. Theo một số phương án, từ khoảng 5% đến khoảng 100%, từ khoảng 10% đến khoảng 50%, từ khoảng 10% đến khoảng 30%, từ khoảng 25% đến khoảng 75%, từ khoảng 25% đến khoảng 50%, hoặc từ khoảng 30% đến khoảng 50% tế bào nhận kích thích ánh sáng được tải nạp. Phương pháp để xác định tế bào nhận kích thích ánh sáng được chuyển nạp bởi hạt virut AAV có chứa capsit rAAV có một hoặc nhiều sự thế của các axit amin mà tương tác với HSPG là đã biết trong lĩnh vực; ví dụ, hóa mô miễn dịch hoặc sử dụng thành phần đánh dấu chẳng hạn như protein huỳnh quang xanh lá cây tăng cường có thể được sử dụng để phát hiện sự chuyển nạp của hạt virut có chứa capsit rAAV có một hoặc nhiều sự thế của các axit amin mà tương tác với HSPG.

Theo một số phương án theo sáng chế, phương pháp bao gồm bước sử dụng cho dưới võng mạc (*ví dụ*, không gian dưới võng mạc) của động vật có vú lượng hữu hiệu của hạt virut AAV hạt virut có chứa capsit rAAV có một hoặc nhiều sự thế của các axit amin mà tương tác với HSPG để điều trị cá thể mắc rối loạn ở mắt; *ví dụ*, người mắc rối loạn ở mắt. Theo một số phương án, hợp phần được tiêm vào một hoặc nhiều vị trí ở dưới võng mạc để cho phép sự biểu hiện của axit nucleic khác loại ở tế bào nhận kích thích ánh sáng. Theo một số phương án, hợp phần được tiêm vào vị trí bất kỳ trong số một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bẩy, tám, chín, mười hoặc nhiều hơn mười vị trí ở dưới võng mạc.

Theo một số phương án hạt virut rAAV có chứa capsit rAAV có một hoặc nhiều sự thế của các axit amin mà tương tác với HSPG được sử dụng cho nhiều hơn một vị trí đồng thời hoặc tuần tự. Theo một số phương án, nhiều lần tiêm hạt virut rAAV cách nhau không nhiều hơn một giờ, hai giờ, ba giờ, bốn giờ, năm giờ, sáu giờ, chín giờ, mười hai giờ hoặc 24 giờ.

Các phương pháp tiêm trong thủy tinh thể

Phương pháp chung để tiêm trong thủy tinh thể có thể được minh họa bằng mô tả vắn tắt sau đây. Ví dụ này chỉ để minh họa các đặc điểm nhất định của phương pháp, và không nhằm làm giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào. Quy trình để tiêm trong thủy tinh thể là đã biết trong lĩnh vực (xem tài liệu, *ví dụ*, Peyman, G.A., *et al.* (2009) *Retina* 29(7):875-912 and Fagan, X.J. and Al-Qureshi, S. (2013) *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 41(5):500-7).

Tóm lại, đối tượng để tiêm trong thủy tinh thể có thể được chuẩn bị cho quy trình bằng cách giãn đồng tử, tiệt trùng mắt, và dùng thuốc gây mê. Chất làm giãn đồng tử thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng để làm giãn đồng tử. Sự giãn đồng tử đủ có thể được xác nhận trước khi điều trị. Sự tiệt trùng có thể đạt được bằng cách áp dụng việc xử lý mắt tiệt trùng, *ví dụ*, dung dịch chứa iôt chẳng hạn như Poviđon-Iođua (BETADINE®). Dung dịch tương tự cũng có thể được sử dụng để làm sạch mí mắt, lông mi, và mô bên cạnh khác bất kỳ (*ví dụ*, da). Thuốc gây mê thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng, chẳng hạn như liđocain hoặc proparacain, ở nồng độ thích hợp bất kỳ. Thuốc gây mê có thể được sử dụng bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở dùng thuốc gây mê bằng giọt tại chỗ, gel hoặc chất đông, và dưới kết mạc.

Trước khi tiêm, banh mí mắt đã tiệt trùng có thể được sử dụng để làm sạch lông mi ra khỏi diện tích. Vị trí tiêm có thể được đánh dấu bằng ống tiêm. Vị trí tiêm có thể được chọn dựa trên thấu kính của bệnh nhân. Ví dụ, vị trí tiêm có thể là 3-3,5 mm từ rìa ở bệnh nhân thể thủy tinh giả hoặc thiếu thể thủy tinh, và 3,5-4 mm từ rìa ở

bệnh nhân còn thể thủy tinh. Bệnh nhân có thể nhìn theo hướng đối diện với vị trí tiêm.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước sử dụng cho mắt (*ví dụ,* bằng cách dùng dưới võng mạc và/hoặc trong thủy tinh thể) lượng hữu hiệu của hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan có chứa vectơ mã hóa cho axit nucleic khác loại. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là ít nhất là khoảng giá trị bất kỳ trong số 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 10×10^{12}, 11×10^{12}, 15×10^{12}, 20×10^{12}, 25×10^{12}, 30×10^{12}, hoặc 50×10^{12} bản sao hệ gen/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là khoảng giá trị bất kỳ trong số 5×10^{12} đến 6×10^{12}, từ 6×10^{12} đến 7×10^{12}, từ 7×10^{12} đến 8×10^{12}, từ 8×10^{12} đến 9×10^{12}, từ 9×10^{12} đến 10×10^{12}, từ 10×10^{12} đến 11×10^{12}, từ 11×10^{12} đến 15×10^{12}, từ 15×10^{12} đến 20×10^{12}, từ 20×10^{12} đến 25×10^{12}, từ 25×10^{12} đến 30×10^{12}, từ 30×10^{12} đến 50×10^{12}, hoặc từ 50×10^{12} đến 100×10^{12} bản sao hệ gen/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là khoảng giá trị bất kỳ trong số từ 5×10^{12} đến 10×10^{12}, từ 10×10^{12} đến 25×10^{12}, hoặc từ 25×10^{12} đến 50×10^{12}bản sao hệ gen/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần ít nhất là khoảng giá trị bất kỳ trong số 5×10^{9}, 6×10^{9}, 7×10^{9}, 8×10^{9}, 9×10^{9}, 10×10^{9}, 11×10^{9}, 15×10^{9}, 20×10^{9}, 25×10^{9}, 30×10^{9}, hoặc 50×10^{9} đơn vị chuyển nạp /ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là khoảng giá trị bất kỳ trong số từ 5×10^{9} đến 6×10^{9}, từ 6×10^{9} đến 7×10^{9}, từ 7×10^{9} đến 8×10^{9}, từ 8×10^{9} đến 9×10^{9}, từ 9×10^{9} đến 10×10^{9}, từ 10×10^{9} đến 11×10^{9}, từ 11×10^{9} đến 15×10^{9}, từ 15×10^{9} đến 20×10^{9}, từ 20×10^{9} đến 25×10^{9}, từ 25×10^{9} đến 30×10^{9}, từ 30×10^{9} đến 50×10^{9} hoặc từ 50×10^{9} đến 100×10^{9} đơn vị chuyển nạp /ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là khoảng giá trị bất kỳ trong số 5×10^{9} đến 10×10^{9}, từ 10×10^{9} đến 15×10^{9}, từ 15×10^{9} đến 25×10^{9}, hoặc từ 25×10^{9} đến 50×10^{9} đơn vị chuyển nạp /ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần ít nhất là giá trị bất kỳ bằng khoảng 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 10×10^{10}, 11×10^{10}, 15×10^{10}, 20×10^{10}, 25×10^{10}, 30×10^{10}, 40×10^{10}, hoặc 50×10^{10} đơn vị gây

nhiễm/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần ít nhất là giá trị bất kỳ nằm trongkhoảng từ 5×10^{10} đến 6×10^{10}, từ 6×10^{10} đến 7×10^{10}, từ 7×10^{10} đến 8×10^{10}, từ 8×10^{10} đến 9×10^{10}, từ 9×10^{10} đến 10×10^{10}, từ 10×10^{10} đến 11×10^{10}, từ 11×10^{10} đến 15×10^{10}, từ 15×10^{10} đến 20×10^{10}, từ 20×10^{10} đến 25×10^{10}, từ 25×10^{10} đến 30×10^{10}, từ 30×10^{10} đến 40×10^{10}, từ 40×10^{10} đến 50×10^{10}, hoặc từ 50×10^{10} đến 100×10^{10} đơn vị gây nhiễm/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần ít nhất là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 5×10^{10} đến 10×10^{10}, từ 10×10^{10} đến 15×10^{10}, từ 15×10^{10} đến 25×10^{10}, hoặc từ 25×10^{10} đến 50×10^{10} đơn vị gây nhiễm/ml.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước sử dụng cho mắt (*ví dụ,* bằng cách dùng dưới võng mạc và/hoặc trong thủy tinh thể) của cá thể (*ví dụ*, người) lượng hữu hiệu của hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, liều lượng của hạt virut được sử dụng cho cá thể ít nhất là khoảng giá trị bất kỳ trong số từ 1×10^8 đến khoảng 1×10^{13} bản sao hệ gen/kg khối lượng cơ thể. Theo một số phương án, liều lượng của hạt virut được sử dụng cho cá thể là khoảng giá trị bất kỳ trong số từ 1×10^8 đến khoảng 1×10^{13} bản sao hệ gen/kg khối lượng cơ thể.

Trong quá trình tiêm, kim có thể được đâm vuông góc vào màng cứng và chỉ vào tâm của mắt. Kim có thể được đâm sao cho đầu nhọn ở trong thủy tinh thể, chứ không phải là không gian dưới võng mạc. Thể tích thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực để tiêm có thể được sử dụng. Sau khi tiêm, mắt có thể được xử lý bằng chất tiệt trùng chẳng hạn như chất kháng sinh. Mắt có thể còn được rửa để loại bỏ chất tiệt trùng dư.

Cấu trúc của võng mạc và phương thức để xác định tính hiệu quả của chuyển rAAV

Võng mạc đã được biết là có chứa nhiều lớp. Các lớp tế bào ở võng mạc có thể bao gồm màng giới hạn bên trong, lớp sợi thần kinh, lớp tế bào hạch, lớp rối bên

trong, lớp nhân bên trong, lớp rối bên ngoài, lớp nhân bên ngoài, màng giới hạn ngoài, lớp tế bào nhận kích thích ánh sáng, và lớp biểu mô sắc tố võng mạc. Lớp ở gần thủy tinh thể nhất là màng giới hạn bên trong. Lớp này có thể chứa tế bào Müller, nhóm tế bào thần kinh đệm. Lớp sợi thần kinh có thể chứa axon từ tế bào hạch mà tạo thành thần kinh thị giác. Lớp tế bào hạch có thể bao gồm tế bào hạch và tế bào không có sợi nhánh. Lớp rối bên trong có thể chứa xi náp ở giữa các nhánh của hạch và tế bào không có sợi nhánh và axon của tế bào lưỡng cực. Lớp nhân bên trong có thể chứa nhân tế bào của tế bào không có sợi nhánh, tế bào lưỡng cực, và tế bào ngang. Lớp rối bên ngoài có thể chứa xi náp ở giữa các nhánh tế bào ngang và chỗ nhô ra của tế bào nhận kích thích ánh sáng. Lớp nhân bên ngoài có thể chứa thân tế bào nhận kích thích ánh sáng. Màng giới hạn bên ngoài hoặc phía ngoài có thể bao gồm chỗ nối tế bào, chẳng hạn như chỗ tiếp giáp dính và thể liên kết, giữa các quy trình đỉnh tế bào Müller và giữa các quy trình này và mảnh bên trong tế bào nhận kích thích ánh sáng. Lớp thụ thể nhận kích thích ánh sáng, còn được gọi là lớp của tế bào hình que và tế bào hình nón và màng Jacob, có thể chứa tế bào nhận kích thích ánh sáng bao gồm tế bào hình que và tế bào hình nón. Lớp võng mạc ở xa thủy tinh thể nhất là biểu mô sắc tố võng mạc (RPE), mà có thể bao gồm lớp tế bào biểu mô hình lục giác chứa các hạt sắc tố.

Võng mạc cũng đã được biết là chứa nhiều loại tế bào khác nhau. Nơron võng mạc có thể bao gồm tế bào nhận kích thích ánh sáng, tế bào lưỡng cực, tế bào hạch, tế bào không có sợi nhánh, và tế bào ngang. Tế bào nhận kích thích ánh sáng nhạy cảm với ánh sáng. Chúng có thể cảm nhận ánh sáng và đáp ứng bằng cách truyền tí hiệu về thần kinh thị giác thông qua tế bào lưỡng cực và tế bào hạch. Tế bào nhận kích thích ánh sáng có thể bao gồm tế bào hình que, mà thường cảm nhận ánh sáng trong điều kiện ánh sáng yếu, và tế bào hình nón, mà thường cảm nhận màu sắc và và ánh sáng mạnh hơn. Tế bào lưỡng cực có thể tiếp nhận đầu vào từ tế bào nhận kích thích ánh sáng và xi náp lên tế bào không có sợi nhánh hoặc tế bào hạch. Tế bào hạch có thể tiếp nhận thông tin từ tế bào không có sợi nhánh hoặc tế bào ngang, và các axon tạo thành thần kinh thị giác. Tế bào ngang có thể hợp nhất đầu vào từ nhiều tế bào

tiếp nhận kích thích ánh sáng và hỗ trợ đánh giá mức độ ánh sáng. Tế bào không có sợi nhánh là nơron trung gian mà giúp điều hòa tế bào lưỡng cực và tạo ra đầu vào cho tế bào hạch. Tế bào thần kinh đệm của võng mạc có thể bao gồm tế bào Müller, tế bào hình sao thần kinh đệm, và tiểu thần kinh đệm.

Tính hiệu quả của việc chuyển rAAV bằng cách tiêm dưới võng mạc hoặc trong thủy tinh thể có thể được kiểm soát bằng một vài tiêu chuẩn như được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, sau khi điều trị cho đối tượng bằng cách sử dụng các phương pháp theo sáng chế, đối tượng có thể được đánh giá về *ví dụ,* sự cải thiện và/hoặc sự làm ổn định và/hoặc sự trễ trong sự tiến triển của một hoặc nhiều dấu hiệu hoặc triệu chứng của tình trạng bệnh bằng một hoặc nhiều tham số lâm sàng bao gồm các tham số được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ về các thử nghiệm này là đã biết trong lĩnh vực, và bao gồm các phép đo khách quan cũng như là chủ quan (*ví dụ,* đối tượng được báo cáo). Ví dụ, để đo tính hiệu quả của việc điều trị lên thị lực của đối tượng, một hoặc nhiều tham số sau đây có thể được đánh giá: chất lượng chủ quan của đối tượng của thị lực hoặc chức năng nhìn trung tâm được cải thiện (*ví dụ,* sự cải thiện ở khả năng của đối tượng để đọc trôi chảy và nhận biết gương mặt), khả năng nhìn linh hoạt của đối tượng (*ví dụ,* giảm thời gian cần để định hướng mê cung), thị lực (*ví dụ,* sự cải thiện ở điểm LogMAR của đối tượng), vi đo thị trường (*ví dụ,* sự cải thiện ở điểm dB của đối tượng), đo thị trường thích nghi tối (*ví dụ,* sự cải thiện ở điểm dB của đối tượng), lập bản đồ ma trận tinh vi (*ví dụ,* sự cải thiện ở điểm dB của đối tượng), sự đo thị trường Goldmann (*ví dụ,* kích thước giảm của diện tích điểm tối (*tức là* diện tích của điểm mù) và sự cải thiện khả năng phân tích các đích nhỏ hơn), độ nhạy ánh sáng lấp lánh (*ví dụ,* sự cải thiện ở Hertz), số đo tự phát huỳnh quang, và số đo điện sinh lý học (*ví dụ,* sự cải thiện ở ERG). Theo một số phương án, thị lực được đo bằng khả năng nhìn linh hoạt của đối tượng. Theo một số phương án, thị lực được đo bằng thị lực của đối tượng. Theo một số phương án, thị lực được đo bằng vi đo thị trường. Theo một số phương án, thị lực được đo bằng đo thị trường thích nghi tối. Theo một số phương án, thị lực được đo bằng ERG. Theo một số phương án, thị lực được đo bằng chất lượng chủ quan của thị lực của đối tượng.

Trong trường hợp của các bệnh dẫn đến thị lực thoái biến tiến triển, điều trị đối tượng ở tuổi còn trẻ có thể không chỉ dẫn đến việc làm chậm hoặc làm tạm dừng sự tiến triển của bệnh, nó còn có thể cải thiện hoặc ngăn chặn việc mất thị lực do chứng giảm thị lực mắc phải. Chứng giảm thị lực có thể thuộc một trong hai loại. Trong các nghiên cứu ở động vật linh trưởng không phải người và mèo mà được nuôi trong bóng tối hoàn toàn từ khi sinh ra đến một vài tháng tuổi tháng, sau đó khi được tiếp xúc với ánh sáng các con vật thậm chí bị mù không thể phục hồi chức năng mặc dù có tín hiệu chức năng do võng mạc gửi đi. Chứng mù này xảy ra bởi vì sự kết nối thần kinh và "sự giáo dục" của vỏ não bị ngừng phát triển từ khi sinh ra do sự ngừng kích thích. Chưa biết rằng liệu chức năng này có thể từng được phục hồi hay chưa. Trong trường hợp của các bệnh thoái hóa võng mạc, hệ mạch vỏ não thị giác bình thường "được học tập" từ đầu hoặc phát triển thích hợp đếnthời điểm mà sự thoái hóa gây ra dự mất chức năng đáng kể. Sự mất kích thích thị giác theo quan điểm tạo tín hiệu ở mắt mất chức năng tạo ra sự mất chức năng "mắc phải" hoặc "học được" ("chứng giảm thị lực mắc phải"), dẫn đến sự mất khả năng hiểu tín hiệu, hoặc "sử dụng" mắt đó của não. Chưa biết là trong các trường hợp này của "chứng giảm thị lực mắc phải" với việc truyền tín hiệu được cải thiện từ võng mạc dưới dạng kết quả của liệu pháp gen của mắt bị giảm thị lực có thể dẫn đến sự tăng lên của nhiều chức năng bình thường ngoài việc làm chậm tiến triển hoặc làm ổn định tình trạng bệnh hay không. Theo một số phương án, người được điều trị nhỏ hơn 30 tuổi. Theo một số phương án, người được điều trị nhỏ hơn 20 tuổi. Theo một số phương án, người được điều trị nhỏ hơn 18 tuổi. Theo một số phương án, người được điều trị nhỏ hơn 15 tuổi. Theo một số phương án, người được điều trị nhỏ hơn 14 tuổi. Theo một số phương án, người được điều trị nhỏ hơn 13 tuổi. Theo một số phương án, người được điều trị nhỏ hơn 12 tuổi. Theo một số phương án, người được điều trị nhỏ hơn 10 tuổi. Theo một số phương án, người được điều trị nhỏ hơn 8 tuổi. Theo một số phương án, người được điều trị nhỏ hơn 6 tuổi.

Trong một số rối loạn ở mắt, có hiện tượng "tế bào nuôi", mà cải thiện chức năng của một loại tế bào làm cải thiện chức năng của tế bào khác. Ví dụ, sự chuyển

nạp của RPE của võng mạc trung tâm bằng rAAV theo sáng chế sau đó có thể cải thiện chức năng của tế bào hình que, và đến lượt nó, chức năng tế bào hình que được cải thiện dẫn đến chức năng tế bào hình nón được cải thiện. Theo đó, việc điều trị một loại tế bào có thể dẫn đến cải thiện chức năng của tế bào khác.

Việc lựa chọn vectơ và hợp phần rAAV cụ thể phụ thuộc vào một số yếu tố khác nhau, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tiền sử y tế của cá thể người và đặc điểm của tình trạng bệnh và cá thể cần điều trị. Việc đánh giá các đặc điểm này và thiết kế chế độ trị liệu thích hợp là trách nhiệm cuối cùng của bác sĩ kê đơn.

Theo một số phương án, người cần điều trị có rối loạn di truyền ở mắt, nhưng vẫn chưa có các dấu hiệu hoặc các triệu chứng lâm sàng biểu lộ ra. Theo một số phương án, người cần điều trị có rối loạn ở mắt. Theo một số phương án, người cần điều trị có một hoặc nhiều dấu hiệu hoặc triệu chứng đã được biểu lộ của rối loạn ở mắt.

Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế của rối loạn ở mắt mà có thể được điều trị bằng hệ thống và phương pháp theo sáng chế bao gồm: bệnh thoái hóa võng mạc khởi phát sớm nặng do gen lặn trên nhiễm sắc thể thường (bệnh mù lòa bẩm sinh Leber), chứng mù màu bẩm sinh, bệnh Stargardt, bệnh Best, bệnh Doyne, chứng loạn dưỡng nón, viêm võng mạc sắc tố, võng mạc tách bẩm sinh di truyền liên kết trên nhiễm sắc thể X, hội chứng Usher, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác teo, AMD tạo mạch mới, thoái hóa điểm vàng do tiểu đường, bệnh võng mạc tiểu đường tăng sinh (PDR), phù thũng điểm vàng trong mắt, bệnh hắc võng mạc trung tâm thanh dịch, sự bong võng mạc, viêm bên trong mắt, bệnh glôcôm, viêm màng mạch nho phía sau, thoái hóa màng trạch di truyền, và bệnh thần kinh thị giác di truyền Leber.

Hợp phần theo sáng chế (*ví dụ*, hạt virut AAV để chuyển dưới võng mạc hoặc trong thủy tinh thể có chứa capsit AAV có một hoặc nhiều sự thế của các axit amin mà tương tác với HSPG hoặc ở một hoặc nhiều vị trí tương ứng với các axit amin 484, 487, 532, 585 hoặc 588) có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một

hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung để điều trị rối loạn ở mắt. Khoảng thời gian giữa các lần sử dụng liên tiếp có thể ít nhất là (hoặc, theo cách khác, ít hơn) vài phút, vài giờ, hoặc vài ngày.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung có thể được sử dụng cho dưới võng mạc hoặc thủy tinh thể (*ví dụ,* thông qua việc dùng trong thủy tinh thể). Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế của chất trị liệu bổ sung bao gồm yếu tố dinh dưỡng thần kinh polypeptit (*ví dụ,* GDNF, CNTF, BDNF, FGF2, PEDF, EPO), yếu tố chống tạo mạch polypeptit (*ví dụ,* sFlt, angiostatin, Enđostatin), axit nucleic chống tạo mạch (*ví dụ*, siARN, miARN, ribozym), ví dụ axit nucleic chống tạo mạch chống lại VEGF, morpholino chống tạo mạch, ví dụ morpholino chống tạo mạch chống lại VEGF, kháng thể chống tạo mạch và/hoặc mảng kháng thể (*ví dụ,* mảnh Fab), ví dụ kháng thể chống tạo mạch và/hoặc mảng kháng thể chống lại VEGF.

Phương pháp chuyển CNS

Theo một số phương án, việc sử dụng của lượng hữu hiệu của hạt virut tái tổ hợp (*ví dụ*, hạt AAV2, AAVrh8R, *v.v.*) có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan theo sáng chế gây chuyển nạp cho nơron (*ví dụ,* thể vân nơron, chẳng hạn như nơron có gai) ở hoặc ở gần vị trí dùng. Theo một số phương án, nhiều hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% hoặc 100% nơron được chuyển nạp. Theo một số phương án, từ khoảng 5% đến khoảng 100%, từ khoảng 10% đến khoảng 50%, từ khoảng 10% đến khoảng 30%, từ khoảng 25% đến khoảng 75%, từ khoảng 25% đến khoảng 50%, hoặc khoảng 30% đến khoảng 50% của nơron được chuyển nạp. Các phương pháp để xác định nơron được chuyển nạp bởi hạt virut tái tổ hợp biểu hiện axit nucleic khác loại là đã biết trong lĩnh vực; ví dụ, hóa mô miễn dịch, phát hiện ARN (*ví dụ,* qPCR, thẩm tách Northern, đọc trình tự ARN, lai hóa in situ, và phương pháp tương tự) hoặc sử dụng thành phần

đánh dấu được đồng biểu hiện chẳng hạn như protein huỳnh quang xanh lá cây tăng cường có thể được sử dụng để phát hiện sự biểu hiện.

Theo một số phương án theo sáng chế, phương pháp bao gồm bước sử dụng cho não của động vật có vú lượng hữu hiệu của hạt virut tái tổ hợp hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan theo sáng chế để điều trị động vật có vú, *ví dụ*, người. Theo một số phương án, hợp phần được tiêm vào một hoặc nhiều vị trí trong não để cho phép biểu hiện axit nucleic khác loại theo sáng chế ở ít nhất là nơron. Theo một số phương án, hợp phần được tiêm vào vị trí bất kỳ trong số một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bẩy, tám, chín, mười hoặc nhiều hơn mười vị trí trong não. Theo một số phương án, hợp phần được tiêm vào thể vân. Theo một số phương án, hợp phần được tiêm vào thể vân lưng. Theo một số phương án, hợp phần được tiêm vào hạch. Theo một số phương án, hợp phần được tiêm vào nhân đuôi. Theo một số phương án, hợp phần được tiêm vào hạch và vào nhân đuôi. Theo một số phương án, hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan được sử dụng cho CNS của cá thể bằng cách tiêm vào vị trí xác định trong không gian, ví dụ vào thể vân. Theo một số phương án, hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan được sử dụng cho CNS của cá thể bằng cách chuyển tăng cường đối lưu (CED); ví dụ CED vào thể vân.

Việc dùng hạt rAAV có thể được tiến hành qua nhiều đường. Theo một số phương án, việc sử dụng bao gồm tiêm trực tiếp vào tủy sống và/hoặc sử dụng trong não. Theo một số phương án, việc sử dụng là ở vị trí được chọn từ não, hành tủy, cầu não, tiểu não, khoang trong sọ, màng não xung quanh não, màng cứng, màng nhện, màng mềm, dịch não tủy (CSF) của không gian dưới màng nhện xung quanh não, nhân tiểu não sâu của tiểu não, hệ thống não thất của não, không gian dưới màng nhện, thể vân, vỏ não, vách ngăn, đồi não, vùng dưới đồi, và nhu mô của não. Theo một số phương án, việc sử dụng gồm có tiêm trong não thất vào ít nhất là một não

thất bên. Theo một số phương án, việc sử dụng gồm có tiêm nội tủy mạc trong vùng cổ, ngực, và/hoặc thắt lưng. Theo một số phương án, việc sử dụng gồm có tiêm trong thể vân. Theo một số phương án, việc sử dụng gồm có tiêm trong đồi. Các kỹ thuật và dụng cụ khác nhau thích hợp đối với các đường dùng này được mô tả trong bản mô tả này, *ví dụ,* CED và/hoặc tiêm vào vị trí chính xác trong không gian.

Theo một số phương án, hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan được sử dụng cho một bán cầu của não. Theo một số phương án, hạt virut tái tổ hợp được sử dụng cho cả hai bán cầu của não.

Theo một số phương án hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan được sử dụng cho nhiều hơn một vị trí đồng thời hoặc tuần tự. Theo một số phương án, nhiều mũi tiêm của hạt virut tái tổ hợp cách nhau không lâu hơn một giờ, hai giờ, ba giờ, bốn giờ, năm giờ, sáu giờ, chín giờ, mười hai giờ hoặc 24 giờ.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị người mắc rối loạn của CNS bằng cách sử dụng lượng hữu hiệu của dược phẩm có chứa hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan theo sáng chế để điều trị rối loạn của CNS. Theo một số phương án, dược phẩm có chứa một hoặc nhiều tá dược dược dụng.

Nhìn chung, từ khoảng 1 µl đến khoảng 1 ml của hợp phần theo sáng chế có thể được chuyển (*ví dụ*, từ khoảng 100 µl đến khoảng 500 µl của hợp phần). Theo một số phương án theo sáng chế, thể tích của hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan được tiêm vào thể vân là khoảng hoặc lớn hơn giá trị bất kỳ trong số các giá trị 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, 5 µl, 6 µl, 7 µl, 8 µl, 9 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl, 25 µl, 50 µl, 75 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 700 µl, 800 µl, 900 µl, hoặc 1 ml, hoặc lượng bất kỳ ở giữa chúng.

Theo một số phương án, thể tích thứ nhất của hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan được tiêm vào vùng thứ nhất của não, và thể tích thứ hai của hạt rAAV biến thể được tiêm vào vùng thứ hai của não. Ví dụ, theo một số phương án, thể tích thứ nhất của hạt rAAV biến thể được tiêm vào nhân đuôi, và thể tích thứ hai của hợp phần được tiêm vào hạch. Theo một số phương án, 1X thể tích của hạt rAAV biến thể được tiêm vào nhân đuôi, và 1,5X, 2X, 2,5X, 3X, 3,5X, hoặc 4X thể tích của hạt rAAV biến thể được tiêm vào hạch, trong đó X là thể tích mà bằng khoảng hoặc lớn hơn giá trị bất kỳ trong số các giá trị 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, 5 µl, 6 µl, 7 µl, 8 µl, 9 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl, 25 µl, 50 µl, 75 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl, 500 µl, 600 µl, 700 µl, 800 µl, 900 µl, hoặc 1 ml, hoặc lượng bất kỳ ở giữa chúng.

Hợp phần theo sáng chế (*ví dụ*, hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan theo sáng chế) có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung để điều trị rối loạn của CNS (*ví dụ*, HD). Khoảng thời gian giữa các lần sử dụng liên tiếp có thể ít nhất là (hoặc, theo cách khác, ít hơn) vài phút, vài giờ, hoặc vài ngày.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước sử dụng cho CNS lượng hữu hiệu của hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan có chứa vectơ mã hóa cho axit nucleic khác loại. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là ít nhất là khoảng giá trị bất kỳ trong số 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 10×10^{12}, 11×10^{12}, 15×10^{12}, 20×10^{12}, 25×10^{12}, 30×10^{12}, hoặc 50×10^{12} bản sao hệ gen/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là khoảng giá trị bất kỳ trong số từ 5×10^{12} đến 6×10^{12}, từ 6×10^{12} đến 7×10^{12}, từ 7×10^{12} đến 8×10^{12}, từ 8×10^{12} đến 9×10^{12}, từ 9×10^{12} đến 10×10^{12}, từ 10×10^{12} đến 11×10^{12}, từ 11×10^{12} đến 15×10^{12}, từ 15×10^{12} đến 20×10^{12}, từ 20×10^{12} đến 25×10^{12}, từ 25×10^{12} đến 30×10^{12}, từ 30×10^{12} đến 50×10^{12}, hoặc từ 50×10^{12} đến 100×10^{12} bản sao hệ

gen/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là khoảng giá trị bất kỳ trong số từ 5×10^{12} đến 10×10^{12}, từ 10×10^{12} đến 25×10^{12}, hoặc từ 25×10^{12} đến 50×10^{12}bản sao hệ gen/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần ít nhất là khoảng giá trị bất kỳ trong số 5×10^9, 6×10^9, 7×10^9, 8×10^9, 9×10^9, 10×10^9, 11×10^9, 15×10^9, 20×10^9, 25×10^9, 30×10^9, hoặc 50×10^9 đơn vị chuyển nạp /ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là khoảng giá trị bất kỳ trong số từ 5×10^9 đến 6×10^9, từ 6×10^9 đến 7×10^9, từ 7×10^9 đến 8×10^9, từ 8×10^9 đến 9×10^9, từ 9×10^9 đến 10×10^9, từ 10×10^9 đến 11×10^9, từ 11×10^9 đến 15×10^9, từ 15×10^9 đến 20×10^9, từ 20×10^9 đến 25×10^9, từ 25×10^9 đến 30×10^9, từ 30×10^9 đến 50×10^9 hoặc từ 50×10^9 đến 100×10^9 đơn vị chuyển nạp /ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần là khoảng giá trị bất kỳ trong số 5×10^9 đến 10×10^9, từ 10×10^9 đến 15×10^9, từ 15×10^9 đến 25×10^9, hoặc từ 25×10^9 đến 50×10^9 đơn vị chuyển nạp /ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần ít nhất là giá trị bất kỳ bằng từ khoảng 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 10×10^{10}, 11×10^{10}, 15×10^{10}, 20×10^{10}, 25×10^{10}, 30×10^{10}, 40×10^{10}, hoặc 50×10^{10} đơn vị gây nhiễm/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần ít nhất là giá trị bất kỳ nằm trongkhoảng từ 5×10^{10} đến 6×10^{10}, từ 6×10^{10} đến 7×10^{10}, từ 7×10^{10} đến 8×10^{10}, từ 8×10^{10} đến 9×10^{10}, từ 9×10^{10} đến 10×10^{10}, từ 10×10^{10} đến 11×10^{10}, từ 11×10^{10} đến 15×10^{10}, từ 15×10^{10} đến 20×10^{10}, từ 20×10^{10} đến 25×10^{10}, từ 25×10^{10} đến 30×10^{10}, từ 30×10^{10} đến 40×10^{10}, từ 40×10^{10} đến 50×10^{10}, hoặc từ 50×10^{10} đến 100×10^{10} đơn vị gây nhiễm/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virut của hợp phần ít nhất là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 5×10^{10} đến 10×10^{10}, từ 10×10^{10} đến 15×10^{10}, từ 15×10^{10} đến 25×10^{10}, hoặc từ 25×10^{10} đến 50×10^{10} đơn vị gây nhiễm/ml.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước sử dụng cho CNS của cá thể (*ví dụ*, người) lượng hữu hiệu của hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, liều lượng của hạt virut được sử dụng cho cá thể ít nhất là khoảng giá trị bất kỳ trong số từ 1×10^8 đến khoảng 1×10^{13} bản sao hệ gen/kg khối

lượng cơ thể. Theo một số phương án, liều lượng của hạt virut được sử dụng cho cá thể là khoảng giá trị bất kỳ trong số từ 1×10^8 đến khoảng 1×10^{13} bản sao hệ gen/kg khối lượng cơ thể.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm bước sử dụng cho CNS của cá thể (*ví dụ*, người) lượng hữu hiệu của hạt virut tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan cho cá thể. Theo một số phương án, tổng hàm lượng của hạt virut được sử dụng cho cá thể ít nhất là khoảng giá trị bất kỳ trong số 1×10^9 đến khoảng 1×10^{14} bản sao hệ gen. Theo một số phương án, tổng hàm lượng của hạt virut được sử dụng cho cá thể là khoảng giá trị bất kỳ trong số 1×10^9 đến khoảng 1×10^{14} bản sao hệ gen.

V. Cấu trúc biểu hiện

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất các phương pháp chuyển axit nucleic khác loại vào mắt bằng cách chuyển dưới võng mạc vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và trong đó vectơ rAAV được bọc capsit trong capsit rAAV (*ví dụ*, capsit rAAV2, capsit rAAVrh8R, *etc.*) có chứa một hoặc nhiều sự thế của các axit amin mà tương tác với HSPG. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị rối loạn của CNS của cá thể bao gồm bước chuyển hợp phần có chứa hạt rAAV vào CNS của cá thể, trong đó hạt rAAV có chứa (a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và (b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV. Theo một số phương án, axit nucleic khác loại (*ví dụ*, gen chuyển) được liên kết có điều khiển với vùng khởi đầu. Vùng khởi đầu nêu làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vùng khởi đầu sớm qua trung gian virut cự bào (CMV), LTR RSV, MoMLV LTR, vùng khởi đầu phosphoglyxerat kinaza-1 (PGK), vùng khởi đầu simian virut 40 (SV40) và vùng khởi đầu CK6, vùng khởi đầu transthyretin (TTR), vùng khởi đầu TK, vùng khởi đầu đáp ứng với tetraxyclin (TRE), vùng khởi đầu HBV, vùng khởi đầu hAAT, vùng khởi đầu LSP, vùng khởi đầu thể khảm đặc hiệu gan (LSP), vùng khởi đầu E2F, vùng khởi đầu telomeraza

(hTERT); vùng khởi đầu vùng tăng cường virut cự bào/beta-actin của gà/β-globin của thỏ (vùng khởi đầu CAG; Niwa *et al.*, *Gene*, 1991, 108(2):193-9) và vùng khởi đầu yếu tố kéo dài 1-alpha (EFl-alpha) (Kim *et al.*, *Gene*, 1990, 91(2):217-23 và Guo *et al.*, *Gene Ther.*, 1996, 3(9):802-10). Theo một số phương án, vùng khởi đầu bao gồm vùng khởi đầu β-glucuronidaza của người hoặc vùng tăng cường virut cự bào được liên kết với vùng khởi đầu β-actin của gà (CBA). Vùng khởi đầu có thể là vùng khởi đầu cơ định, cảm ứng hoặc kìm hãm. Theo một số phương án, vùng khởi đầu có khả năng biểu hiện axit nucleic khác loại trong tế bào của mắt. Theo một số phương án, vùng khởi đầu có khả năng biểu hiện axit nucleic khác loại ở tế bào nhận kích thích ánh sáng hoặc RPE. Theo một số phương án, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu rhođopsin kinaza (RK); *ví dụ*, vùng khởi đầu RK của người. Theo một số phương án, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu opsin; *ví dụ*, vùng khởi đầu opsin của người hoặc vùng khởi đầu opsin của chuột nhắt.

Sáng chế đề xuất việc sử dụng hệ gen virut tái tổ hợp để đưa một hoặc nhiều trình tự axit nucleic mã hóa cho polypeptit trị liệu và/hoặc axit nucleic để đóng gói thành hạt virut rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế của các axit amin mà tương tác với HSPG. Hệ gen virut tái tổ hợp có thể bao gồm thành phần bất kỳ để thiết lập sự biểu hiện của polypeptit trị liệu và/hoặc axit nucleic, ví dụ, vùng khởi đầu, ITR, thành phần liên kết ribosom, vùng kết thúc, vùng tăng cường, thành phần đánh dấu chọn lọc, intron, tín hiệu polyA, và/hoặc điểm mở đầu sao chép.

Theo một số phương án, vectơ rAAV là vectơ rAAV tự bổ sung, *ví dụ,* vectơ có chứa hệ gen tự bổ sung tái tổ hợp (thuật ngữ "tự bổ sung có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này). Các hạt virut AAV với hệ gen tự bổ sung và phương pháp sử dụng hệ gen AAV tự bổ sung được mô tả trong các patent Mỹ số 6,596,535; 7,125,717; 7,465,583; 7,785,888; 7,790,154; 7,846,729; 8,093,054; và 8,361,457; và Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111, mỗi tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. rAAV có chứa hệ gen tự bổ sung sẽ nhanh chóng tạo thành phân tử ADN sợi kép do trình tự bổ sung một phần của nó (*ví*

dụ, sợi mã hóa và không mã hóa bổ trợ của gen chuyển). Theo một số phương án, vectơ có chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa cho axit nucleic khác loại và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa cho trình tự bổ sung của axit nucleic, tại đó trình tự axit nucleic thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trong cùng một sợi với trình tự axit nucleic thứ hai dọc theo gần hết hoặc toàn bộ chiều dài của nó.

Theo một số phương án, trình tự axit nucleic khác loại thứ nhất và trình tự axit nucleic khác loại thứ hai được liên kết bằng ITR đột biến (*ví dụ*, ITR phải). Theo một số phương án, ITR có chứa trình tự polynucleotit 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG TCGCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG – 3' (SEQ ID NO:8). ITR đột biến có chứa sự mất của vùng D có chứa trình tự phân tách cuối. Kết quả là, trong quá trình sao chép hệ gen virut AAV, protein rep sẽ không phân cắt hệ gen virut ở ITR đột biến và như vậy, hệ gen virut tái tổ hợp có chứa trình tự sau theo thứ tự 5' đến 3' sẽ được đóng gói trong capsit virut: ITR AAV, trình tự polynucleotit khác loại thứ nhất bao gồm trình tự điều hòa, ITR AAV đột biến, polynucleotit khác loại thứ hai theo chiều ngược lại với polynucleotit khác loại thứ nhất và ITR AAV thứ ba.

VI. Hạt virut và phương pháp sản xuất hạt virut

Hạt virut rAAV

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp chuyển axit nucleic khác loại vào mắt bằng cách chuyển dưới võng mạc vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và trong đó vectơ rAAV được bọc capsit trong capsit rAAV (*ví dụ*, rAAV2, rAAVrh8R, *v.v.*) có chứa một hoặc nhiều sự thế của các axit amin mà tương tác với HSPG. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp và bộ kit có liên quan đến việc chuyển hạt rAAV vào CNS của cá thể.

Theo một số phương án, hạt rAAV có chứa vectơ rAAV. Theo một số phương án, hạt virut là hạt AAV tái tổ hợp có chứa axit nucleic có chứa gen chuyển khác loại được củng cố bên sườn bởi một hoặc hai đoạn lặp cuối đảo ngược AAV (ITR). Axit nucleic được bao trong capsit trong hạt AAV. Hạt AAV cũng có chứa protein capsit.

Theo một số phương án, axit nucleic có chứa (các) trình tự mã hóa được quan tâm (*ví dụ*, gen chuyển khác loại) các thành phần được liên kết có điều khiển theo chiều phiên mã, control các trình tự bao gồm các trình tự mở đầu và kết thúc phiên mã, bằng cách đó tạo thành băng biểu hiện.

Băng biểu hiện được kẹp trên đầu 5' và 3' bởi ít nhất một trình tự ITR AAV chức năng. "Trình tự ITR AAV chức năng" có nghĩa là trình tự ITR thực hiện chức năng đã định để giải phóng, sao chép và đóng gói hạt virut AAV. Xem Davidson *et al.*, *PNAS*, 2000, 97(7)3428-32; Passini *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):7034-40; và Pechan *et al.*, *Gene Ther.*, 2009, 16:10-16, tất cả các tài liệu này đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Để thực hiện một số khía cạnh của sáng chế, vectơ tái tổ hợp có chứa ít nhất toàn bộ các trình tự của AAV cần thiết để bao trong capsit và các cấu trúc vật lý để lây nhiễm bởi rAAV. ITR AAV để sử dụng trong vectơ theo sáng chế không cần phải có trình tự nucleotit kiểu dại (*ví dụ*, như được mô tả trong Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5:793-801), và có thể được biến đổi bằng cách cài xen, làm mất hoặc thay thế nucleotit hoặc ITR AAV có thể thu được từ typ bất kỳ trong số một vài typ huyết thanh AAV. Hiện nay hơn 40 typ huyết thanh của AAV đã được biết, và các typ huyết thanh mới và biến thể của các typ huyết thanh hiện có tiếp tục được xác định Xem Gao *et al.*, *PNAS*, 2002, 99(18): 11854-6; Gao *et al.*, *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6; và Bossis *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810.

Việc sử dụng typ huyết thanh AAV bất kỳ được coi như là nằm trong phạm vi của sáng chế. Theo một số phương án, vectơ rAAV là vectơ có nguồn gốc từ typ huyết thanh AAV, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, ITR AAV là AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV dê, AAV bò, hoặc ITR AAV chuột hoặc dạng tương tự. Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV có chứa ITR của các ITR AAV là AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV dê, AAV bò, hoặc AAV chuột hoặc dạng tương tự.

Theo các phương án nhất định, axit nucleic trong AAV có chứa AAV2 ITR. Như đã mô tả *ở trên*, hạt rAAV có thể còn chứa capsit có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan.

Theo một số phương án, vectơ có thể bao gồm đoạn nhồi axit nucleic. Theo một số phương án, đoạn nhồi axit nucleic có thể mã hóa cho protein huỳnh quang màu xanh lá cây. Theo một số phương án, đoạn nhồi axit nucleic có thể nằm ở giữa vùng khởi đầu và axit nucleic mã hóa cho ARNi.

Các typ huyết thanh AAV khác nhau được sử dụng để tối ưu hóa sự chuyển nạp của tế bào đích cụ thể hoặc để hướng đích loại tế bào cụ thể trong mô đích cụ thể (*ví dụ*, mô CNS). Hạt rAAV có thể có chứa protein virut và axit nucleic virut của cùng typ huyết thanh hoặc typ huyết thanh hỗn hợp. Ví dụ, theo một số phương án hạt rAAV có thể có chứa protein capsit AAV2 theo sáng chế và ít nhất là một AAV2 ITR hoặc nó có thể có chứa protein capsit AAV2 và ít nhất là một AAV1 ITR. Hỗn hợp bất kỳ của các typ huyết thanh AAV để sản xuất hạt rAAV được đề xuất trong bản mô tả này như thể mỗi hỗn hợp đã được nêu một cách riêng rẽ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt rAAV có chứa capsit AAV2 theo sáng chế. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt rAAV có chứa capsit AAVrh8R theo sáng chế.

Sản xuất hạt AAV

Nhiều phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực để sản xuất vectơ rAAV, bao gồm chuyển nạp, sản xuất dòng tế bào ổn định, và hệ thống sản xuất virut lai gây nhiễm mà bao gồm thể lai ađenovirut-AAV, thể lai herpesvirus-AAV (Conway, JE *et al.*, (1997) *J. Virology* 71(11):8780-8789) và thể lai baculovirus-AAV. Môi trường nuôi cấy sản xuất rAAV để sản xuất hạt virut rAAV đều đòi hỏi; 1) tế bào chủ thích hợp, bao gồm, ví dụ, dòng tế bào có nguồn gốc từ người chẳng hạn như tế bào HeLa, tế bào A549, hoặc tế bào 293, hoặc dòng tế bào có nguồn gốc từ côn trùng chẳng hạn như SF-9, trong trường hợp hệ thống sản xuất baculovirus; 2) chức năng virut hỗ trợ

thích hợp, được cung cấp bởi ađenovirut kiểu dại hoặc đột biến (chẳng hạn như ađenovirut nhạy cảm nhiệt độ), virut herpes, baculovirus, hoặc cấu trúc plasmit cung cấp chức năng trợ giúp; 3) các gen và sản phẩm gen rep và cap AAV; 4) gen chuyển (chẳng hạn như gen chuyển trị liệu) được củng cố bên sườn bởi ít nhất là một trình tự ITR AAV; và 5) môi trường và thành phần môi trường thích hợp để hỗ trợ sản xuất rAAV. Môi trường thích hợp đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng để sản xuất vectơ rAAV. Các môi trường này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, môi trường được sản xuất bởi Hyclone Laboratories và JRH bao gồm Môi Trường Eagle Cải Biến (MEM), Môi Trường Eagle Cải Biến Dulbecco (DMEM), các chế phẩm theo đặt hàng chẳng hạn như các chế phẩm được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6,566,118, và môi trường Sf-900 II SFM như được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6,723,551, mỗi tài liệu này được nêu ở đây chỉ để tham khảo, cụ thể là đối với chế phẩm môi trường theo đặt hàng để sử dụng trong việc sản xuất vectơ AAV tái tổ hợp.

Hạt rAAV có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, *ví dụ*, bằng sáng chế Mỹ số 6,566,118; 6,989,264; và 6,995,006. Trong thực hành sáng chế, tế bào chủ để sản xuất hạt rAAV bao gồm tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, tế bào vi sinh vật và tế bào nấm men. Tế bào chủ cũng có thể là tế bào đóng gói trong đó gen rep và cap AAV được duy trì ổn định trong tế bào chủ hoặc tế bào sản xuất trong đó hệ gen vectơ AAV được duy trì ổn định. Tế bào sản xuất và tế bào đóng gói nêu làm ví dụ thu được từ tế bào 293, tế bào A549 hoặc tế bào HeLa. Vectơ AAV được tinh chế và bào chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một số phương án, hạt rAAV có thể được sản xuất bằng phương pháp chuyển nạp ba thành phần, chẳng hạn như phương pháp chuyển nạp ba thành phần ví dụ được đề xuất *dưới đây*. Tóm lại, plasmit chứa gen rep và gen capsit, cùng với plasmit ađenovirut trợ giúp, có thể được chuyển nạp (*ví dụ,* bằng cách sử dụng phương pháp canxi phosphat) vào dòng tế bào (*ví dụ,* tế bào HEK-293), và virut có thể được thu gom và tùy ý được tinh chế.

Theo một số phương án, hạt rAAV có thể là được sản xuất bằng phương pháp sản xuất dòng tế bào, chẳng hạn như phương pháp sản xuất dòng tế bào ví dụ được đề xuất *dưới đây* (cũng xem (được viện dẫn trong Martin *et al*., (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269). Tóm lại, dòng tế bào (*ví dụ,* dòng tế bào HeLa) có thể được chuyển nạp ổn định bằng plasmit chứa trình tự gen rep, trình tự gen capsit, và trình tự khởi đầu -gen chuyển. Các dòng tế bào có thể được sàng lọc để chọn lọc dòng dẫn đầu về sản xuất rAAV, mà sau đó có thể được mở rộng thành bình phản ứng sinh học sản xuất và được lây nhiễm bằng ađenovirut (*ví dụ,* ađenovirut kiểu dại) dưới dạng tế bào hỗ trợ để khởi đầu sự sản xuất rAAV. Sau đó, virut có thể được thu hoạch, ađenovirut có thể bị bất hoạt (*ví dụ,* bằng nhiệt) và/hoặc bị giết chết, và hạt rAAV có thể được tinh chế.

Theo một số khía cạnh, phương pháp được đề xuất để sản xuất hạt rAAV bất kỳ như được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm bước (a) nuôi cấy tế bào chủ trong điều kiện mà hạt rAAV được sản xuất, trong đó tế bào chủ có chứa (i) một hoặc nhiều gen bao gói AAV, trong đó mỗi gen bao gói AAV này mã hóa cho protein sao chép và/hoặc bọc capsit AAV; (ii) tiền vectơ rAAV có chứa axit nucleic mã hóa cho polypeptit trị liệu và/hoặc axit nucleic như được mô tả trong bản mô tả này được củng cố bên sườn bởi ít nhất là một ITR AAV, và (iii) chức năng trợ giúp AAV; và (b) thu hồi hạt rAAV được sản xuất bởi tế bào chủ. Theo một số phương án, ít nhất là một ITR AAV này được chọn từ nhóm gồm có các ITR AAV là AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV dê, AAV bò, hoặc AAV chuột hoặc dạng tương tự. Theo một số phương án, protein bọc capsit có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan. Theo một số phương án, protein bọc capsit là protein bọc capsit AAV2. Theo một số phương án, protein bọc capsit là protein bọc capsit AAVrh8R.

Môi trường nuôi cấy sản xuất rAAV thích hợp theo sáng chế có thể được bổ sung bằng protein tái tổ hợp huyết thanh hoặc có nguồn gốc từ huyết thanh ở hàm

lượng bằng 0,5%-20% (thể tích/thể tích hoặc khối lượng/thể tích). Theo cách khác, như đã được biết trong lĩnh vực, vectơ rAAV có thể được sản xuất trong điều kiện không chứa huyết thanh mà có thể cũng dùng để chỉ môi trường không chứa sản phẩn có nguồn gốc động vật. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể hiểu rõ rằng môi trường thương mại hoặc theo đặt hàng được thiết kế để hỗ trợ cho việc sản xuất vectơ rAAV cũng có thể được bổ sung bằng một hoặc nhiều thành phần môi trường nuôi cấy tế bào đã biết trong lĩnh vực, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở glucoza, vitamin, axit amin, và hoặc yếu tố sinh trưởng, để làm tăng độ chuẩn của rAAV trong môi trường sản xuất.

Môi trường nuôi cấy để sản xuất rAAV có thể được cho sinh trưởng trong nhiều điều kiện (trong khoảng nhiệt độ rộng, để làm thay đổi thời gian, và dạng tương tự) thích hợp với tế bào chủ cụ thể được sử dụng. Như đã được biết trong lĩnh vực, môi trường nuôi cấy để sản xuất rAAV bao gồm môi trường nuôi cấy phụ thuộc gắn mà có thể được nuôi cấy trong bình phụ thuộc gắn thích hợp chẳng hạn như, ví dụ, chai xoay, dụng cụ lọc sợi rỗng, vi chất mang, và phản ứng sinh học tầng đã nạp hoặc tầng sôi bình. môi trường nuôi cấy để sản xuất vectơ rAAV có thể còn bao gồm tế bào chủ thích ứng huyền phù chẳng hạn như tế bào HeLa, tế bào 293, và tế bào SF-9 mà có thể được nuôi cấy theo nhiều cách bao gồm, ví dụ, bình nuôi xoay, bình phản ứng sinh học thùng có khuấy, và hệ thống dùng một lần chẳng hạn như hệ thống túi Wave.

Hạt vectơ rAAV theo sáng chế có thể được thu hoạch từ môi trường nuôi cấy để sản xuất rAAV bằng cách phân giải tế bào chủ của môi trường nuôi cấy sản xuất hoặc bằng cách thu hoạch môi trường đã sử dụng từ môi trường nuôi cấy sản xuất, thu được tế bào được nuôi cấy trong điều kiện đã biết trong lĩnh vực để làm giải phóng hạt rAAV vào môi trường từ tế bào nguyên vẹn, như được mô tả đầy đủ hơn trong bằng sáng chế Mỹ số 6,566,118). Phương pháp phân giải tế bào thích hợp cũng đã biết trong lĩnh vực và bao gồm ví dụ nhiều chu trình kết đông/rã đông, nghiền

bằng siêu âm, vi hóa lỏng, và xử lý bằng hóa chất, chẳng hạn như chất tẩy rửa và/hoặc proteaza.

Theo phương án khác, hạt rAAV được tinh chế. Thuật ngữ "được tinh chế" như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm việc chuẩn bị hạt rAAV không có ít nhất một số thành phần khác mà cũng có thể có mặt khi hạt rAAV có trong tự nhiên hoặc được điều chế ban đầu từ các thành phần này. Do đó, ví dụ, hạt rAAV được phân lập có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật tinh chế để làm giàu nó từ hỗn hợp nguồn, như dịch tan nuôi cấy hoặc dịch nổi bề mặt nuôi cấy sản xuất. Việc làm giàu có thể được xác định theo nhiều cách khác nhau, như, ví dụ, bởi tỷ lệ của các hạt bền với ADNaza (DRP) hoặc các bản sao hệ gen (gc) có mặt trong dung dịch, hoặc bởi tính lây nhiễm, hoặc nó có thể được xác định trong mối liên quan với chất có thể thiệp tiềm năng thứ hai có mặt trong hỗn hợp nguồn, như các chất nhiễm tạp, bao gồm các chất nhiễm tạp trong quá trình nuôi cấy sản xuất hoặc các chất nhiễm tạp trong quá trình xử lý, bao gồm virut hỗ trợ, các thành phần của môi trường, và các chất tương tự.

Theo một số phương án, sản phẩm thu hoạch môi trường nuôi cấy sản xuất rAAV được phân loại để loại bỏ mảnh vụn tế bào chủ. Theo một số phương án, sản phẩm thu hoạch môi trường nuôi cấy sản xuất được phân loại bằng cách lọc thông qua dãy các bộ lọc sâu bao gồm, ví dụ, Bộ lọc DOHC Millipore Millistak+ HC Pod phân loại, Bộ lọc A1HC Millipore Millistak+ HC Pod phân loại, và bộ lọc màng kỵ nước Filter Opticap XL1O Millipore Express SHC 0,2 μm. Sự phân loại cũng có thể đạt được bằng nhiều kỹ thuật tiêu chuẩn khác đã biết trong lĩnh vực, chẳng hạn như, ly tâm hoặc lọc thông qua bộ lọc xenluloza axetat bất kỳ có kích thước lỗ bằng 0,2 μm hoặc lớn hơn đã biết trong lĩnh vực.

Theo một số phương án, sản phẩm thu hoạch môi trường nuôi cấy sản xuất rAAV còn được xử lý bằng Benzonase® để phân giải ADN có khối lượng phân tử cao bất kỳ có mặt trong môi trường nuôi cấy sản xuất. Theo một số phương án, sự phân giải bằng Benzonase® được thực hiện trong điều kiện tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh

vực bao gồm, ví dụ, nồng độ cuối cùng là 1-2,5 đơn vị/ml Benzonase® ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ nhiệt độ môi trường đến 37°C trong khoảng thời gian từ 30 phút đến vài giờ.

Hạt rAAV có thể được phân lập hoặc được tinh chế bằng cách sử dụng một hoặc nhiều bước tinh chế sau đây: ly tâm cân bằng; lọc trao đổi ion dòng chảy qua; lọc dòng chảy tuyến tính (TFF) để cô hạt rAAV; bắt giữ rAAV bằng sắc ký apatit; bất hoạt bằng nhiệt đối với virut trợ giúp; bắt giữ rAAV bằng sắc ký tương tác kỵ nước; trao đổi chất đệm bằng sắc ký loại trừ kích thước (SEC); lọc nano; và bắt giữ rAAV bằng sắc ký trao đổi anion, sắc ký trao đổi cation, hoặc sắc ký ái lực. Các bước này có thể được sử dụng một mình, ở nhiều dạng kết hợp, hoặc in theo thứ tự khác nhau. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm tất cả các bước theo thứ tự như được mô tả dưới đây. Các phương pháp tinh chế hạt rAAV được tìm thấy, ví dụ, trong tài liệu Xiao *et al.*, (1998) *Journal of Virology* 72:2224-2232; các bằng sáng chế Mỹ số 6,989,264 và 8,137,948; và WO 2010/148143.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm có chứa hạt rAAV có chứa axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu và/hoặc axit nucleic trị liệu, trong đó hạt rAAV có chứa capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế hoặc các axit amin mà tương tác với HSPG, và chất mang dược dụng. Dược phẩm này có thể là thích hợp đối với phương thức sử dụng bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này; ví dụ, bằng cách sử dụng dưới võng mạc.

Theo một số phương án, dược phẩm chứa rAAV được mô tả trong bản mô tả này và chất mang dược dụng là thích hợp để dùng cho người. Các chất mang như vậy là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, *ví dụ*, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, pp. 1035-1038 và 1570-1580). Theo một số phương án, dược phẩm chứa rAAV được mô tả trong bản mô tả này và chất mang dược dụng là thích hợp để tiêm cho mắt. Các chất mang dược dụng như vậy có thể là chất lỏng vô trùng, như nước và dầu, bao gồm các dầu có nguồn gốc từ dầu mỏ, động vật, thực vật hoặc tổng hợp, như dầu lạc, dầu đậu tương, dầu khoáng, và các dầu tương tự. Dung dịch

nước muối và dung dịch dextroza, polyetylen glycol (PEG) và glyxerol gốc nước cũng có thể được sử dụng làm chất mang lỏng, cụ thể cho dung dịch dùng để tiêm. Dược phẩm có thể còn chứa các thành phần bổ sung, ví dụ chất bảo quản, chất đệm, chất đẳng trương, chất chống oxy hóa và chất làm ổn định, chất làm trong hoặc chất thấm ướt không ion, chất làm tăng độ nhớt, và các chất tương tự. Dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được đóng gói trong các liều lượng đơn vị đơn hoặc ở dạng đa liều. Dược phẩm nhìn chung được bào chế dưới dạng dung dịch vô trùng và gần như đẳng trương.

VII. Hệ thống & bộ kit

Hợp phần rAAV Như được mô tả trong bản mô tả này có thể được chứa trong hệ thống được thiết kế để sử dụng ở một trong số các phương pháp theo sáng chế như được mô tả trong bản mô tả này.

Chuyển dưới võng mạc

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hệ thống để chuyển dưới võng mạc vectơ vào mắt của cá thể, có chứa a) hợp phần có chứa lượng hữu hiệu của hạt rAAV, trong đó i) protein capsit của hạt rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và ii) vectơ có chứa axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit trị liệu hoặc ARN trị liệu và ít nhất là một đoạn lặp cuối AAV; và b) dụng cụ để chuyển rAAV qua võng mạc.

Nhìn chung, hệ thống này có chứa ống thông dò có lỗ khoan nhỏ, trong đó ống thông dò có khổ từ 27 đến 45, một hoặc nhiều ống tiêm (*ví dụ,* 1, 2, 3, 4 hoặc nhiều hơn), và một hoặc nhiều dịch lỏng (*ví dụ,* 1, 2, 3, 4 hoặc nhiều hơn) thích hợp để sử dụng trong phương pháp theo sáng chế.

Ống thông dò có lỗ khoan nhỏ thích hợp để tiêm dưới võng mạc huyền phù vectơ và/hoặc dịch lỏng khác để tiêm vào không gian dưới võng mạc. Theo một số phương án, ống thông dò có khổ từ 27 đến 45. Theo một số phương án, ống thông dò có lỗ khoan nhỏ có khổ 35-41. Theo một số phương án, ống thông dò có lỗ khoan nhỏ

có khổ 40 hoặc 41. Theo một số phương án, ống thông dò có lỗ khoan nhỏ có khổ 41. Ống thông dò có thể là loại ống thông dò thích hợp bất kỳ, ví dụ, ống thông dò de-Juan® hoặc ống thông dò Eagle®.

Ống tiêm có thể là ống tiêm thích hợp bất kỳ, miễn là nó có khả năng nối được vào ống thông dò để chuyển dịch lỏng. Theo một số phương án, ống tiêm là hệ thống ống tiêm Accurus®. Theo một số phương án, hệ thống có một ống tiêm. Theo một số phương án, hệ thống có hai ống tiêm. Theo một số phương án, hệ thống có ba ống tiêm. Theo một số phương án, hệ thống có bốn hoặc nhiều ống tiêm.

Hệ thống có thể còn chứa bơm tiêm tự động, mà có thể được làm cho hoạt động bằng, *ví dụ,* bàn đạp chân.

Dịch lỏng thích hợp để sử dụng trong phương pháp theo sáng chế bao gồm các dịch lỏng được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ, một hoặc nhiều dịch lỏng mà mỗi dịch lỏng này có chứa lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều vectơ như được mô tả trong bản mô tả này, một hoặc nhiều dịch lỏng để tạo ra mụn ban đầu (*ví dụ,* nước muối hoặc dịch lỏng thích hợp khác), và một hoặc nhiều dịch lỏng có chứa một hoặc nhiều chất trị liệu.

Dịch lỏng thích hợp để sử dụng trong phương pháp theo sáng chế bao gồm các dịch lỏng được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ, một hoặc nhiều dịch lỏng mà mỗi dịch lỏng này có chứa lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều vectơ như được mô tả trong bản mô tả này, một hoặc nhiều dịch lỏng để tạo ra mụn ban đầu (*ví dụ,* nước muối hoặc dịch lỏng thích hợp khác), và một hoặc nhiều dịch lỏng có chứa một hoặc nhiều chất trị liệu.

Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ lớn hơn khoảng 0,8 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ ít nhất là khoảng 0,9 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ ít nhất là khoảng 1,0 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ ít nhất là khoảng 1,5 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu

hiệu của vectơ ít nhất là khoảng 2,0 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ lớn hơn từ khoảng 0,8 đến khoảng 3,0 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ lớn hơn từ khoảng 0,8 đến khoảng 2,5 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ lớn hơn từ khoảng 0,8 đến khoảng 2,0 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ lớn hơn từ khoảng 0,8 đến khoảng 1,5 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ lớn hơn từ khoảng 0,8 đến khoảng 1,0 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ nằm trong khoảng từ khoảng 0,9 đến khoảng 3,0 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ nằm trong khoảng từ khoảng 0,9 đến khoảng 2,5 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ nằm trong khoảng từ khoảng 0,9 đến khoảng 2,0 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ nằm trong khoảng từ khoảng 0,9 đến khoảng 1,5 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ nằm trong khoảng từ khoảng 0,9 đến khoảng 1,0 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ nằm trong khoảng từ khoảng 1,0 đến khoảng 3,0 ml. Theo một số phương án, thể tích của dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ nằm trong khoảng từ khoảng 1,0 đến khoảng 2,0 ml.

Dịch lỏng để tạo ra mụn ban đầu có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ khoảng 0,1 đến khoảng 0,5 ml. Theo một số phương án, tổng thể tích của tất cả các dịch lỏng trong hệ thống nằm trong khoảng từ khoảng 0,5 đến khoảng 3,0 ml.

Theo một số phương án, hệ thống có chứa dịch lỏng đơn lẻ (*ví dụ,* dịch lỏng có chứa lượng hữu hiệu của vectơ). Theo một số phương án, hệ thống có chứa 2 dịch lỏng. Theo một số phương án, hệ thống có chứa 3 dịch lỏng. Theo một số phương án, hệ thống có chứa 4 hoặc nhiều dịch lỏng.

Hệ thống theo sáng chế có thể còn được đóng gói vào bộ kit, trong đó bộ kit có thể còn chứa hướng dẫn sử dụng. Theo một số phương án, bộ kit còn chứa dụng cụ để chuyển hợp phần của hạt rAAV dưới võng mạc. Theo một số phương án, hướng dẫn sử dụng bao gồm hướng dẫn theo một trong số các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, hướng dẫn sử dụng bao gồm hướng dẫn để chuyển dưới võng mạc hạt rAAV có chứa capsit có một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm thay đổi, làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết của hạt rAAV với HSPG.

Chuyển CNS

Sáng chế đề xuất bộ kit để chuyển axit nucleic khác loại vào CNS của cá thể có chứa hợp phần có chứa hạt rAAV, trong đó hạt rAAV có chứa (a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và (b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV. Sáng chế còn đề xuất bộ kit để điều trị rối loạn CNS ở cá thể có chứa hợp phần có chứa hạt rAAV, trong đó hạt rAAV có chứa (a) capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan, và (b) vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại để điều trị rối loạn CNS và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV.

Bộ kit có thể có chứa hạt rAAV bất kỳ hoặc hợp phần hạt rAAV theo sáng chế. Ví dụ, bộ kit có thể bao gồm hạt rAAV với capsit rAAV có chứa protein capsit rAAV có chứa một hoặc nhiều sự thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí mà tương tác với heparan sulfat proteoglycan (*ví dụ,* một hoặc nhiều sự thế axit amin mà làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan, chẳng hạn như sự thế ở R484, R487, K527, K532, R585 và/hoặc R588, đánh số dựa trên VP1 của AAV2) và vectơ rAAV có chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV.

Theo một số phương án, bộ kit còn chứa dụng cụ để chuyển hợp phần của hạt rAAV vào CNS. Dụng cụ để chuyển CNS (*ví dụ,* để chuyển hợp phần chứa hạt rAAV) là đã biết trong lĩnh vực và có thể sử dụng bơm (*ví dụ,* bơm mao dẫn và/hoặc

truyền, như được mô tả dưới đây) và dụng cụ tiêm (*ví dụ,* ống thông, ống thông dò, *v.v.*). Một cách tùy ý, kỹ thuật chụp ảnh có thể được sử dụng để hướng dụng cụ tiêm và/hoặc giám sát việc chuyển dịch truyền (*ví dụ,* hợp phần chứa hạt rAAV). Chuyển CNS có thể bao gồm chuyển bằng cách tiêm vào vị trí xác định trong không gian, hoặc bằng cách chuyển tăng cường đối lưu (CED). Dụng cụ tiêm có thể được chọc vào mô CNS ở đối tượng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định được tọa độ thích hợp để định vị dụng cụ tiêm trong mô CNS đích. Theo một số phương án, việc định vị được thực hiện thông qua bản đồ giải phẫu thu được ví dụ bằng cách chụp ảnh CT và/hoặc MRI của não đối tượng để hướng dụng cụ tiêm vào mô CNS đích.

Theo một số phương án, chụp ảnh cộng hưởng từ trong khi phẫu thuật (iMRI) và/hoặc chụp ảnh thời gian thực của việc chuyển có thể được thực hiện. Theo một số phương án, dụng cụ được sử dụng để sử dụng hạt rAAV cho động vật có vú bằng các phương pháp theo sáng chế. iMRI đã được biết trong lĩnh vực dưới dạng kỹ thuật để chụp ảnh trên cơ sở MRI của bệnh nhân trong quá trình phẫu thuật, mà giúp xác nhận quy trình phẫu thuật thành công (*ví dụ,* để chuyển hạt rAAV vào CNS) và làm giảm nguy cơ làm hư hại các phần khác của mô (xem thêm phần mô tả trong tài liệu, *ví dụ,* Fiandaca *et al.*, (2009) *Neuroimage* 47 Suppl. 2:T27-35). Theo một số phương án, chất dò vết (*ví dụ,* chất làm tăng độ tương phải MRI) có thể được chuyển cùng với dịch truyền (*ví dụ,* hợp phần chứa hạt rAAV) để giám sát thời gian thực đối với sự phân bố ở mô của dịch truyền. Xem tài liệu ví dụ Fiandaca *et al.*, (2009) *Neuroimage* 47 Suppl. 2:T27-35; U.S. PG Pub 2007/0259031; và bằng sáng chế Mỹ số 7,922,999. Việc sử dụng chất dò vết có thể thông báo sự ngừng chuyển. Các phương thức dò vết và chụp ảnh khác đã biết trong lĩnh vực có thể cũng được sử dụng theo dõi dự phân bố dịch truyền.

Theo một số phương án, hạt rAAV có thể được sử dụng bằng cách tiêm vào vị trí xác định trong không gian (thuật ngữ "vị trí chính xác" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này) tiêu chuẩn bằng cách sử dụng các dụng cụ và các

phương pháp đã biết trong lĩnh vực để chuyển hạt rAAV. Nhìn chung, các phương pháp này có thể sử dụng dụng cụ tiêm, hệ thống lập kế hoạch để dịch vùng của mô được hướng đích để chuyển thành dãy tọa độ (*ví dụ,* các tham số dọc theo các trục bên-bên, lưng-bụng, và đầu-đuôi), và dụng cụ để định vị vị trí xác định trong không gian theo các tọa độ đã định (*ví dụ,* dụng cụ định vị vị trí xác định trong không gian, tùy ý bao gồm đầu dò và cấu trúc để cố định đầu tại vị trí trong sự sắp xếp thẳng hàng với hệ thống tọa độ). Ví dụ không làm giới hạn sáng chế của hệ thống mà có thể hữu dụng để phẫu thuật được hướng dẫn bởi MRI và/hoặc tiêm vào vị trí chính xác trong không gian là hệ thống ClearPoint® (MRI Interventions, Memphis, TN).

Phương pháp ví dụ và không làm hạn chế sáng chế khác để chuyển hạt rAAV vào CNS là sự chuyển tăng cường đối lưu (CED). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "sự chuyển tăng cường đối lưu (CED)" có thể dùng để chỉ việc chuyển chất trị liệu vào CNS bằng cách truyền ở tốc độ trong đó áp suất thủy tĩnh dẫn đến sự phân bố đối lưu. Theo một số phương án, việc truyền được thực hiện ở tốc độ lớn hơn 0,5 µl/phút. Tuy nhiên, tốc độ dòng chảy thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng sao cho áp suất trong sọ được duy trì ở mức độ thích hợp hàm lượng để không làm tổn thương mô não. CED có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng ống thông hoặc ống thông dò thích hợp (*ví dụ,* ống thông dò không hồi lưu thiết kế từng bước) thông qua việc định vị đầu của ống thông dò ít nhất là ở gần sát với mô CNS đích (ví dụ, đầu được chọc vào mô CNS). Sau khi ống thông dò được định vị, nó được nối vào bơm mà chuyển chất trị liệu thông qua đầu ống thông dò vào mô CNS đích. Gradien áp suất từ đầu của ống thông dò có thể được duy trì trong quá trình truyền. Theo một số phương án, việc truyền có thể được kiểm soát bằng chất dò vết có thể phát hiện được bằng phương pháp chụp ảnh chẳng hạn như MRI trong khi phẫu thuật (iMRI) hoặc kỹ thuật MRI thời gian thực khác.

CED dựa trên việc bơm dịch truyền (*ví dụ,* hợp phần chứa hạt rAAV) vào CNS dưới áp suất tại đó áp suất thủy tĩnh của dịch kẽ vượt qua. Điều này làm cho dịch truyền tiếp xúc với môi trường xung quanh mạch CNS, mà được sử dụng như là bơm

để phân phối dịch truyền thông qua đối lưu và làm gia tăng phạm vi chuyển của nó (xem tài liệu, *ví dụ,* Hadaczek *et al.*, (2006) *Hum. Gene Ther.* 17:291-302; Bankiewicz *et al.*, (2000) *Exp. Neurol.* 164:2-14; Sanftner, LM *et al.*, (2005) *Exp. Neurol.* 194(2):476-483; Forsayeth, JR *et al.*, (2006) *Mol. Ther.* 14(4):571-577; bằng sáng chế Mỹ số 6,953,575; công bố đơn sáng chế Mỹ số 2002/0141980; công bố đơn sáng chế Mỹ số 2007/0259031; và WO 2010/088560).

Theo một số phương án, dụng cụ để chuyển tăng cường đối lưu có chứa bơm thẩm thấu và/hoặc bơm truyền. Bơm thẩm thấu và/hoặc bơm truyền có sẵn trên thị trường (*ví dụ,* của hãng ALZET® Corp, Hamilton Corp, ALZA Inc. ở Palo Alto, CA). Hệ thống bơm này có thể cấy ghép được. Hệ thống bơm ví dụ có thể được tìm thấy, *ví dụ,* trong bằng sáng chế Mỹ số 7,351,239; 7,341,577; 6,042,579; 5,735,815; và 4,692,147. Các dụng cụ ví dụ để CED, bao gồm ống thông dò từng bậc và chống hồi lưu, có thể được tìm thấy trong WO 99/61066 và WO 2006/042090, được nêu ở đây chỉ để tham khảo.

Theo một số phương án, dụng cụ để chuyển tăng cường đối lưu có chứa ống thông dò chống hồi lưu (*ví dụ,* ống thông dò thiết kế từng bước không hồi lưu). Mô tả và các ống thông dò chống hồi lưu khác có thể được tìm thấy, ví dụ, trong tài liệu Krauze *et al.*, (2009) *Methods Enzymol.* 465:349-362; U.S. PG Pub 2006/0135945; U.S. PG Pub 2007/0088295; và PCT/US08/64011. Theo một số phương án, chỉ một ống thông dò được sử dụng. Theo các phương án khác, nhiều hơn một ống thông dò được sử dụng. Theo một số phương án, dụng cụ để chuyển tăng cường đối lưu có chứa ống thông dò chống hồi lưu được kết hợp với bơm mà tại ra áp suất đủ để làm cho dịch truyền chảy qua ống thông dò vào mô đích ở tốc độ có kiểm soát. Tốc độ dòng chảy thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng sao cho áp suất trong sọ được duy trì ở mức độ thích hợp hàm lượng để không làm tổn thương mô não.

Theo một số phương án, sự thâm nhập của dịch truyền được gia tăng thêm bằng cách sử dụng chất làm thuận lợi. Chất làm thuận lợi có khả năng làm thuận lợi thêm cho việc chuyển dịch truyền đến mô đích (*ví dụ,* mô đích CNS). Ví dụ không

làm giới hạn sáng chế của chất làm thuận lợi là heparin có khối lượng phân tử thấp (xem tài liệu, *ví dụ,* bằng sáng chế Mỹ số 7,922,999).

Theo một số phương án, bộ kit còn bao gồm hướng dẫn để chuyển hợp phần của hạt rAAV vào CNS. Bộ kit được mô tả trong bản mô tả này có thể còn bao gồm các nguyên liệu khác được mong muốn trên quan điểm thương mại và của người sử dụng, bao gồm các chất đệm khác, chất pha loãng, giấy lọc, kim, bơm tiêm, và tờ giấy hướng dẫn thực hiện phương pháp bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này. Nguyên liệu bao gói thích hợp cũng có thể được bao gồm và có thể là nguyên liệu bao gói bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, bao gồm, ví dụ, lọ (chẳng hạn như lọ được bịt kín), bình, ampun, chai, vại, bao gói linh động (*ví dụ*, túi Mylar hoặc chất dẻo kín), và nguyên liệu tương tự. Các vật phẩm sản xuất có thể còn được vô trùng và/hoặc bịt kín. Theo một số phương án, bộ kit có chứa hướng dẫn để điều trị rối loạn của CNS được mô tả trong bản mô tả này bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp và/hoặc hạt rAAV được mô tả trong bản mô tả này. Bộ kit có thể bao gồm chất mang dược dụng thích hợp để tiêm vào CNS của cá thể, và một hoặc nhiều: chất đệm, chất pha loãng, chất độn, kim, ống tiêm, và vật gài bao gói có hướng dẫn để thực hiện việc tiêm vào CNS của cá thể.

Tá dược

Theo một số phương án có liên quan đến việc chuyển dưới võng mạc và/hoặc CNS, bộ kit còn chứa chất đệm và/hoặc tá dược dược dụng. Như đã được biết rõ trong lĩnh vực, tá dược dược dụng là chất tương đối trơ mà làm thuận tiện cho việc sử dụng của chất có tác dụng dược lý và có thể được cung cấp dưới dạng dung dịch hoặc huyền phù lỏng, dưới dạng nhũ tương, hoặc dưới dạng chất rắn thích hợp để hòa tan hoặc tạo huyền phù trong chất lỏng trước khi sử dụng. Ví dụ, tá dược có thể tạo hình dạng hoặc độ đặc, hoặc hoạt động dưới dạng chất pha loãng. Tá dược thích hợp bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chất làm ổn định, chất làm ẩm và nhũ tương hóa, muối để làm thay đổi độ thẩm thấu, chất bao nang, chất đệm pH, và chất đệm. Các tá dược này bao gồm dược chất bất kỳ thích hợp để chuyển trực tiếp vào mắt mà có thể

được sử dụng mà không gây độc. Tá dược dược dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sorbitol, hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất TWEEN, và chất lỏng chẳng hạn như nước, nước muối, glyxerol và etanol. Muối dược dụng có thể được bao gồm trong đó, ví dụ, muối axit khoáng chẳng hạn như hyđroclorua, hyđrobromua, phosphat, sulfat, và muối tương tự; và muối của axit hữu cơ chẳng hạn như axetat, propionat, malonat, benzoat, và muối tương tự. Thảo luận kỹ về tá dược dược dụng có trong tài liệu REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co, N.J. 1991).

Theo một số phương án có liên quan đến việc chuyển dưới võng mạc và/hoặc CNS, tá dược dược dụng có thể bao gồm chất mang dược dụng. Các chất mang dược dụng như vậy có thể là chất lỏng vô trùng, như nước và dầu, bao gồm các dầu có nguồn gốc từ dầu mỏ, động vật, thực vật hoặc tổng hợp, như dầu lạc, dầu đậu tương, dầu khoáng, và các dầu tương tự. Dung dịch nước muối và dung dịch dextroza, polyetylen glycol (PEG) và glyxerol gốc nước cũng có thể được sử dụng làm chất mang lỏng, cụ thể cho dung dịch dùng để tiêm. Các thành phần khác có thể cũng được sử dụng, ví dụ chất bảo quản, chất đệm, chất tạo trương lực, chất chống oxy hóa và chất làm ổn định, chất làm ẩm hoặc làm sạch không ion, chất làm tăng độ nhớt, và chất tương tự. Bộ kit được mô tả trong bản mô tả này có thể được bao gói ở dạng liều đơn vị đơn lẻ hoặc ở dạng đa liều. Các thành phần chứa trong bộ kit thường được tạo chế phẩm dưới dạng dung dịch tiệt trùng và về cơ bản là đẳng trương.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được hiểu một cách đầy đủ hơn dựa vào các ví dụ sau. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng các ví dụ này không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế. Cần phải hiểu rằng các ví dụ và phương án được mô tả trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích minh họa và nhiều cải biến hoặc thay đổi khác nhau của các ví dụ và phương án này sẽ được đề xuất bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và được bao gồm trong tinh thần và phạm vi của sáng chế và phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ đính kèm.

Ví dụ 1: Đột biến ở các gốc arginin cần cho sự chuyển nạp qua trung gian AAV2 làm giảm sự liên kết HSPG trong dòng tế bào được nuôi cấy

Vectơ liệu pháp gen AAV2 hiện nay được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng đối với các dấu hiệu ở mắt. Các vectơ này có thể được chuyển bằng cách sử dụng qua đường trong thủy tinh thể, mà ở chuột và động vật linh trưởng không phải người dẫn đến sự chuyển nạp của tế bào hạch và tế bào Müller võng mạc, hoặc bằng cách sử dụng qua đường dưới võng mạc, mà hướng đích vào tế bào biểu mô sắc tố võng mạc và tế bào nhận kích thích ánh sáng. Các typ huyết thanh khác nhau của AAV sử dụng các thụ thể và đồng thụ thể bề mặt tế bào khác nhau để gây nhiễm. Đã biết rằng thụ thể bề mặt tế bào sơ cấp đối với AAV2 là heparan sulfat proteoglycan (HSPG) (Summerford, C. and Samulski, R.J. (1998) *J. Virol.* 72(2):1438-45). Hiểu được cơ chế là AAV2 gây ra sự chuyển nạp cho võng mạc là điều quan trọng để phát triển thêm vectơ liệu pháp gen AAV.

Để nghiên cứu vai trò của sự liên kết HSPG trong sự chuyển nạp AAV2 của võng mạc, vectơ AAV2 được tạo ra có protein capsit mang đột biến ở các gốc arginin đã biết là cần cho sự liên kết HSPG (AAV2 HBKO). Các vectơ này gây ra sự chuyển nạp giảm đáng kể của tế bào 293 và tế bào Hela trong môi trường nuôi cấy, so với AAV2 kiểu dại. Đáng ngạc nhiên là, vectơ AAV2 HBKO được chuyển dưới võng mạc vào mắt chuột dẫn đến sự tăng lên 2-log của sự chuyển nạp so với AAV2 kiểu dại. Tuy nhiên, khi vectơ AAV2 HBKO được chuyển trong thủy tinh thể, không có sự chuyển nạp nào rõ ràng. Kết quả này cho thấy rằng đột biến ở các axit amin cần cho sự liên kết HSPG có tác dụng trái ngược lên hiệu quả chuyển nạp theo cách tiêm dưới võng mạc so với tiêm trong thủy tinh thể của hạt AAV2.

Phương pháp

Cấu trúc của plasmit đột biến arginin AAV2

Plasmit rep/cap AAV2, pIM45BD, được gây đột biến bằng cách sử dụng Bộ Kit Gây Đột Biến Hướng Đa Vị Trí Quikchange Lightning (Agilent Technologies).

Đoạn mồi gây đột biến PCR được thiết kế để đưa sự thay đổi arginin 585 và 588 thành alanin. Đột biến dương tính được xác nhận bằng cách đọc trình tự.

Tạo ra vectơ rAAV

Vectơ AAV tái tổ hợp biểu hiện protein huỳnh quang xanh lá cây tăng cường (EGFP) hoặc thể lai thụ thể VEGF hòa tan (sFLT02) được sản xuất bằng cách chuyển ba lần tế bào 293 bằng cách sử dụng plasmit rep/cap pIM45BD hoặc pIM45BDR585A/R588A và pAdHelper. Gen chuyển chịu sự kiểm soát của vùng khởi đầu β-actin ở gà (CBA) hoặc vùng khởi đầu rhođopsin kinaza ở người (RK).

Thử nghiệm chuyển nạp *in vitro*

Tế bào 293 hoặc tế bào HeLa được cho vào đĩa 24 giếng ($1 - 2 \times 10^5$ tế bào trong mỗi giếng). 24 giờ sau khi cho vào đĩa, tế bào được lây nhiễm bằng 1×10^3 vg/tế bào (+) Ad5ts149. Hiệu quả chuyển nạp được đo 48 giờ sau khi gây nhiễm bằng huỳnh quang EGFP hoặc bằng ELISA để định lượng sFLT02 trong môi trường (ELISA VEGF R1 hòa tan ở người của R&D Systems).

Động vật

Chuột C57BL/6 trưởng thành thu được từ Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) được mua và được nuôi ở vườn thú Genzym. Các con vật được cho tiếp cận tự do đến thức ăn và nước uống trong thời gian thí nghiệm. Tất cả các quy trình được tiến hành theo giao thức được phê chuẩn bởi Ủy Ban Hướng Dẫn Chăm Sóc Và Sử Dụng Động Vật Thí Nghiệm.

Tiêm trong thủy tinh thể

Gây ra và duy trì trạng thái lờ đờ bằng cách sử dụng 3,5 % isofluran mang trong 800 ml/phút oxy được chuyển vào con vật thông qua mũi côn. Tiêm một micro lít vật phẩm thí nghiệm vào dịch thủy tinh thể bằng cách sử dụng ống tiêm Hamilton được lắp với kim vát khổ 33 (Hamilton Co, Reno, NV). Hướng kim qua màng cứng xấp xỉ 2 mm dưới rìa và tiến thêm cẩn thận vào khoang thủy tinh thể để tránh tiếp xúc với thấu kính. Vật phẩm thí nghiệm được chuyển trong khoảng thời gian 1–2 giây.

Sau khi tiêm, giữ kim tại chỗ trong xấp xỉ năm giây trước khi rút ra. Để cho con vật hồi phục từ trạng thái gây mê trước khi đưa trở lại lồng.

Tiêm dưới võng mạc

Gây giãn đồng tử và liệt cơ thể mi bằng cách sử dụng tại chỗ Tropicamit (Alcon, Fort Worth, TX). Gây ra và duy trì trạng thái lờ đờ bằng cách sử dụng 3,5 % isofluran mang trong 800 ml/phút oxy được chuyển vào con vật thông qua mũi côn. Giữ cố định mắt bằng cách sử dụng kẹp đầu tròn (World Precision Instruments, Sarasota, FL) và đặt đường rạch dẫn đường xấp xỉ 2 mm dưới rìa một trong các màng cứng bằng cách sử dụng kim khổ 30. Hướng kim đầu tù khổ 33 qua đường rạch và tiến về phía sau đến khi đầu chọc vào võng mạc thần kinh cảm giác phía sau. Một micro lít vật phẩm thí nghiệm được chuyển trong một giây. Giữ kim tại chỗ trong xấp xỉ năm giây trước khi rút ra. Để cho con vật hồi phục từ trạng thái gây mê trước khi đưa trở lại lồng.

Mô học đối với EGFP

Quan sát tín hiệu EGFP thô bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang EPI trên mắt được cố định bằng formalin được xử lý để nhúng parafin.

Kết quả

Như minh họa trên **Hình 1**, năm gốc capsit được thể hiện có vai trò thiết yếu đối với sự liên kết AAV2 với HSPG. Thể đột biến AAV2 được tạo cấu trúc tại ra sự thế axit amin ở các gốc này: R585A và R588A (đánh số là dựa trên trình tự axit amin VP1). Thể đột biến này, được gọi là HBKO, được thử nghiệm về khả năng chuyển nạp tế bào trong môi trường nuôi cấy.

Dòng tế bào người được cho sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy và được chuyển nạp bằng hạt AAV2 kiểu dại hoặc đột biến HBKO. Để đo hiệu quả chuyển nạp, hệ gen virut thuộc cả hai loại của hạt AAV2 được cải biến để bao gồm gen chuyển bằng cách sử dụng vùng khởi đầu CBA phổ biến để làm biểu hiện Flt hòa tan (thụ thể VEGF ở người 1). 48 giờ sau khi chuyển nạp, hiệu quả chuyển nạp được đo

bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch trên cơ sở ELISA để định lượng hàm lượng của Flt được sản xuất ra. **Hình 2** chứng tỏ rằng thể đột biến HBKO thể hiện khả năng chuyển nạp tế bào 293 ở người giảm đi nhiều trong môi trường nuôi cấy. Sử dụng số lượng hạt AAV2 và tế bào 293 bằng nhau, thể đột biến HBKO thể hiện hiệu quả chuyển nạp giảm 99, 6% so với kiểu dại.

Để đo hiệu quả này ở nhiều dòng tế bào người, tế bào 293 và tế bào Hela được chuyển nạp như được mô tả ở trên. Đối với các thử nghiệm này, vectơ được cải biến để biểu hiện EGFP, chứ không phải là Flt, từ vùng khởi đầu CBA. **Hình 3** thể hiện rằng AAV2 kiểu dại có thể chuyển nạp cả hai dòng tế bào, khi đo bằng huỳnh quang EGFP. Ngược lại, thể đột biến HBKO có sự giảm đột ngột của sự chuyển nạp của cả hai dòng tế bào. Kết quả này xác nhận rằng thể đột biến HBKO có khả năng chuyển nạp các dòng tế bào thận phôi người và ung thư cổ giảm đột ngột trong môi trường nuôi cấy.

Ví dụ 2: Đột biến ở các gốc arginin cần cho sự liên kết HSPG có tác dụng trái ngược lên sự chuyển nạp qua trung gian AAV2 sau khi tiêm trong thủy tinh thể so với tiêm dưới võng mạc

Khả năng của hạt AAV2 đột biến HBKO để chuyển nạp tế bào mắt khi tiêm trong thủy tinh thể và tiêm dưới võng mạc được thử nghiệm ở chuột. **Các Hình 4A & 4B** so sánh hiệu quả chuyển nạp của hạt AAV2 kiểu dại và HBKO khi tiêm trong thủy tinh thể hoặc tiêm dưới võng mạc. Đối với các thí nghiệm này, hiệu quả chuyển nạp được thử nghiệm bằng cách đo sự biểu hiện Flt hòa tan (sFLT) khi chuyển nạp bằng hạt AAV2 mang gen chuyển mà sử dụng vùng khởi đầu CBA phổ biến để làm biểu hiện Flt. Bằng cách tiêm trong thủy tinh thể, thể đột biến HBKO thể hiện khả năng chuyển nạp tế bào giảm đi nhiều (**Hình 4A**).

Đáng ngạc nhiên là, thể đột biến HBKO thể hiện sự chuyển nạp tăng lên sau khi tiêm dưới võng mạc (**Hình 4B**). Sự tăng lên này được quan sát thấy một cách nhất quán khi hàm lượng của hệ gen vectơ AAV2 được tiêm thay đổi 10 lần (10^8 và 10^9 vg, như được gắn nhãn). Kết quả này ngược với những gì quan sát được ở dòng tế

bào được nuôi cấy và khi tiêm tiêm trong thủy tinh thể. Dữ liệu này chỉ ra tầm quan trọng của khả năng liên kết HSPG trong việc làm trung gian cho sự chuyển nạp của các loại tế bào mắt và các lớp võng mạc khác nhau bằng các kiểu tiêm trong mắt khác nhau.

Để hình dung sự chuyển nạp của tế bào võng mạc, hạt AAV2 kiểu dại hoặc đột biến HBKO mang gen chuyển biểu hiện EGFP từ vùng khởi đầu CBA phổ biến được sử dụng. Như được thể hiện trên **Hình 5**, hạt AAV2 kiểu dại có thể chuyển nạp võng mạc sau khi tiêm trong thủy tinh thể, như được kiểm chứng bằng huỳnh quang GFP. Tuy nhiên, hạt đột biến AAV2 HBKO không thể hiện huỳnh quang GFP có thể phát hiện được khi tiêm tiêm trong thủy tinh thể. Kết quả này thống nhất với kết quả được thể hiện trên **Hình 4A**.

Hình 6 định lượng hiệu quả chuyển nạp của hạt AAV2 kiểu dại (AAV2 CBA) và hạt AAV2 đột biến HBKO (AAV2 CBA HBKO) khi tiêm dưới võng mạc. Để đo sự chuyển nạp, cả hai hạt AAV2 đều có hệ gen vectơ chứa gen chuyển để biểu hiện Flt có sử dụng vùng khởi đầu CBA phổ biến. Hai hàm lượng của hệ gen vectơ được sử dụng để tiêm, như thể hiện trên **Hình 6**. Kết quả này xác nhận sự quan sát được thể hiện trên **Hình 4B** và chứng tỏ phát hiện bất ngờ rằng các gốc đột biến cần cho sự liên kết HSPG làm tăng khả năng của AAV2 để chuyển nạp tế bào sau khi tiêm dưới võng mạc.

Để hình dung sự chuyển nạp, hạt AAV2 kiểu dại hoặc đột biến HBKO mang gen chuyển biểu hiện EGFP từ vùng khởi đầu CBA phổ biến được sử dụng. Như được thể hiện trên **Hình 7**, huỳnh quang GFP ở võng mạc được tăng cường khi chuyển nạp bằng hạt AAV2 đột biến HBKO, khi so với kiểu dại.

Vì việc tiêm dưới võng mạc được biết là để hướng đích các lớp tế bào có tế bào nhận kích thích ánh sáng, khả năng của hạt AAV2 đột biến HBKO để chuyển nạp tế bào tiếp nhận kích thích ánh sáng được nghiên cứu. Ở mắt, vùng khởi đầu rhođopsin kinaza (RK) đã được biết là làm biểu hiện cụ thể là ở tế bào nhận kích thích ánh sáng, chẳng hạn như tế bào hình que và tế bào hình nón (Khani, S.C., *et al.* (2007) *Invest.*

Ophthalmol. Vis. Sci. 48(9):3954-61). Do đó, hạt AAV2 kiểu dại và đột biến HBKO được tạo ra có hệ gen vectơ mang gen chuyển bằng cách sử dụng vùng khởi đầu RK để làm biểu hiện Flt. Như được thể hiện trên **Hình 8**, hạt AAV2 đột biến HBKO thể hiện sự chuyển nạp tăng lên của tế bào nhận kích thích ánh sáng sau khi tiêm dưới võng mạc, khi so với kiểu dại. Kết quả quan sát này thống nhất với kết quả quan sát được khi tiêm bằng các hàm lượng khác nhau 10 lần của hệ gen vectơ (10^8 và 10^9 vg, như được gắn nhãn). Kết quả này chứng tỏ kết quả bất ngờ rằng các gốc đột biến cần cho sự liên kết HSPG làm tăng cường khả năng của hạt AAV2 để chuyển nạp tế bào nhận kích thích ánh sáng võng mạc sau khi tiêm dưới võng mạc. Đột biến của các gốc này thể hiện con đường tiềm năng làm tăng cường sự chuyển nạp của tế bào nhận kích thích ánh sáng đối với liệu pháp gen qua trung gian AAV2.

AAV là virut ADN không vỏ, sợi đơn thuộc họ parvovirus. Các typ huyết thanh khác nhau của AAV bao gồm AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, *v.v* thể hiện các biên dạng phân bố mô khác nhau. Tính hướng mô đa dạng của các capsit AAV này giúp cho vectơ gốc AAV có thể được sử dụng cho các ứng dụng chuyển gen phổ biến cả in vitro và in vivo cho gan, cơ xương, não, võng mạc, tim và dây sống (Wu, Z., *et al.*, (2006) *Molecular Therapy*, 14: 316-327). Sự gắn của virut vào tế bào chủ đòi hỏi sự tương tác đặc hiệu của capsit virut với phân tử thụ thể tế bào. Capsit AAV2 đã được thể hiện trước đây là để sử dụng heparan sulfat proteoglycan (HSPG), V 5 integrin và người thụ thể yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi 1 làm thụ thể bậc một và bậc hai để làm trung gian cho sự thâm nhập tế bào của liệu pháp gen vectơ gốc AAV2 (Summerford, C. và R.J. Samulski (1998) *J. Virology*, 72: 1438-1445; Summerford, C. *et al.*, (1999) *Nat. Medicine*, 5: 78-82; Qing, K., *et al.*, (1999) *Nat. Medicine*, 5: 71-77). Phân tích đột biến của protein capsit AAV2 cho thấy rằng nhóm các axit amin cơ bản cụ thể là arginin R484, R487, R585, R588 và lysin K532 góp phần vào sự liên kết heparan và sự chuyển nạp in vitro của tế bào và sự chuyển nạp gan in vivo của vectơ AAV2. Đột biến ở các gốc axit amin này dẫn đến sự chuyển nạp gan giảm đi nhiều của vectơ gốc AAV2 theo đường trong tĩnh mạch để sử dụng và sự chuyển gen tim và cơ xương tăng lên (Kern, A. *et al.*, (2003) *J.*

Virology, 77: 11072-11081; Muller, O.J. *et al.*, (2006) *Cardiovascular Research*, 70: 70-78).

Vai trò cả các axit amin cơ bản này được nghiên cứu đối với sự chuyển nạp của vectơ AAV2 ở võng mạc cả theo đường trong thủy tinh thể và theo đường dưới võng mạc của việc sử dụng vectơ. Đột biến R585 và R588 triệt tiêu đáng kể sự chuyển nạp in vitro của tế bào HEK293 và tế bào HeLa (**Các Hình 2** và **3**). Dalkara D *et al.*, ((2009) *Molecular Therapy*, 17: 2096-2102) đề xuất rằng vectơ AAV2 được chuyển trong thủy tinh thể không thể thâm nhập vào võng mạc ngoài do sự liên kết với heparan sulfat proteoglycan mà dư thừa trong màng giới hạn trong của võng mạc. Như được thể hiện trong các ví dụ này, khi chuyển bằng cách tiêm trong thủy tinh thể vectơ đột biến R585/R588 có khả năng chuyển nạp võng mạc trong nhỏ hơn so với vectơ AAV2 kiểu dại (**Các Hình 4A** và **5**) cho thấy rằng sự liên kết với HSPG là yếu tố quan trọng để chuyển nạp trong thủy tinh thể của võng mạc. Việc chuyển dưới võng mạc của vectơ gốc AAV2 dẫn đến sự chuyển nạp biểu mô sắc tố võng mạc (RPE) và sự chuyển nạp một số tế bào nhận kích thích ánh sáng vượt trội. Đáng ngạc nhiên là, đã phát hiện ra rằng vectơ đột biến R585/R588 chuyển nạp võng mạc ngoài tốt hơn ít nhất là 10 lần so với vectơ AAV2 kiểu dại (**Các Hình 4B, 6,** và **7**). Bằng cách sử dụng vùng khởi đầu rhođopsin kinaza (RK) đặc hiệu tế bào nhận kích thích ánh sáng, sự biểu hiện gen chuyển ở tế bào tiếp nhận kích thích ánh sáng được làm tăng lên đáng kể bằng vectơ đột biến R585/R588 AAV2 (**Hình 8**). Các vectơ dựa trên các đột biến ở các gốc axit amin cơ bản trên capsit AAV2 sẽ có ích để chuyển nạp võng mạc ngoài đặc biệt là tế bào nhận kích thích ánh sáng để điều trị nhiều rối loạn võng mạc.

Ví dụ 3: Sự biểu hiện GFP phổ biến sau khi chuyển vectơ AAV2 HBKO trong thể vân

Thông qua đột biến định hướng vị trí được đưa vào capsit AAV2, vectơ đột biến AAV2 HBKO được tạo ra không thể liên kết heparin. Biên dạng chuyển nạp của

vectơ HBKO này được đánh giá ở cả mẫu chuột kiểu dại và mẫu chuột HD (YAC128) bằng cách sử dụng mũi tiêm trong thể vân đơn lẻ.

Phương pháp

Cấu trúc của plasmit đột biến arginin AAV2

Plasmit rep/cap AAV2, pIM45BD, được gây đột biến bằng cách sử dụng Bộ Kit Gây Đột Biến Hướng Đa Vị Trí Quikchange Lightning (Agilent Technologies). Đoạn mồi gây đột biến PCR được thiết kế để đưa vào sự thay đổi arginin thành alanin ở các gốc 585 và 588. Đột biến dương tính được xác nhận bằng cách đọc trình tự.

Sản xuất vectơ AAV

Vectơ AAV tái tổ hợp được sản xuất bằng cách chuyển nạp ba thành phần (bằng cách sử dụng canxi phosphat) của tế bào 293 carcinom thận phôi người (HEK-293) như đã được mô tả (Xiao *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:2224-2232). Tóm lại, plasmit chứa gen rep từ typ huyết thanh 2 và gen capsit từ typ huyết thanh 1, hoặc 2 cùng với plasmit ađenovirut trợ giúp (Stratagene, Palo Alto, CA) được sử dụng. Gen chuyển chịu sự kiểm soát của vùng khởi đầu beta-actin ở gà (CBA). Thu lấy virut 72 giờ sau khi chuyển nạp và tinh chế cột như đã được mô tả (Xiao *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:2224-2232).

Động vật

Tất cả các quy trình được tiến hành bằng cách sử dụng quy trình được phê chuẩn bởi Ủy Ban Hướng Dẫn Chăm Sóc Và Sử Dụng Động Vật Thí Nghiệm ở Genzym, công ty Sanofi (Phòng Dịch Vụ Sức Khỏe Và Con Người, Công bố NIH 86–23). Các con chuột được sử dụng bao gồm chuột YAC128 (nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men mang gen chuyển đột biến *HTT* ở người chiều dài đầy đủ có 128 đoạn lặp CAG trên nền tảng FVB/NJ tinh khiết) và các con chuột cùng lứa FVB/NJ kiểu dại (Slow *et al.* (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567; Van Raamsdonk *et al.* (2005) *Hum. Mol. Genet.* 14:3823-3835). Cả hai lứa chuột YAC128 và FVB/NJ đều thu được từ đàn Genzym mà được nuôi ở Charles River Laboratories. Các con chuột

được duy trì trong chu kỳ sáng/tối 12 giờ có sẵn thức ăn và nước uống *tùy thích*. Tất cả các thử nghiệm hành vi được thực hiện ở chu kỳ sáng của các con vật (ở giữa 8 giờ sáng và 4 giờ chiều). Giá trị n đối với tất cả các thí nghiệm được thể hiện trong Bảng 2 và Bảng 3 dưới đây.

Bảng 2. Chuột kiểu dại được điều trị bằng hạt AAV biểu hiện GFP (thí nghiệm 1).

Điều trị	**Giá trị n (chuột WT)**	**Liều lượng (DRP)**
AAV2 HBKO-CBA-GFP	6	$6x10^9$
AAV2-CBA-GFP	6	$6x10^9$

Bảng 3. Chuột YAC128 được điều trị bằng hạt AAV biểu hiện miARN Htt và GFP (thí nghiệm 2).

Điều trị	**Giá trị n (chuột YAC128)**	**Liều lượng (DRP)**
AAV2 HBKO-CBA-miARN-Htt-GFP	8	$6x10^9$
AAV1-CBA-miARN-Htt-GFP	8	$1,5x10^{10}$
Không được điều trị	8	Không áp dụng

Quy trình phẫu thuật

Các con vật được gây mê bằng cách sử dụng 3% isofluoran và được đặt vào khung cố định không gian. Tiến hành tiêm trong sọ như đã được mô tả (Stanek *et al.* (2014) *Hum. Gene Ther.* 25:461-474). Tóm lại, 3 µl của vectơ virut tái tổ hợp được tiêm vào thể vân (AP, +0,50; ML, ±2,00; DV, −2,5 từ thóp và màng cứng; thanh răng

cửa, 0,0) bằng cách sử dụng ống tiêm Hamilton 10 µl ở tốc độ bằng 0,5 µl/phút. Giữ kim tại chỗ trong thời gian 1 phút sau khi hoàn thành việc truyền. Một giờ trước khi phẫu thuật và trong vòng 24 giờ sau khi phẫu thuật, các con chuột được sử dụng ketoprofen (5 mg/kg) dưới da để gây mê.

Truyền dịch cho con vật và thu lấy mô

Các con chuột được truyền dịch qua tim bằng nước muối đệm phosphat (PBS) để loại bỏ toàn bộ máu. Đối với thí nghiệm 1, não được cắt dọc theo mặt phẳng trán đỉnh, cố định sau trong 4% paraformalđehyt sau đó là 30% sucroza. Các phần trán đỉnh 20 µm được cắt bằng cách sử dụng bộ điều nhiệt. Đối với thí nghiệm 2, não được cắt đối xứng dọc theo đường giữa, và bán cầu não trái được cố định sau trong 4% paraformalđehyt sau đó là 30% sucroza và sau đó được chia phần thành các phần 20 µm bằng cách sử dụng bộ điều nhiệt. Bán cầu não phải (dùng cho các thử nghiệm hóa sinh) được cắt dọc theo trục trán đỉnh bằng cách sử dụng nền não chuột (Harvard Apparatus, Holliston, MA), và các vùng thể vân và vỏ não được cắt ra bằng cách sử dụng cái bấm sinh thiết 3 mm. Sau đó mô não được kết đông nhanh trong nitơ lỏng và lưu trữ ở nhiệt độ -80°C đến khi sử dụng.

PCR thời thực định lượng (TaqMan)

Đo hàm lượng ARN bằng RT-PCR thời thực định lượng. Các lỗ thể vân được sử dụng cho tất cả các phân tích RT-PCR. Chiết ARN tổng số bằng cách sử dụng bộ mini kit QIAGEN RNEasy và sau đó được phiên mã ngược và khuếch địa bằng cách sử dụng bộ kit hỗn hợp TaqMan® One-Step RT-PCR Master (Applied Biosystems) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các phản ứng RT-PCR định lượng TaqMan được tiến hành và được phân tích trên hệ thống PCR thời thực ABI PRISM® 7500 (Applied Biosystems). Mức độ biểu hiện của *HTT* mARN được chuẩn hóa thành hàm lượng mARN hypoxanthin guanin phosphoribosyl transferaza 1 (*HPRT1*). Các được cong tiêu chuẩn được tạo ra bằng cách sử dụng dịch pha loãng theo dãy 5 lần của cADN não chuột. Mỗi mẫu được chạy ở hai bản sao. Sự biểu hiện gen tương đối được xác định bằng cách sử dụng phương pháp đường cong tiêu chuẩn hoặc $\Delta\Delta C_T$ và

chuẩn hóa thành hàm lượng mARN *HPRT1*. Để phát hiện *HTTHTT* ở người, các đoạn mồi sau đây được sử dụng: 5' CTCCGTCCGGTAGACATGCT 3' và 5' CCATTTTGAGGGTTCTGATTTCC 3'. Để phát hiện *HTTHTT* ở chuột, các đoạn mồi sau đây được sử dụng: 5' TGCTACACCTGACAGCGAGTCT 3' và 5' ATCCCTTGCGGATCCTATCA 3'.

Thẩm tách Western

Đo hàm lượng protein bằng phân tích thẩm tách Western. Các lỗ vỏ não được sử dụng cho tất cả các phân tích thẩm tách Western. Các mô, ở nồng độ cuối cùng là 50 mg/ml trong chất đệm phân giải T-Per (Pierce) và chứa hỗn hợp chất ức chế proteaza hoàn chỉnh (Roche), được đồng nhất hóa. Dịch đồng nhất được làm sạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 10.000 ×*g* trong thời gian 6 phút ở nhiệt độ 4°C. Nồng độ protein được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm BSA (Pierce). Từ hai mươi đến ba mươi microgam của dịch đồng nhất được hòa tan trên gel tris-axetat Novex 3-8% và sau đó được chuyển vào màng nitroxenluloza. Các màng này được dò bằng kháng thể đơn dòng kháng-huntingtin ở chuột (Mab2166; 1:2,000 dilution, Millipore) và kháng thể kháng-β-tubulin đa dòng ở thỏ (dịch pha loãng 1:750, Santa Cruz Biotechnology). Sau đó các màng này được ủ với kháng thể thứ cấp được chiếu hồng ngoại (dịch pha loãng 1:20.000, Rockland), và các protein được làm cho có thể nhìn thấy được bằng huỳnh quang định lượng bằng cách sử dụng Odyssey (LI-COR Biosciences). Để kiểm soát các biến lượng tải, protein Htt được chuẩn hóa thành β-tubulin và được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ phần trăm của các con vật không được điều trị hoặc được điều trị bằng nước muối. Thành phần đánh dấu khối lượng phân tử được sử dụng để kiểm tra đặc trưng của protein.

Hóa mô miễn dịch

Các phần não đã được kết đông được nhuộm màu bằng kháng thể kháng-GFAP ở thỏ để nhuộm màu tế bào hình sao (1:2.500; DAKO, Glostrup, Đức) hoặc kháng thể kháng-Iba1 để trực quan hóa tiểu thần kinh đệm (1:500; WAKO Chemicals USA, Richmond, VA). Kháng thể thứ cấp được sử dụng là kháng thể kháng loài đặc hiệu ở

khỉ được kết hợp với FITC hoặc Cy3. Các phần này được làm cho có thể nhìn thấy được bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang Nikon Eclipse E800 (Nikon, Melville, NY).

Thống kê

Các giá trị trung bình được sử dụng để phân tích thống kê. Dữ liệu được biểu diễn dưới dạng ± SEM trung bình. Đối với các nghiên cứu mà sử dụng hai nhóm, t-test Student được sử dụng để so sánh thống kê. Để so sánh nhiều hơn hai nhóm, ANOVA một chiều được sử dụng sau đó là test post-hoc đa so sánh Tukey (Prism GraphPad). $p<0,05$ được coi như là khác biệt đáng kể về mặt thống kê.

Kết quả

Như được mô tả ở trên, vectơ AAV2-eGFP và AAV2 HBKO-GFP được tiêm vào chuột kiểu dại trong thí nghiệm 1 (Bảng 2). Tất cả các con vật bị giết chết 30 ngày sau khi tiêm. Kính hiển vi huỳnh quang cho thấy rằng cả hai vectơ AAV2 và AAV2 HBKO đều gây ra sự biểu hiện của gen chuyển GFP ở nơron được chuyển nạp (**Các Hình 9A&9B**). Sự biểu hiện GFP bị hạn chế ở vết tiêm đối với AAV2, với sự lan ra tối thiểu ngoài vị trí tiêm (**Hình 9B**). Tuy nhiên, khi so sánhvới AAV2 truyền thống, AAV2 HBKO gây ra sự biểu hiện GFP mạnh mẽ và lan rộng hơn, với sự biểu hiện quan sát được ở ngoài vị trí tiêm (**Hình 9A**). Kết quả này chứng tỏ sự biểu hiện mạnh mẽ và lan rộng của gen chuyển được chuyển vào CNS bằng cách sử dụng vectơ AAV2 HBKO.

Ví dụ 4: So sánh sự biểu hiện GFP qua trung gian AAV2 HBKO và AAV1 sau khi tiêm trong thể vân vào não chuột YAC128

Như được mô tả ở trên, vectơ typ huyết thanh AAV2 HBKO và AAV1 được tiêm vào chuột YAC128 trong thí nghiệm 2 (Bảng 3). Các vectơ này làm biểu hiện miARN nhân tạo hướng đích vào vùng báo cáo *HTT* và GFP ở người. Cả hai vectơ AAV1 và AAV2 HBKO đều thể hiện sự phân bố GFP mạnh mẽ 30 ngày sau khi tiêm vào thể vân (**Các Hình 10A&10B**). Tuy nhiên, mô hình của sự biểu hiện GFP có sự

khác biệt đáng kể giữa hai typ huyết thanh vectơ. Sự biểu hiện AAV1 của GFP (**Hình 10A**) rời rạc hơn và không đồng đều bằng sự biểu hiện GFP AAV2 HBKO (**Hình 10B**). Sự chuyển nạp vectơ dường như là riêng cho nơron trong não AAV2 HBKO so với typ huyết thanh AAV1 mà được chuyển nạp cả nơron và tế bào thần kinh đệm, chủ yếu là tế bào hình sao. Kết quả này chứng tỏ rằng AAV2 HBKO thể hiện sự biểu hiện và biên dạng chuyển nạp khác biệt lớn khi so với AAV1 truyền thống.

Ví dụ 5: Tiêm AAV2 HBKO-miARN-Htt cho chuột YAC128 dẫn đến sự giảm đi của mARN*HTT*

Tiếp theo, khả năng của typ huyết thanh vectơ AAV1 và AAV2 HBKO để làm biểu hiện sự biểu hiện *HTT* làm câm miARN trong thể vân của chuột YAC128 được đánh giá. Chuột YAC128 trưởng thành tiếp nhận mũi tiêm trong thể vân hia bên của AAV2/1-miARN-Htt hoặc AAV2 HBKO-miARN-Htt, và não được phân tích 30 ngày sau khi điều trị. Hàm lượng trong thể vân của mARN *HTT* ở người đột biến được làm giảm đáng kể ở chuột được tiêm bằng AAV2/1-miARN-Htt và AAV2 HBKO-miARN-Htt khi so với đối chứng không được điều trị (**Hình 11A**). Phân tích thẩm tách Western của các lỗ vỏ não thể hiện khuynh hướng giảm Htt ở cả hai nhóm điều trị; tuy nhiên, tính khả biến ở mẫu đối chứng không được điều trị ngăn dữ liệu đạt được đến mức đáng kể về mặt thống kê (**Hình 11B**). Kết quả này chứng tỏ hiệu quả của việc làm bất hoạt gen bằng ARNi bằng cách sử dụng vectơ AAV1 và AAV2 HBKO.

Ví dụ 6: Tiêm AAV2 HBKO-miARNHtt vào chuột YAC128 không gây ra viêm thần kinh

Để xác định xem việc tiêm AAV có gây ra viêm thần kinh hay không, hàm lượng của thành phần đánh dấu viêm thần kinh protein axit tơ thần kinh đệm (GFAP, thành phần đánh dấu của tế bào hình sao) và Iba1 (thành phần đánh dấu của tiểu thần kinh đệm) được khảo sát vào 30 ngày sau khi điều trị. Không quan sát thấy sự tăng lên đáng kể ở hàm lượng Iba1 sau khi điều trị bằng AAV2HKO, so với não không được điều trị (cf. **Các Hình 12A** và **12B**). Tuy nhiên, việc điều trị bằng AAV2/1 gây

ra sự tăng lên ở hàm lượng Iba1 ở vị trí tiêm (**Hình 12C**) mà đã được quan sát thấy từ trước. Không quan sát thấy sự tăng đáng kể ở hàm lượng GFAP ở não được điều trị bất kỳ 30 ngày sau khi tiêm so với đối chứng không được điều trị (**Các Hình 13A-13C**). Kết quả này cho thấy rằng AAV2 HBKO có thể làm biểu hiện miARN theo hướng *HTT* ở người và tạo ra sự giảm *HTT* khi không hoạt hóa tiểu thần kinh đệm, khi so với typ huyết thanh AAV1.

Kết luận

Các typ huyết thanh vectơ AAV hiện nay thể hiện sự phân bố hạn chế trong não sau khi sử dụng cho vị trí đơn lẻ (*ví dụ*, Christine, C.W. *et al.* (2009) *Neurology* 73:1662-1669; Mandel, R.J. (2010) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12:240-247). Như thảo luận chi tiết trong bản mô tả này, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng việc sử dụng vectơ AAV làm giảm sự liên kết với heparan-sulfat proteoglycan (HSPG) trên bề mặt tế bào làm tăng cường sự chuyển nạp AAV trong CNS. Kết quả này chứng tỏ việc sử dụng AAV đã làm thay đổi sự liên kết HSPG cho liệu pháp gen CNS tại đó mong muốn có sự phân bố vectơ lan rộng. Ngoài ra, các tác giả sáng chế cũng đã phát hiện ra rằng vectơ AAV2 có sự liên kết HSPG giảm đi thể hiện biên dạng an toàn lý tưởng (vì chúng chỉ hướng đích vào nơron), trong khi vẫn đạt được hiệu quả chuyển nạp lan rộng và mạnh mẽ. Do đó, các vectơ này hữu dụng để chỉ định CNS mà đòi hỏi sự chuyển nạp nơron lan rộng từ việc chuyển trong nhu mô.

Ví dụ 7: Sự chuyển nạp *in vitro* và dưới võng mạc bằng vectơ đột biến AAVrh8R và AAVrh8R

Phương pháp

Cấu trúc của plasmit cải biến arginin AAVrh8R

Plasmit rep/cap AAVrh8R được gây đột biến bằng cách sử dụng Bộ Kit Gây Đột Biến Hướng Đa Vị Trí Quikchange Lightning (Agilent Technologies). Đoạn mồi gây đột biến PCR được thiết kế để đưa sự thay đổi alanin 586 thành arginin

(AAVrh8R-A586R) hoặc arginin 533 thành alanin (AAVrh8R-R533A). Đột biến dương tính được xác nhận bằng cách đọc trình tự.

Tạo ra vectơ rAAV

Vectơ AAV tái tổ hợp biểu hiện protein huỳnh quang màu xanh lá cây tăng cường (EGFP) hoặc thể lai thụ thể VEGF hòa tan (sFLT02) được sản xuất bằng cách chuyển nạp ba thành phần đối với tế bào 293 bằng cách sử dụng plasmit rep/cap pAAVrh8R, pAAVrh8R-A586R hoặc pAAVrh8R-R533A và pAdHelper. Gen chuyển chịu sự kiểm soát của vùng khởi đầu β-actin (CBA) ở gà.

Thử nghiệm chuyển nạp *in vitro*

Tế bào HeLa, tế bào HeLaRC32 hoặc tế bào NS1 được cho vào đĩa 24 giếng (1 – 2 x10^5 tế bào trong mỗi giếng). 24 giờ sau khi cho vào đĩa, tế bào được lây nhiễm bằng 1 x 10^4 vg/tế bào - 1 x 10^5 vg/tế bào (+) Ad5ts149. Hiệu quả chuyển nạp được đo 48 giờ sau khi gây nhiễm bằng huỳnh quang EGFP hoặc bằng ELISA để định lượng sFLT02 trong môi trường (ELISA VEGF R1 hòa tan ở người của R&D Systems).

Động vật.

Chuột C57BL/6 trưởng thành thu được từ Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) được mua và được nuôi ở vườn thú. Các con vật được cho tiếp cận tự do đến thức ăn và nước uống trong thời gian thí nghiệm. Tất cả các quy trình được tiến hành theo giao thức được phê chuẩn bởi Ủy Ban Hướng Dẫn Chăm Sóc Và Sử Dụng Động Vật Thí Nghiệm.

Tiêm dưới võng mạc.

Gây giãn đồng tử và liệt cơ thể mi bằng cách sử dụng tại chỗ Tropicamit (Alcon, Fort Worth, TX). Gây ra và duy trì trạng thái lờ đờ bằng cách sử dụng 3,5 % isofluran mang trong 800 ml/phút oxy được chuyển vào con vật thông qua mũi côn. Giữ cố định mắt bằng cách sử dụng kẹp đầu tròn (World Precision Instruments, Sarasota, FL) và đặt đường rạch dẫn đường xấp xỉ 2 mm dưới rìa một trong các màng

cứng bằng cách sử dụng kim khổ 30. Hướng kim đầu tù khổ 33 qua đường rạch và tiến về phía sau đến khi đầu chọc vào võng mạc thần kinh cảm giác phía sau. Một micro lít vật phẩm thí nghiệm được chuyển trong một giây. Giữ kim tại chỗ trong xấp xỉ năm giây trước khi rút ra. Để cho con vật hồi phục từ trạng thái gây mê trước khi đưa trở lại lồng.

Định lượng sFLT02 trong dịch tan võng mạc.

sFLT02 trong dịch tan tế bào võng mạc chuột được đo bằng cách sử dụng bộ kit ELISA VEGF R1 hòa tan ở người của R&D Systems.

Kết quả

Để nghiên cứu vai trò của các gốc arginin bề mặt capsit trong sự chuyển nạp AAVrh8 của võng mạc, vectơ AAVrh8 được tạo ra có protein capsit mang đột biến ở các gốc mà tương ứng với các arginin AAV2 tham gia vào sự liên kết HSPG. **Hình 14** so sánh năm gốc capsit có vai trò thiết yếu đối với sự liên kết AAV2 với HSPG với các gốc tương ứng trong AAVrh8R. Như được thể hiện trên **Hình 15**, hai thể đột biến AAVrh8R được tạo cấu trúc, mỗi thể đột biến mang sự thế axit amin ở các gốc này: A586R và R533A (đánh số là dựa trên trình tự axit amin VP1).

Để đánh giá hiệu quả của việc bổ sung các gốc arginin vào capsit AAVrh8R lên sự chuyển nạp *in vitro*, tế bào HeLa được lây nhiễm bằng vectơ AAVrh8R-sFLT02 hoặc AAVrh8R-A586R-sFLT02 cải biến mà có arginin được thêm vào ở vị trí A586 (AAVrh8R A586R), cả hai ở nồng độ 1 x 10^4 DRP/tế bào. 48 giờ sau khi gây nhiễm, hiệu quả chuyển nạp được đánh giá bằng cách đo sFLT02 trong môi trường nuôi cấy tế bào. AAVrh8R-A586R thể hiện sự chuyển nạp cao hơn vài lần so với AAVrh8R chưa cải biến (**Hình 16A**).

Để đánh giá hiệu quả của việc loại bỏ arginin capsit lên sự chuyển nạp *in vitro*, tế bào HeLaRC32 được lây nhiễm bằng vectơ AAVrh8R hoặc AAVrh8R-R533A (cả hai ở nồng độ 1 x 10^4 DRP/tế bào). AAVrh8R-R533A có sự chuyển nạp giảm đáng kể khi so với AAVrh8R (**Hình 16B**).

Các thí nghiệm tương tự được thực hiện bằng cách sử dụng sự biểu hiện EGFP làm phép đo hiệu quả chuyển nạp. AAVrh8R-A586R-EGFP thể hiện sự chuyển nạp được cải thiện đáng kể của tế bào NS1 so với AAVrh8R (so sánh **Hình 17B** với **Hình 17A**). Ngược lại, vectơ AAVrh8R-R533A-EGFP có sự chuyển nạp giảm đi trê tế bào HeLa so với AAVrh8R (so sánh **Hình 17D** với **Hình 17C**).

Tóm lại các thí nghiệm này đề xuất rằng việc bổ sung arginin vào capsit AAVrh8R làm cải thiện sự chuyển nạp AAVrh8R *in vitro* trong khi việc loại bỏ arginin từ capsit AAVrh8R làm suy yếu sự chuyển nạp *in vitro*. Kết quả này chứng tỏ rằng sự chuyển nạp *in vitro* bằng AAVrh8R bị ảnh hưởng mạnh bởi các gốc arginin trên capsit.

Để xác định ảnh hưởng của arginin lên sự chuyển nạp dưới võng mạc AAVrh8R, con chuột C57Bl6 được tiêm bằng 1 x 10^8 DRP của AAVrh8R, AAVrh8R-A586R, hoặc AAVrh8R-R533A biểu hiện sFLT02 từ vùng khởi đầu CBA. Các con chuột bị giết chết 30 ngày sau khi sử dụng vectơ, và sFLT02 được đo trong dịch tan tế bào võng mạc.

Sự chuyển nạp AAVrh8R-A586R của võng mạc chuột giảm đi đáng kể so với AAVrh8R và trên thực tế có thể so sánh được với AAV2, mà cũng có arginin ở cùng vị trí, R585 (**Hình 18A**). Sự chuyển nạp AAVrh8R-R533A của võng mạc chuột được cải thiện so với AAVrh8R (**Hình 18B**).

Dữ liệu này làm nổi bật ảnh hưởng của arginin capsit lên sự chuyển nạp dưới võng mạc của AAVrh8R và đề xuất rằng sự chuyển nạp dưới võng mạc được cải thiện bằng cách loại bỏ arginin khỏi capsit AAVrh8R. Kết quả này chứng tỏ rằng sự chuyển nạp dưới võng mạc bằng AAVrh8R bị ảnh hưởng mạnh bởi các gốc arginin trên capsit.

Ví dụ 8: Sự chuyển nạp trong thủy tinh thể của AAVrh8R được cải thiện bằng cách bổ sung arginin ở vị trí 586

Phương pháp

Tiêm trong thủy tinh thể

Gây ra và duy trì trạng thái lờ đờ bằng cách sử dụng 3,5 % isofluran mang trong 800 ml/phút oxy được chuyển vào con vật thông qua mũi côn. Tiêm một micro lít vật phẩm thí nghiệm vào dịch thủy tinh thể bằng cách sử dụng ống tiêm Hamilton được lắp với kim vát khổ 33 (Hamilton Co, Reno, NV). Hướng kim qua màng cứng xấp xỉ 2 mm dưới rìa và tiến thêm cẩn thận vào khoang thủy tinh thể để tránh tiếp xúc với thấu kính. Vật phẩm thí nghiệm được chuyển trong khoảng thời gian 1–2 giây. Sau khi tiêm, giữ kim tại chỗ trong xấp xỉ năm giây trước khi rút ra. Để cho con vật hồi phục từ trạng thái gây mê trước khi đưa trở lại lồng.

Định lượng sFLT02 trong dịch tan võng mạc

sFLT02 trong dịch tan tế bào võng mạc chuột được đo bằng cách sử dụng bộ kit ELISA VEGF R1 hòa tan ở người của R&D Systems.

Kết quả

Để đánh giá hiệu quả của việc bổ sung arginin vào capsit AAV lên sự chuyển nạp trong thủy tinh thể, con chuột C57Bl6 được tiêm bằng 1 x 10^9 DRP của AAV2, AAVrh8R, hoặc AAVrh8R-A586R, mỗi vectơ này mang cấu trúc làm biểu hiện sFLT02 từ vùng khởi đầu CBA. Các con chuột bị giết chết 30 ngày sau khi sử dụng vectơ, và sFLT02 được đo trong dịch tan tế bào võng mạc. Sự chuyển nạp AAVrh8R-A586R của võng mạc chuột được cải thiện so với AAVrh8R và trên thực tế có thể so sánh được với AAV2 mà cũng có arginin ở cùng vị trí, R585 (**Hình 19**). Dữ liệu này cho thấy rằng sự chuyển nạp trong thủy tinh thể của võng mạc có thể được cải thiện bằng cách bổ sung arginin vào capsit AAV. Dựa trên các kết quả này và sự tương đồng trình tự giữa các capsit AAV (**Hình 20**), sự chuyển nạp trong thủy tinh thể của võng mạc bằng hạt AAV mang capsit AAV1, AAV6, AAV8, AAV9, và AAVrh10 có thể cải thiện theo cách tương tự sự chuyển nạp võng mạc.

CÁC TRÌNH TỰ

Tất cả các trình tự polypeptit được thể hiện từ đầu cuối N đến đầu cuối C trừ khi có chỉ dẫn khác.

Tất cả các trình tự nucleic được thể hiện từ 5' đến 3' trừ khi có chỉ dẫn khác.

Trình tự axit amin AAV2 VP1

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQ
ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMA
TGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNN
HLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWG
FRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAH
QGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFT
FSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFS
QAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGR
DSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIR
TTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP
IWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFIT
QYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSE
PRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:1)

Trình tự axit amin AAV2 VP1 HBKO

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQ

ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMA
TGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNN
HLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWG
FRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAH
QGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFT
FSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFS
QAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGR
DSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIR
TTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQG
PIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFI
TQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYS
EPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:2)

Trình tự axit amin AAV2 VP2

MAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPL
GQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGD
RVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHC
HFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQ
VFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFY
CLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLS
RTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNS
EYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEK
TNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVL
PGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPV
PANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNK
SVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:3)

Trình tự axit amin AAV2 VP2 HBKO

MAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPL
GQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGD
RVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHC
HFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQ
VFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFY
CLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLS
RTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNS
EYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEK
TNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVL
PGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPV
PANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNK
SVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:4)

Trình tự axit amin AAV2 VP3

MATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPT
YNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINN
NWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVL
GSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRT
GNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQS
RLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYH
LNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITD
EEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDV
YLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAK
FASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTN
GVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:5)

Trình tự axit amin AAV2 VP3 HBKO

MATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPT
YNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINN
NWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVL
GSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRT
GNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQS
RLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYH
LNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITD
EEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDV
YLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAK
FASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTN
GVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:6)

Trình tự axit amin AAV3 VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGY
KYLGPGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAE
FQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQSPQ
EPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPTSLGSNTM
ASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYN
NHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNW
GFRPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSA
HQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNN
FQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQGTTSGTTNQSRL
LFSQAGPQSMSLQARNWLPGPCYRQQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHL
NGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNVMITD
EEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVY
LQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKF

ASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNG
VYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:7)

ITR đột biến đối với vectơ scAAV

CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG (SEQ ID NO:8)

Trình tự axit amin AAVrh8R VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPG
YKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA
EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP
QEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPSGLGPNTM
ASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYN
NHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNN
WGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNEGTKTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLG
SAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQALGRSSFYCLEYFPSQMLRTGN
NFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLVRTQTTGTGGTQTL
AFSQAGPSSMANQARNWVPGPCYRQQRVSTTTNQNNNSNFAWTGAAKFKL
NGRDSLMNPGVAMASHKDDEDRFFPSSGVLIFGKQGAGNDGVDYSQVLITD
EEEIKATNPVATEEYGAVAINNQAANTQAQTGLVHNQGVIPGMVWQNRDV
YLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPLTFNQA
KLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNT
EGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:9)

Trình tự axit amin AAVrh8R A586R đột biến VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPG
YKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA

EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP
QEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPSGLGPNTM
ASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYN
NHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNN
WGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNEGTKTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLG
SAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQALGRSSFYCLEYFPSQMLRTGN
NFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLVRTQTTGTGGTQTL
AFSQAGPSSMANQARNWVPGPCYRQQRVSTTTNQNNNSNFAWTGAAKFKL
NGRDSLMNPGVAMASHKDDEDRFFPSSGVLIFGKQGAGNDGVDYSQVLITD
EEEIKATNPVATEEYGAVAINNQRANTQAQTGLVHNQGVIPGMVWQNRDV
YLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPLTFNQA
KLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNT
EGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:10)

Trình tự axit amin AAVrh8R R533A đột biến VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPG
YKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA
EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP
QEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPSGLGPNTM
ASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYN
NHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNN
WGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNEGTKTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLG
SAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQALGRSSFYCLEYFPSQMLRTGN
NFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLVRTQTTGTGGTQTL
AFSQAGPSSMANQARNWVPGPCYRQQRVSTTTNQNNNSNFAWTGAAKFKL
NGRDSLMNPGVAMASHKDDEDAFFPSSGVLIFGKQGAGNDGVDYSQVLITD
EEEIKATNPVATEEYGAVAINNQAANTQAQTGLVHNQGVIPGMVWQNRDV
YLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPLTFNQA

KLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNT EGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:11)

Trình tự axit amin AAV1 VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPG YKYLGPFNGLD

KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSF GGNLGRAVFQ

AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLN FGQTGDSE

SVPDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHC DSTWLGDRVI

TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHF SPRDWQRL

INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSDSEYQLPY VLGSAHQ

GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS YTFEEVP

FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMS VQPKNWLP

GPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDE DKFFPMSGV

MIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQSSSTDPAT GDVHAMG

ALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKNPPPQILIKNT PVPANPPA

EFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVD FTVDNNGL

YTEPRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO:12)

Trình tự axit amin AAV6 VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPG YKYLGPFNGLD

KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSF GGNLGRAVFQ

AKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLN FGQTGDSE

SVPDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHC DSTWLGDRVI

TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHF SPRDWQRL

INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSDSEYQLPY VLGSAHQ

GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS YTFEDVP

FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMS VQPKNWLP

GPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDK DKFFPMSGV

MIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSSTDPAT GDVHVMG

ALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNT
PVPANPPA

EFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVD
FTVDNNGL

YTEPRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO:13)

Trình tự axit amin AAV8 VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPG
YKYLGPFNGLD

KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSF
GGNLGRAVFQ

AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPARKRL
NFGQTGDS

ESVPDPQPLGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWH
CDSTWLGDRV

ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHC
HFSPRDWQ

RLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQL
PYVLGSA

HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNF
QFTYTFED

VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNT
MANQAKNW

LPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHK
DDEERFFPSN

GILIFGKQNAARDNADYSDVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTA
PQIGTVNS

QGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIK
NTPVPADP

PTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSV
DFAVNTE

GVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:14)

Trình tự axit amin AAV9 VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPG
YKYLGPGNGLD

KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSF
GGNLGRAVFQ

AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLN
FGQTGDTE

SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCD
SQWLGDRVI

TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCH
FSPRDWQR

LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQL
PYVLGSAH

EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQ
FSYEFENV

PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMA
VQGRNYIP

GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEG
EDRFFPLSGS

LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQA
QTGWVQNQG

ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNT
PVPADPPT

AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVE
FAVNTEGV

YSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:15)

Trình tự axit amin AAVrh10 VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPG
YKYLGPFNGLD

KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSF
GGNLGRAVFQ

AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRL
NFGQTGDS

ESVPDPQPIGEPPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHC
DSTWLGDRV

ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHC
HFSPRDWQ

RLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQL
PYVLGSA

HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNF
EFSYQFED

VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNN MSAQAKNW

LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVNPGVAMATHK DDEERFFPSS

GVLMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQN AAPIVGAVNS

QGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIK NTPVPADP

PTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNV DFAVNTD

GTYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:16)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) để chuyển axit nucleic khác loại vào mắt của cá thể, trong đó hạt rAAV được bào chế để dùng hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV) vào phần dưới màng của cá thể, trong đó hạt rAAV bao gồm

a) capsit rAAV chứa:

(i) protein capsit AAV2 gồm có một hoặc nhiều sự thế axit amin tại các vị trí R585, K532 và R588, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin, leuxin, isoleuxin, hoặc valin; hoặc

(ii) protein capsit AAVrh8R gồm có sự thế axit amin tại vị trí R533 bằng gốc alanin, leuxin, isoleuxin, hoặc valin, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R;

và

b) vectơ rAAV chứa axit nucleic khác loại và ít nhất là một đoạn lặp cuối đảo ngược AAV.

2. Hạt rAAV theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin làm giảm sự liên kết của hạt rAAV với heparan sulfat proteoglycan.

3. Hạt rAAV theo điểm 1 hoặc 2, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin có chứa sự thế của gốc arginin hoặc lysin bằng gốc alanin.

4. Hạt rAAV theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-3, trong đó hạt rAAV chứa capsit AAV typ huyết thanh 2 (AAV2).

5. Hạt rAAV theo điểm 4, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin chứa sự thế R484A và R487A, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2.

6. Hạt rAAV theo điểm 4 hoặc 5, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin chứa sự thế R585A và R588A, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2.

7. Hạt rAAV theo điểm bất kỳ trong số các điểm 4-6, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin chứa sự thế K532A, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAV2.

8. Hạt rAAV theo điểm 4, trong đó hạt rAAV chứa một hoặc nhiều protein capsit rAAV có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 91%, ít nhất là khoảng 92%, ít nhất là khoảng 93%, ít nhất là khoảng 94%, ít nhất là khoảng 95%,

ít nhất là khoảng 96%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100% so với các SEQ ID NO:2, 4 hoặc 6.

9. Hạt rAAV theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-3, trong đó hạt rAAV chứa capsit AAV typ huyết thanh rh8R (AAVrh8R).

10. Hạt rAAV theo điểm 9, trong đó một hoặc nhiều sự thế axit amin chứa sự thế R533A, đánh số dựa trên sự đánh số VP1 của AAVrh8R.

11. Hạt rAAV theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-10, trong đó axit nucleic khác loại mã hóa cho polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm chất chống oxy hóa, yếu tố dinh dưỡng thần kinh, yếu tố chống chết tế bào theo chương trình, yếu tố chống tạo mạch, và yếu tố chống viêm.

12. Hạt rAAV theo điểm 11, trong đó axit nucleic khác loại mã hóa polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm: Prph2, RPE65, AIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, Clarin, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NFκB, Endostatin, Angiostatin, sFlt, sPDGF-R, IL10, anti-IL17, sIL17R, IL1-ra, anti-TGFβ, sTNF-RI, sTNF-R II và IL4.

13. Hạt rAAV theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-10, trong đó axit nucleic khác loại mã hóa axit nucleic trị liệu.

14. Hạt rAAV theo điểm 13, trong đó axit nucleic trị liệu là siRNA, shRNA, RNAi, miRNA, antisens RNA, ribozym hoặc DNAzym.

15. Hạt rAAV theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-14, trong đó axit nucleic khác loại chịu sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mà được biểu hiện ở võng mạc.

16. Hạt rAAV theo điểm 15, trong đó vùng khởi đầu là vùng khởi đầu rhođopsin kinaza (RK), vùng khởi đầu opsin, vùng khởi đầu virut cự bào (CMV), vùng khởi đầu β-actin ở gà (CBA).

17. Hạt rAAV theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-16, trong đó cá thể là con người.

18. Hạt rAAV theo điểm 17, trong đó axit nucleic khác loại được sử dụng để điều trị rối loạn ở mắt được chọn từ nhóm bao gồm: bệnh thoái hóa võng mạc khởi phát sớm nặng do gen lặn trên nhiễm sắc thể thường (bệnh mù lòa bẩm sinh Leber), chứng mù

màu bẩm sinh, bệnh Stargardt, bệnh Best, bệnh Doyne, chứng loạn dưỡng nón, viêm võng mạc sắc tố, võng mạc tách bẩm sinh di truyền liên kết trên nhiễm sắc thể X, hội chứng Usher, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác teo, AMD tạo mạch mới, thoái hóa điểm vàng do tiểu đường, bệnh võng mạc tiểu đường tăng sinh (PDR), phù thũng điểm vàng trong mắt, bệnh hắc võng mạc trung tâm thanh dịch, sự bong võng mạc, viêm bên trong mắt, bệnh glôcôm, và viêm màng mạch nho phía sau.

19. Hạt rAAV theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-18, trong đó vectơ rAAV là vectơ rAAV tự bổ sung.

20. Hạt rAAV theo điểm 19, trong đó vectơ chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa cho axit nucleic khác loại và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa cho trình tự bổ sung của axit nucleic, trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trong cùng một sợi với trình tự axit nucleic thứ hai dọc theo gần hết hoặc toàn bộ chiều dài của nó.

21. Hạt rAAV theo điểm 20, trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất và trình tự axit nucleic thứ hai được liên kết bằng ITR AAV đột biến, trong đó ITR AAV đột biến có chứa đột biến làm khuyết của vùng D và có chứa đột biến của trình tự phân giải cuối.

22. Hạt rAAV theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-21, trong đó hạt rAAV có trong dược phẩm.

23. Hạt rAAV theo điểm 22, trong đó nồng độ của hạt rAAV trong dược phẩm nằm trong khoảng từ khoảng 1 x 10^6 DRP/ml đến khoảng 1 x 10^{14} DRP/ml.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Genzyme Corporation

Scaria, Abraham

Sullivan, Jennifer

Stanek, Lisa M.

<120> Hạt virut kết hợp ađeno tái tổ hợp (rAAV)

<130> 159792010440

<140> Chưa Gán

<141> Đồng Thời Với Tài Liệu Này

<150> US 62/114,575

<151> 2015-02-10

<150> US 61/988,131

<151> 2014-05-02

<160> 16

<170> FastSEQ Cho Windows Phiên Bản 4.0

<210> 1

<211> 735

<212> PRT

<213> Virut Kết Hợp Ađeno

<400> 1

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
20 25 30

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
145 150 155 160

Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
180 185 190

```
Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
        195                 200                 205
Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
    210                 215                 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
225                 230                 235                 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
                245                 250                 255
Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
            260                 265                 270
Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
        275                 280                 285
Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
    290                 295                 300
Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val
305                 310                 315                 320
Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
                325                 330                 335
Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
            340                 345                 350
Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
        355                 360                 365
Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
    370                 375                 380
Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser
385                 390                 395                 400
Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu
```

405 410 415

Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg

420 425 430

Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr

435 440 445

Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln

450 455 460

Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly

465 470 475 480

Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn

485 490 495

Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly

500 505 510

Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp

515 520 525

Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys

530 535 540

Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr

545 550 555 560

Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr

565 570 575

Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr

580 585 590

Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp

595 600 605

Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr

610 615 620

Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
625 630 635 640
His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn
645 650 655
Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln
660 665 670
Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys
675 680 685
Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr
690 695 700
Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr
705 710 715 720
Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 2
<211> 735
<212> PRT
<213> Trình Tự Nhân Tạo

<220>
<223> Cấu Trúc Tổng Hợp

<400> 2
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
20 25 30
Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60
Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80
Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140
Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
145 150 155 160
Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175
Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
180 185 190
Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
195 200 205
Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile

225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu

245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr

260 265 270

Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His

275 280 285

Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp

290 295 300

Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val

305 310 315 320

Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu

325 330 335

Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr

340 345 350

Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp

355 360 365

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser

370 375 380

Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser

385 390 395 400

Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu

405 410 415

Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg

420 425 430

Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr

435 440 445

Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
450 455 460
Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
465 470 475 480
Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn
485 490 495
Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly
500 505 510
Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp
515 520 525
Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys
530 535 540
Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
545 550 555 560
Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr
565 570 575
Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Ala Gly Asn Ala Gln Ala Ala Thr
580 585 590
Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
595 600 605
Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
610 615 620
Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
625 630 635 640
His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn
645 650 655
Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln

660 665 670

Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys

675 680 685

Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr

690 695 700

Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr

705 710 715 720

Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

725 730 735

<210> 3

<211> 598

<212> PRT

<213> Virut Kết Hợp Ađeno

<400> 3

Met Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro

1 5 10 15

Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys

20 25 30

Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro

35 40 45

Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn

50 55 60

Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly

65 70 75 80

```
Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr
                85                  90                  95
Trp Met Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu
            100                 105                 110
Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly
        115                 120                 125
Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
    130                 135                 140
Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln
145                 150                 155                 160
Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe
                165                 170                 175
Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr
            180                 185                 190
Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
        195                 200                 205
Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys
    210                 215                 220
Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr
225                 230                 235                 240
Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr
                245                 250                 255
Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe
            260                 265                 270
Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
        275                 280                 285
His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
```

290 295 300

Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln

305 310 315 320

Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln

325 330 335

Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser

340 345 350

Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala

355 360 365

Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro

370 375 380

Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser

385 390 395 400

Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp

405 410 415

Ile Glu Lys Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn

420 425 430

Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg

435 440 445

Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu

450 455 460

Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile

465 470 475 480

Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu

485 490 495

Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys

500 505 510

Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys
515 520 525

Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu
530 535 540

Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu
545 550 555 560

Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr
565 570 575

Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg
580 585 590

Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
595

<210> 4

<211> 598

<212> PRT

<213> Trình Tự Nhân Tạo

<220>

<223> Cấu Trúc Tổng Hợp

<400> 4

Met Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro
1 5 10 15

Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys
20 25 30

Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro
35 40 45

Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn
50 55 60

Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly
65 70 75 80

Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr
85 90 95

Trp Met Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu
100 105 110

Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly
115 120 125

Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
130 135 140

Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln
145 150 155 160

Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe
165 170 175

Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr
180 185 190

Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
195 200 205

Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys
210 215 220

Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr
225 230 235 240

Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr

245 250 255

Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe

260 265 270

Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala

275 280 285

His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr

290 295 300

Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln

305 310 315 320

Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln

325 330 335

Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser

340 345 350

Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala

355 360 365

Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro

370 375 380

Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser

385 390 395 400

Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp

405 410 415

Ile Glu Lys Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn

420 425 430

Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Ala

435 440 445

Gly Asn Ala Gln Ala Ala Thr Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu

450 455 460

Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile
465 470 475 480
Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu
485 490 495
Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
500 505 510
Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys
515 520 525
Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu
530 535 540
Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu
545 550 555 560
Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr
565 570 575
Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg
580 585 590
Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
595

<210> 5
<211> 533
<212> PRT
<213> Virut Kết Hợp Ađeno

<400> 5
Met Ala Thr Gly Ser Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala

1 5 10 15

Asp Gly Val Gly Asn Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp

20 25 30

Met Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro

35 40 45

Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala

50 55 60

Ser Asn Asp Asn His Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe

65 70 75 80

Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg

85 90 95

Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys

100 105 110

Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr

115 120 125

Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser

130 135 140

Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu

145 150 155 160

Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu

165 170 175

Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys

180 185 190

Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr

195 200 205

Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His

210 215 220

Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu
225 230 235 240
Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser
245 250 255
Arg Leu Gln Phe Ser Gln Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser
260 265 270
Arg Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys
275 280 285
Thr Ser Ala Asp Asn Asn Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr
290 295 300
Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala
305 310 315 320
Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly
325 330 335
Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile
340 345 350
Glu Lys Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro
355 360 365
Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly
370 375 380
Asn Arg Gln Ala Ala Thr Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro
385 390 395 400
Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
405 410 415
Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met
420 425 430
Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn

435 440 445

Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe

450 455 460

Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile

465 470 475 480

Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile

485 490 495

Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val

500 505 510

Asp Thr Asn Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr

515 520 525

Leu Thr Arg Asn Leu

530

<210> 6

<211> 533

<212> PRT

<213> Trình Tự Nhân Tạo

<220>

<223> Cấu Trúc Tổng Hợp

<400> 6

Met Ala Thr Gly Ser Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala

1 5 10 15

Asp Gly Val Gly Asn Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp

```
            20                  25                  30
Met Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro
        35                  40                  45
Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala
    50                  55                  60
Ser Asn Asp Asn His Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe
65                  70                  75                  80
Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg
                85                  90                  95
Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys
            100                 105                 110
Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr
        115                 120                 125
Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser
    130                 135                 140
Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu
145                 150                 155                 160
Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu
                165                 170                 175
Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys
            180                 185                 190
Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr
        195                 200                 205
Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His
    210                 215                 220
Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu
225                 230                 235                 240
```

Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser
245 250 255
Arg Leu Gln Phe Ser Gln Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser
260 265 270
Arg Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys
275 280 285
Thr Ser Ala Asp Asn Asn Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr
290 295 300
Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala
305 310 315 320
Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly
325 330 335
Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile
340 345 350
Glu Lys Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro
355 360 365
Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Ala Gly
370 375 380
Asn Ala Gln Ala Ala Thr Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro
385 390 395 400
Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
405 410 415
Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met
420 425 430
Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
435 440 445
Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe

450 455 460

Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile
465 470 475 480

Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile
485 490 495

Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val
500 505 510

Asp Thr Asn Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr
515 520 525

Leu Thr Arg Asn Leu
530

<210> 7
<211> 736
<212> PRT
<213> Virut Kết Hợp Ađeno

<400> 7

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Val Pro Gln Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Ile Leu Glu Pro
115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140
Pro Val Asp Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Val Gly
145 150 155 160
Lys Ser Gly Lys Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175
Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
180 185 190
Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Ser Asn Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205
Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255
Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
260 265 270
Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His

275 280 285

Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp

290 295 300

Gly Phe Arg Pro Lys Lys Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val

305 310 315 320

Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu

325 330 335

Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr

340 345 350

Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp

355 360 365

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser

370 375 380

Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser

385 390 395 400

Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Thr Phe Glu

405 410 415

Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg

420 425 430

Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr

435 440 445

Gln Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Asn Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser

450 455 460

Gln Ala Gly Pro Gln Ser Met Ser Leu Gln Ala Arg Asn Trp Leu Pro

465 470 475 480

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser Lys Thr Ala Asn Asp Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Asn Phe Pro Trp Thr Ala Ala Ser Lys Tyr His Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Asn Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Glu Gly Thr Thr Ala Ser Asn Ala Glu Leu Asp Asn Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln
565 570 575

Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gln Ser Ser Asn Thr Ala Pro Thr
580 585 590

Thr Arg Thr Val Asn Asp Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Met Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asn Pro Pro Thr Thr Phe Ser Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val

705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

725 730 735

<210> 8

<211> 78

<212> ADN

<213> Trình Tự Nhân Tạo

<220>

<223> Cấu Trúc Tổng Hợp

<400> 8

cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccacgc 60

ccgggctttg cccgggcg 78

<210> 9

<211> 736

<212> PRT

<213> Trình Tự Nhân Tạo

<220>

<223> Cấu Trúc Tổng Hợp

<400> 9

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala

85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro

115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly

145 150 155 160

Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr

165 170 175

Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro

180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Pro Asn Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly

195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser

210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp Asn
260 265 270
Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320
Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu
340 345 350
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365
Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn
370 375 380
Gly Ser Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Thr
405 410 415
Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Val

435 440 445

Arg Thr Gln Thr Thr Gly Thr Gly Gly Thr Gln Thr Leu Ala Phe Ser

450 455 460

Gln Ala Gly Pro Ser Ser Met Ala Asn Gln Ala Arg Asn Trp Val Pro

465 470 475 480

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Asn Gln Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Ala Lys Phe Lys Leu Asn

500 505 510

Gly Arg Asp Ser Leu Met Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Ser His Lys

515 520 525

Asp Asp Glu Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly

530 535 540

Lys Gln Gly Ala Gly Asn Asp Gly Val Asp Tyr Ser Gln Val Leu Ile

545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu

565 570 575

Tyr Gly Ala Val Ala Ile Asn Asn Gln Ala Ala Asn Thr Gln Ala Gln

580 585 590

Thr Gly Leu Val His Asn Gln Gly Val Ile Pro Gly Met Val Trp Gln

595 600 605

Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His

610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu

625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala

645 650 655

Asp Pro Pro Leu Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 10

<211> 736

<212> PRT

<213> Trình Tự Nhân Tạo

<220>

<223> Cấu Trúc Tổng Hợp

<400> 10

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

```
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
                85                  90                  95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
            100                 105                 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
        115                 120                 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
    130                 135                 140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly
145                 150                 155                 160
Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
                165                 170                 175
Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
            180                 185                 190
Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Pro Asn Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
        195                 200                 205
Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
    210                 215                 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225                 230                 235                 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
                245                 250                 255
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp Asn
```

260 265 270

Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg

275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn

290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile

305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala Asn

325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu

340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro

355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn

370 375 380

Gly Ser Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe

385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Thr

405 410 415

Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Val

435 440 445

Arg Thr Gln Thr Thr Gly Thr Gly Gly Thr Gln Thr Leu Ala Phe Ser

450 455 460

Gln Ala Gly Pro Ser Ser Met Ala Asn Gln Ala Arg Asn Trp Val Pro

465 470 475 480

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Asn Gln Asn
485 490 495
Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Ala Lys Phe Lys Leu Asn
500 505 510
Gly Arg Asp Ser Leu Met Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525
Asp Asp Glu Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly
530 535 540
Lys Gln Gly Ala Gly Asn Asp Gly Val Asp Tyr Ser Gln Val Leu Ile
545 550 555 560
Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu
565 570 575
Tyr Gly Ala Val Ala Ile Asn Asn Gln Arg Ala Asn Thr Gln Ala Gln
580 585 590
Thr Gly Leu Val His Asn Gln Gly Val Ile Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605
Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
625 630 635 640
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655
Asp Pro Pro Leu Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn

690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val

705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

725 730 735

<210> 11

<211> 736

<212> PRT

<213> Trình Tự Nhân Tạo

<220>

<223> Cấu Trúc Tổng Hợp

<400> 11

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala

85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro

115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly

145 150 155 160

Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr

165 170 175

Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro

180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Pro Asn Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly

195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser

210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile

225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu

245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp Asn

260 265 270

Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg

275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn

290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320
Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu
340 345 350
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365
Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn
370 375 380
Gly Ser Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Thr
405 410 415
Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Val
435 440 445
Arg Thr Gln Thr Thr Gly Thr Gly Gly Thr Gln Thr Leu Ala Phe Ser
450 455 460
Gln Ala Gly Pro Ser Ser Met Ala Asn Gln Ala Arg Asn Trp Val Pro
465 470 475 480
Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Asn Gln Asn
485 490 495
Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Ala Lys Phe Lys Leu Asn
500 505 510
Gly Arg Asp Ser Leu Met Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Ser His Lys

515 520 525

Asp Asp Glu Asp Ala Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly

530 535 540

Lys Gln Gly Ala Gly Asn Asp Gly Val Asp Tyr Ser Gln Val Leu Ile

545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu

565 570 575

Tyr Gly Ala Val Ala Ile Asn Asn Gln Ala Ala Asn Thr Gln Ala Gln

580 585 590

Thr Gly Leu Val His Asn Gln Gly Val Ile Pro Gly Met Val Trp Gln

595 600 605

Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His

610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu

625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala

645 650 655

Asp Pro Pro Leu Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr

660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln

675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn

690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val

705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

725 730 735

<210> 12

<211> 736

<212> PRT

<213> Virut Kết Hợp Ađeno

<400> 12

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly

145 150 155 160

Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr

165 170 175

Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro

180 185 190

Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly

195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala

210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile

225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu

245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His

260 265 270

Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe

275 280 285

His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn

290 295 300

Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln

305 310 315 320

Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn

325 330 335

Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro

340 345 350

Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala

355 360 365

Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
370 375 380
Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
385 390 395 400
Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
405 410 415
Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
420 425 430
Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
435 440 445
Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
450 455 460
Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
465 470 475 480
Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
485 490 495
Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
500 505 510
Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525
Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
530 535 540
Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
545 550 555 560
Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
565 570 575
Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala

580 585 590

Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln

595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His

610 615 620

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu

625 630 635 640

Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala

645 650 655

Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr

660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln

675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn

690 695 700

Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu

705 710 715 720

Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu

725 730 735

<210> 13

<211> 736

<212> PRT

<213> Virut Kết Hợp Ađeno

<400> 13

```
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
 1               5                  10                  15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
            20                  25                  30
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
        35                  40                  45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
                85                  90                  95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
            100                 105                 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
        115                 120                 125
Phe Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
    130                 135                 140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly
145                 150                 155                 160
Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
                165                 170                 175
Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
            180                 185                 190
Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
        195                 200                 205
Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala
```

210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile

225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu

245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His

260 265 270

Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe

275 280 285

His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn

290 295 300

Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln

305 310 315 320

Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn

325 330 335

Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro

340 345 350

Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala

355 360 365

Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly

370 375 380

Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro

385 390 395 400

Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe

405 410 415

Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp

420 425 430

```
Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
        435                 440                 445
Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
    450                 455                 460
Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
465                 470                 475                 480
Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
                485                 490                 495
Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
            500                 505                 510
Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525
Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
    530                 535                 540
Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
545                 550                 555                 560
Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
                565                 570                 575
Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
            580                 585                 590
Thr Gly Asp Val His Val Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
    610                 615                 620
Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
625                 630                 635                 640
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
```

645 650 655

Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr

660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln

675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn

690 695 700

Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu

705 710 715 720

Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu

725 730 735

<210> 14

<211> 738

<212> PRT

<213> Virut Kết Hợp Ađeno

<400> 14

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60

```
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80
Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
                85                  90                  95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
            100                 105                 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
        115                 120                 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
    130                 135                 140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
145                 150                 155                 160
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
                165                 170                 175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro
            180                 185                 190
Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly
        195                 200                 205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
    210                 215                 220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
225                 230                 235                 240
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
                245                 250                 255
Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ala Thr Asn Asp
            260                 265                 270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
```

275 280 285

Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn

290 295 300

Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn

305 310 315 320

Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala

325 330 335

Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln

340 345 350

Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe

355 360 365

Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn

370 375 380

Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr

385 390 395 400

Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Thr Tyr

405 410 415

Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser

420 425 430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu

435 440 445

Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Asn Thr Gln Thr Leu Gly

450 455 460

Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp

465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly

485 490 495

```
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Ala Gly Thr Lys Tyr His
            500                 505                 510
Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala Met Ala Thr
        515                 520                 525
His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Asn Gly Ile Leu Ile
    530                 535                 540
Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val
545                 550                 555                 560
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
                565                 570                 575
Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Thr Ala
            580                 585                 590
Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
        595                 600                 605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
    610                 615                 620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
625                 630                 635                 640
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
                645                 650                 655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe
            660                 665                 670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
        675                 680                 685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
    690                 695                 700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu
```

705 710 715 720

Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg

725 730 735

Asn Leu

<210> 15

<211> 736

<212> PRT

<213> Virut Kết Hợp Ađeno

<400> 15

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala

85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn

325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu

340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro

355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp

370 375 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe

385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu

405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser

435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys

515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly

530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 16

<211> 738

<212> PRT

<213> Virut Kết Hợp Ađeno

<400> 16

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
145 150 155 160

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
165 170 175

Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro
180 185 190
Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly
195 200 205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
210 215 220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
225 230 235 240
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
245 250 255
Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp
260 265 270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
275 280 285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
290 295 300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn
305 310 315 320
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
325 330 335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
340 345 350
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
355 360 365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
370 375 380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr

385 390 395 400

Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr

405 410 415

Gln Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser

420 425 430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu

435 440 445

Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu

450 455 460

Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp

465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser

485 490 495

Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His

500 505 510

Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr

515 520 525

His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met

530 535 540

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val

545 550 555 560

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr

565 570 575

Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala

580 585 590

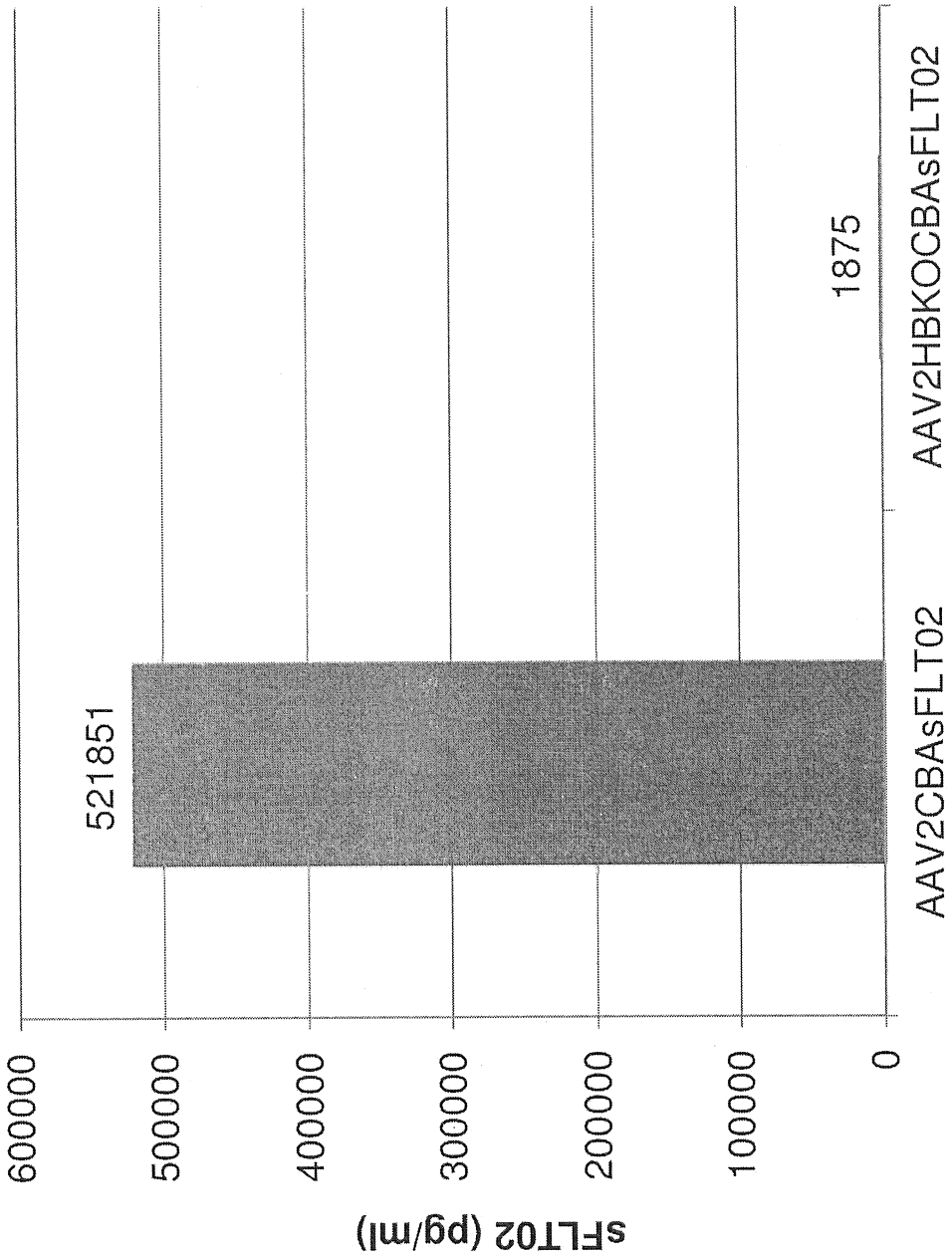
Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val

595 600 605

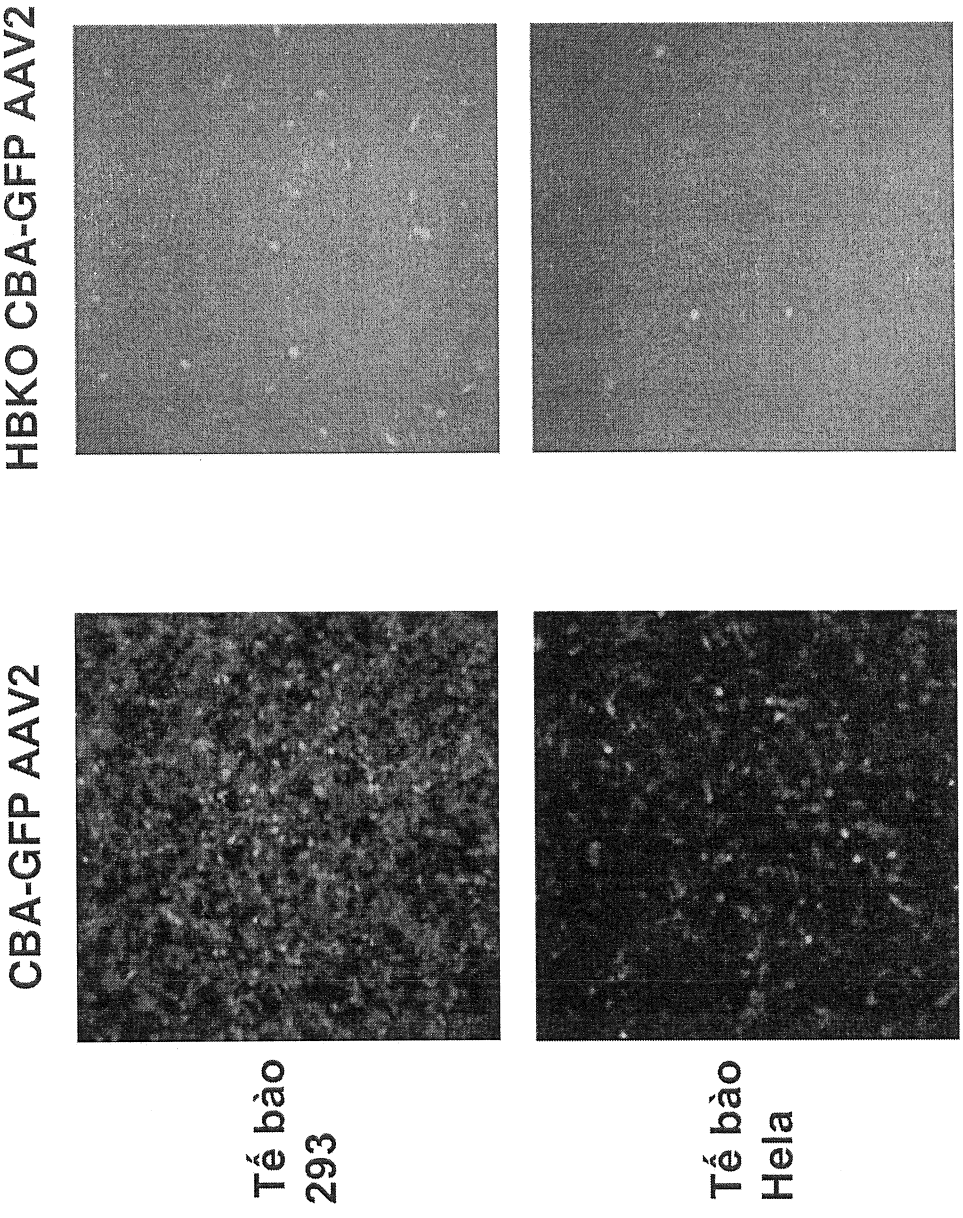
```
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
    610                 615                 620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
625                 630                 635                 640
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
                645                 650                 655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Ser Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe
            660                 665                 670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
        675                 680                 685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
    690                 695                 700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Asp
705                 710                 715                 720
Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg
                725                 730                 735
Asn Leu
```

Axit amin AAV2 #	484	487	532	585	588
AAV2	R	R	K	R	R
AAV2 HBKO	R	R	K	A	A

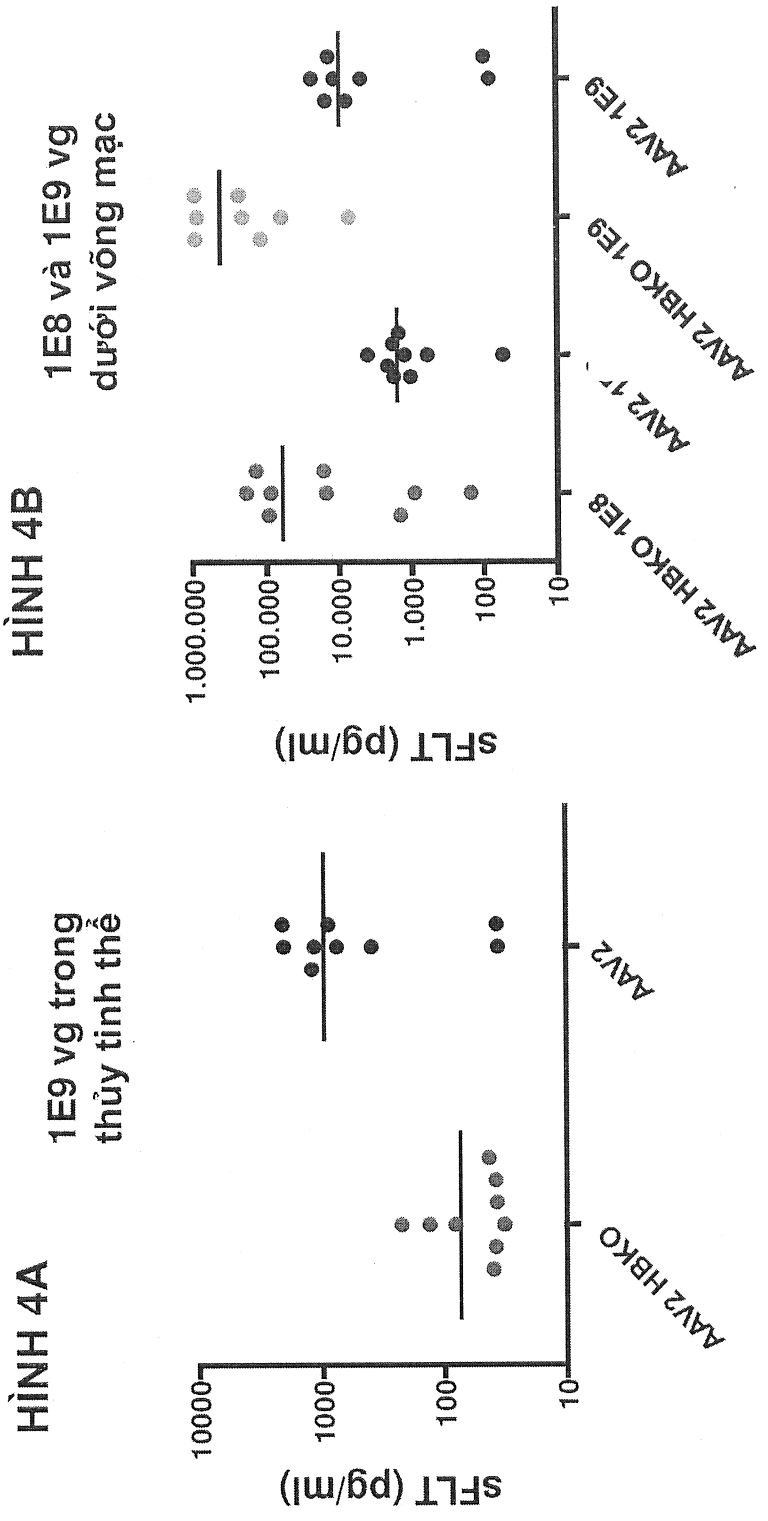
HÌNH 1


sFLT02 (pg/ml)
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
521851
1875
AAV2CBAsFLT02
AAV2HBKOCBAsFLT02

HÌNH 2



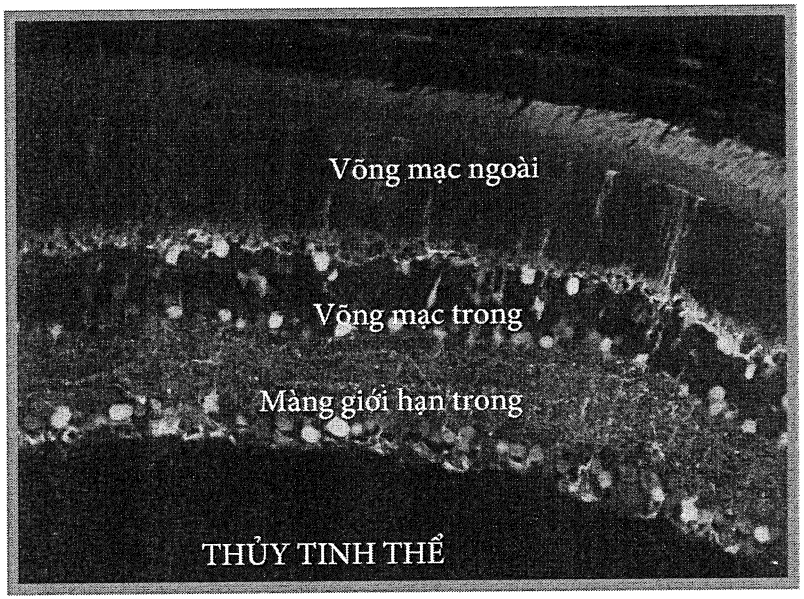
HÌNH 3


HÌNH 4A
1E9 vg trong thủy tinh thể
sFLT (pg/ml)
10000
1000
100
10
AAV2
AAV2 HBKO
HÌNH 4B
1E8 và 1E9 vg dưới võng mạc
sFLT (pg/ml)
1.000.000
100.000
10.000
1.000
100
10
AAV2 HBKO 1E8
AAV2 1
AAV2 HBKO 1E9
AAV2 1E9

HÌNH 4A & 4B

Đột biến arginin làm giảm sự chuyển nạp AAV2 trong thủy tinh thể ở mắt chuột

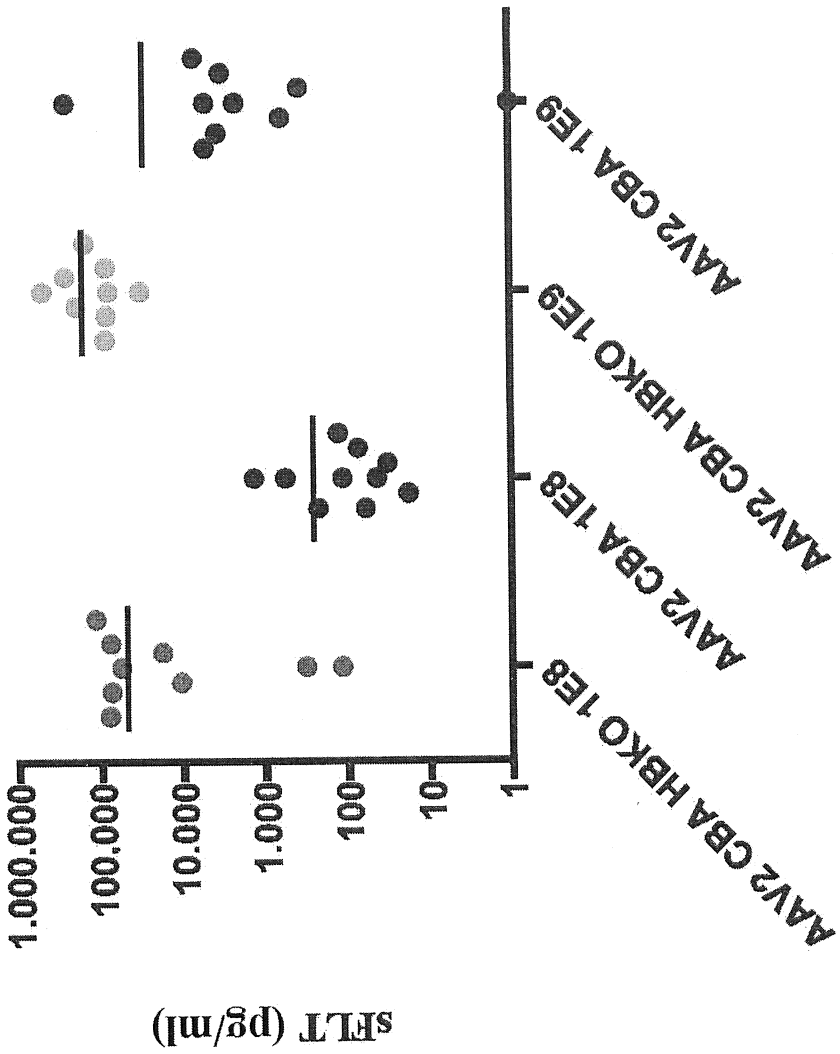
AAV2-CBA-GFP



AAV2HBKO(ArgininKO)

Không chuyển nạp

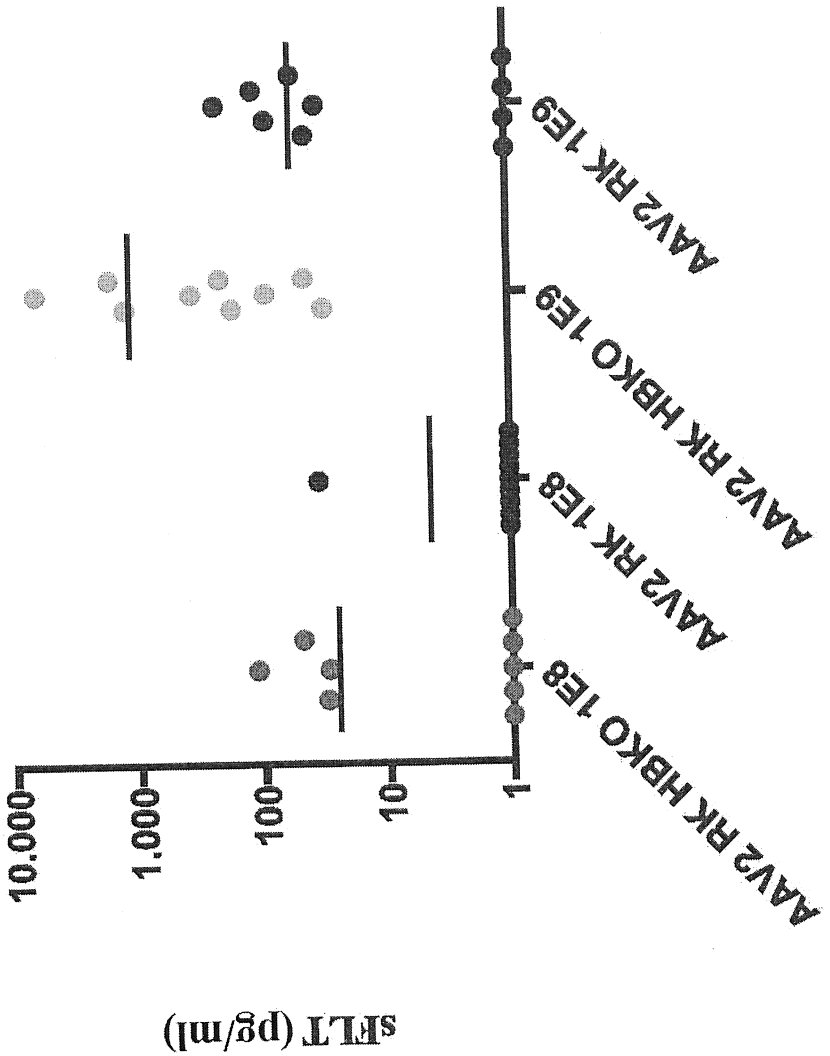
HÌNH 5


sFLT (pg/ml)
1.000.000
100.000
10.000
1.000
100
10
1
AAV2 CBA HBKO 1E8
AAV2 CBA 1E8
AAV2 CBA HBKO 1E9
AAV2 CBA 1E9

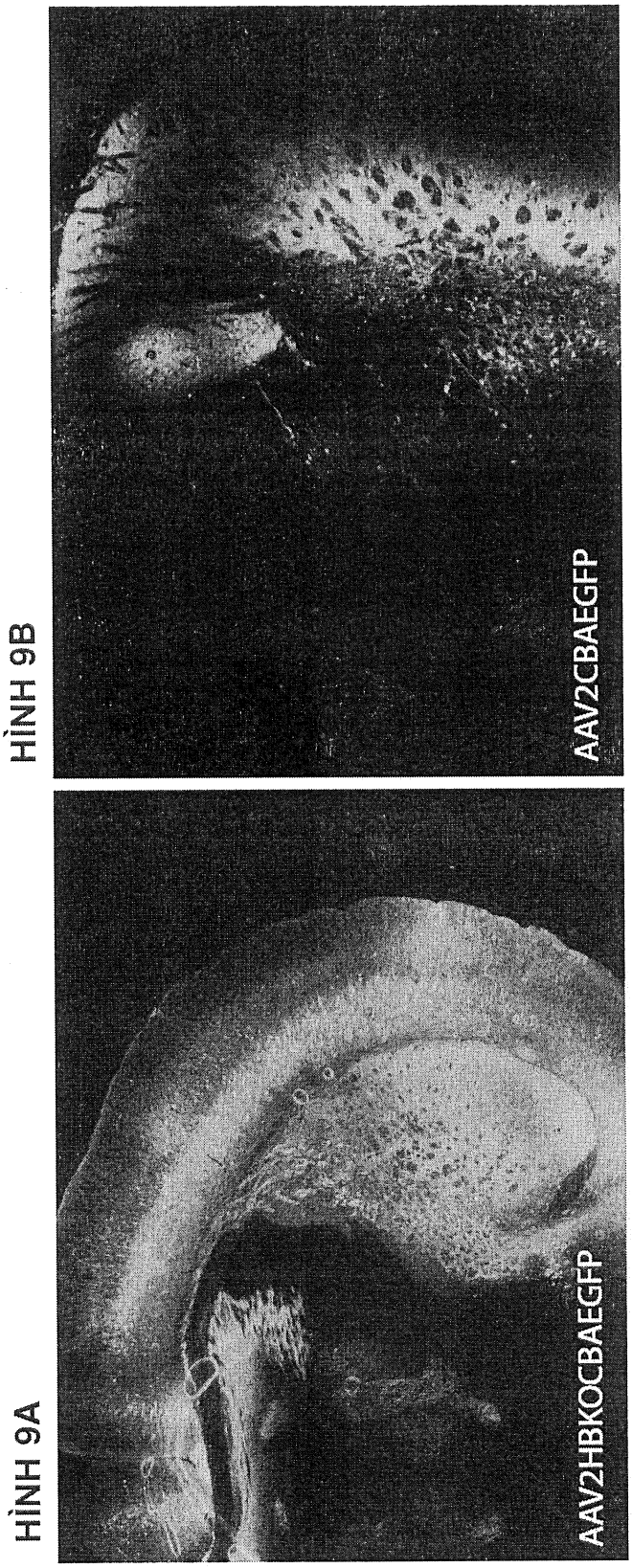
HÌNH 6

AAV2-CBA-GFP
Tế bào RPE
Tế bào nhận kích thích ánh sáng
Võng mạc trong
THỦY TINH THỂ
AAV2HBKO-CBA-GFP
Tế bào RPE
Tế bào nhận kích thích ánh sáng
Võng mạc trong
THỦY TINH THỂ

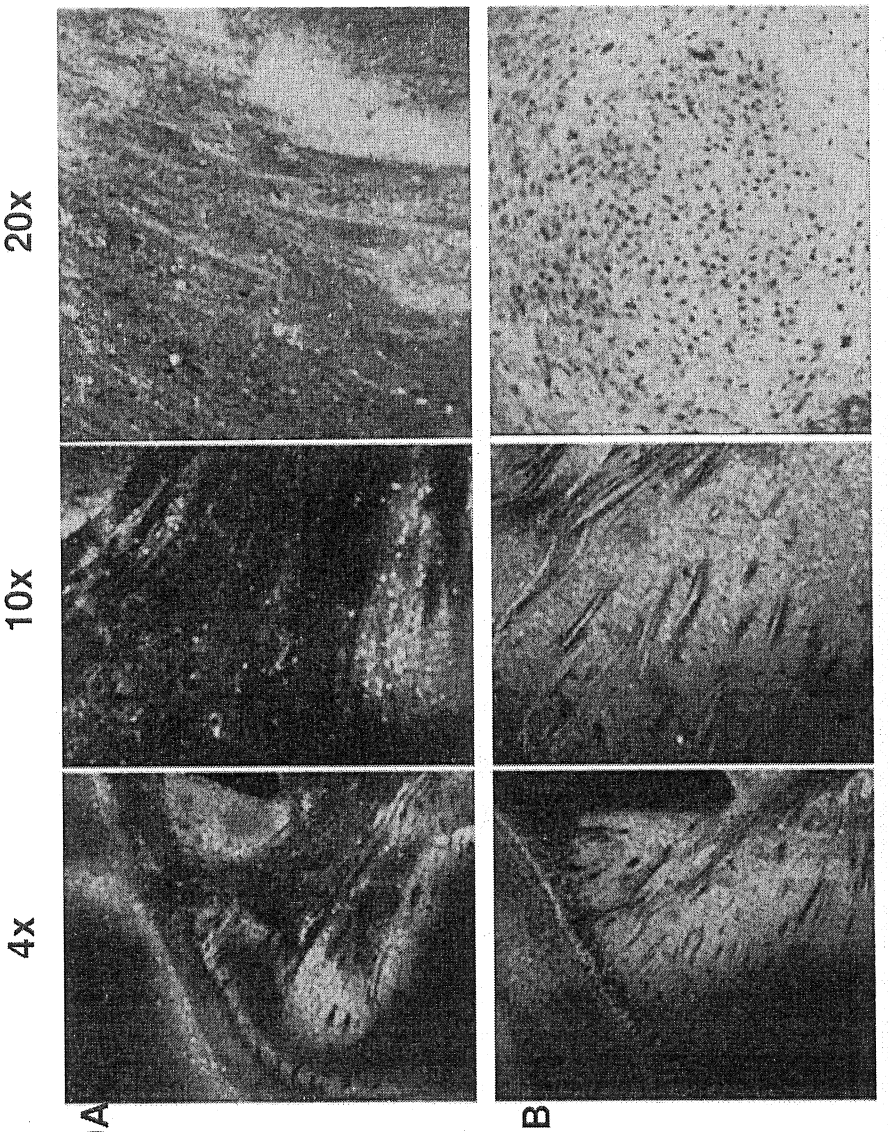
HÌNH 7


sFLT (pg/ml)
10.000
1.000
100
10
1
AAV2 RK HBKO 1E8
AAV2 RK 1E8
AAV2 RK HBKO 1E9
AAV2 RK 1E9

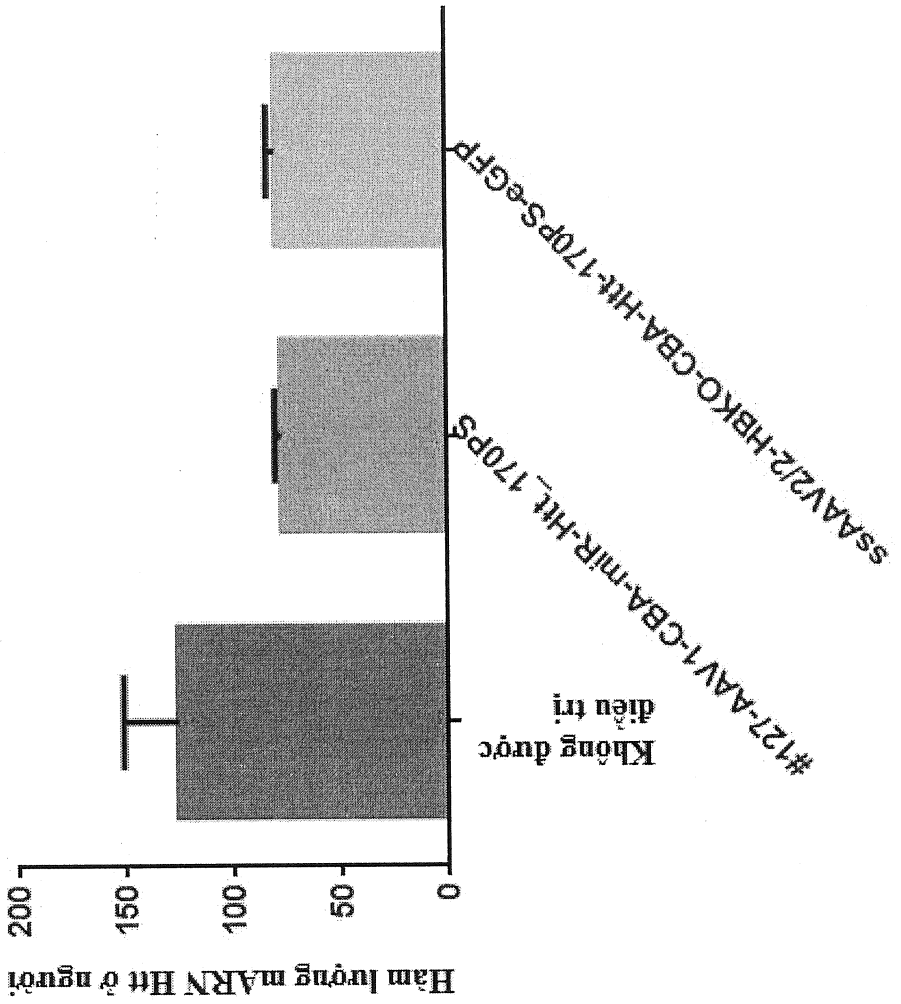
HÌNH 8



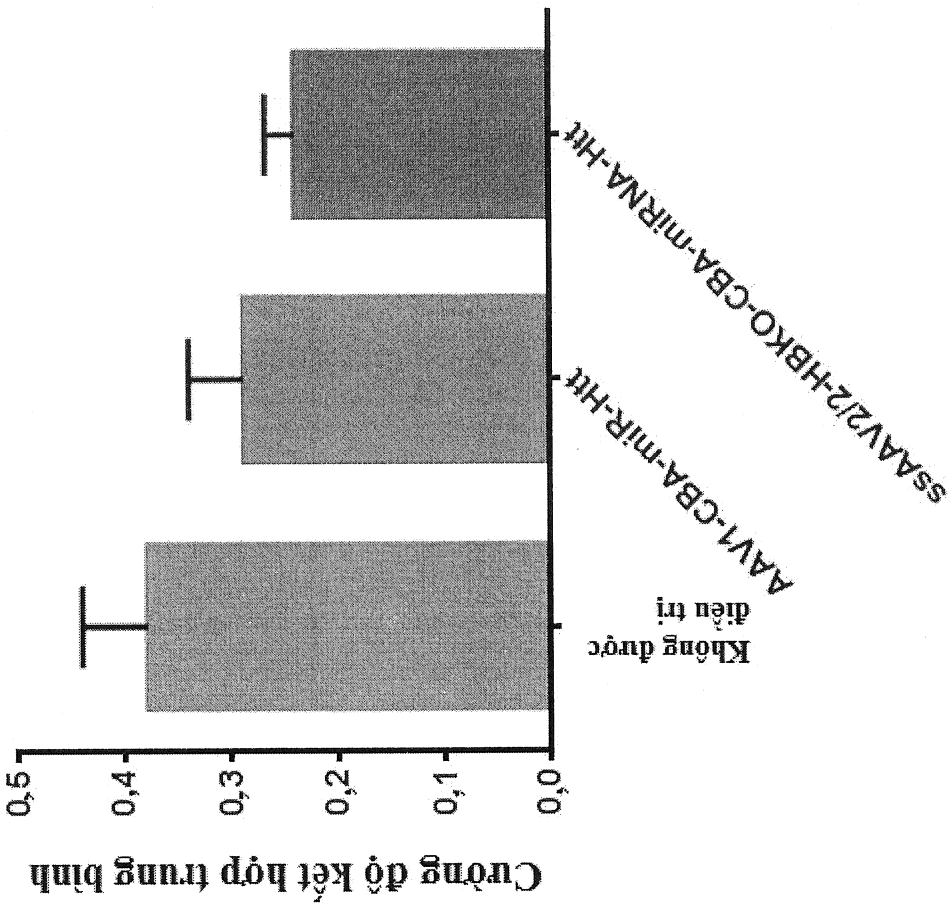
HÌNH 9A&9B



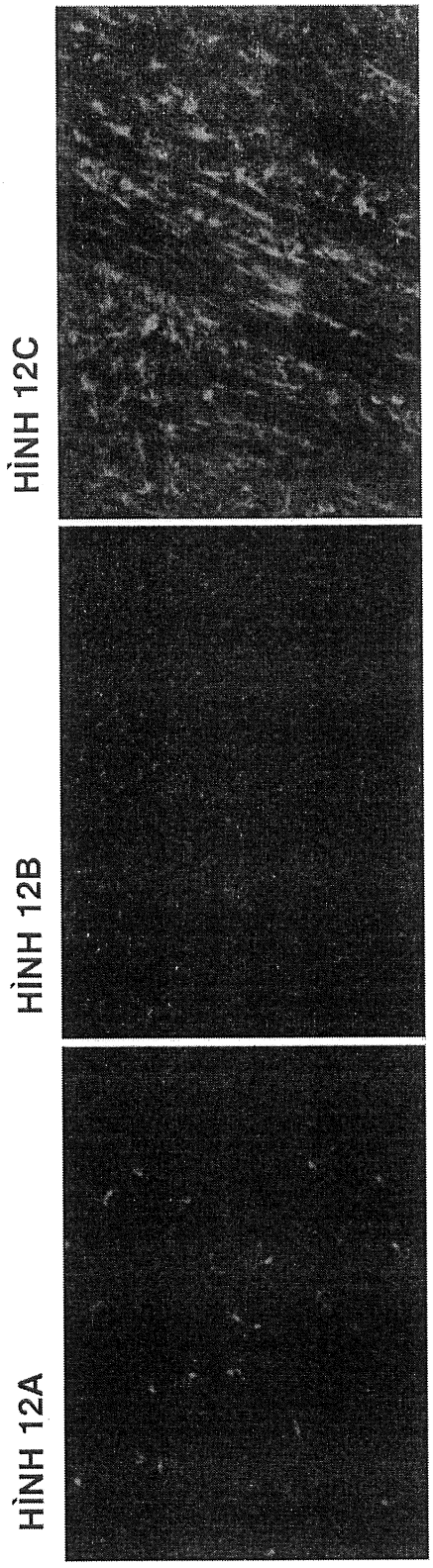
HÌNH 10A&10B


Hàm lượng mARN Htt ở người
200
150
100
50
0
Không được điều trị
#127-AAV1-CBA-miR-Htt_170PS
ssAAV2/2-HBKO-CBA-Htt-170PS-eGFP

HÌNH 11A


Cường độ kết hợp trung bình
0,0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
Không được điều trị
AAV1-CBA-miR-Htt
ssAAV2/2-HBKO-CBA-miRNA-Htt

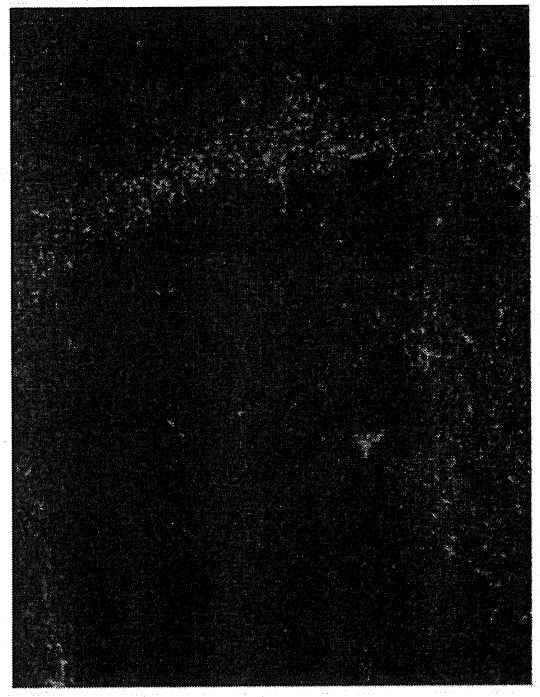
HÌNH 11B



HÌNH 12A-12C

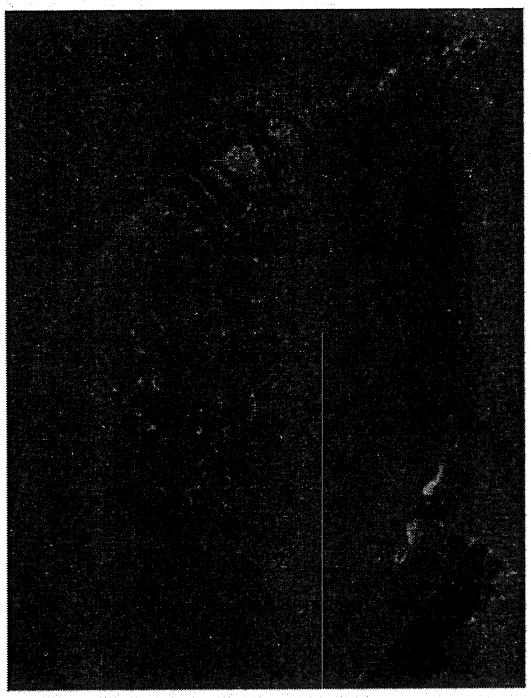
HÌNH 13A

Không được điều trị



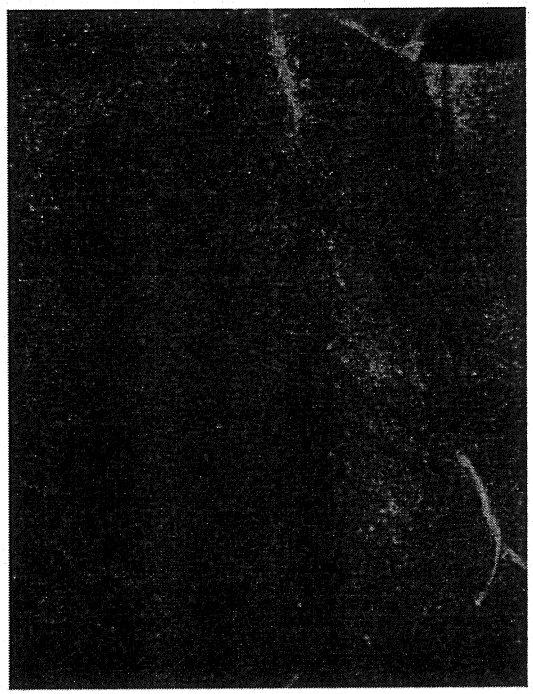
HÌNH 13B

AAV2-HBKO-eGFP



HÌNH 13C

AAV1-eGFP



HÌNH 13A-13C

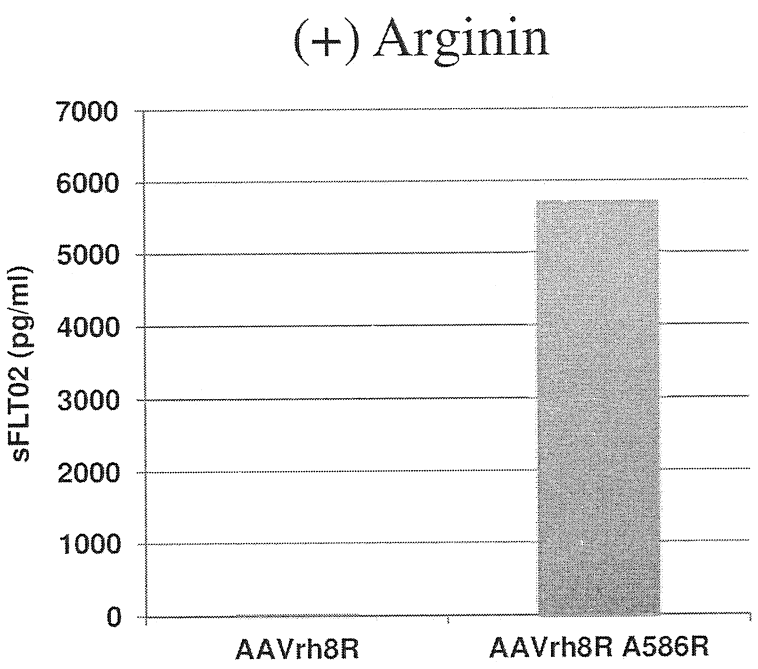
Axit amin AAV2 #	484	487	532	585	588
AAV2	R	R	K	R	R
AAVrh8R	R	R	R	A	T
Axit amin AAVrh8R #	485	488	533	586	589

HÌNH 14

Axit amin AAV2 #	484	487	532	585	588
AAV2	R	R	K	R	R
AAVrh8R	R	R	R	A	T
AAVrh8R A586R	R	R	R	R	T
AAVrh8R R533A	R	R	A	A	T
Axit amin AAVrh8R #	485	488	533	586	589

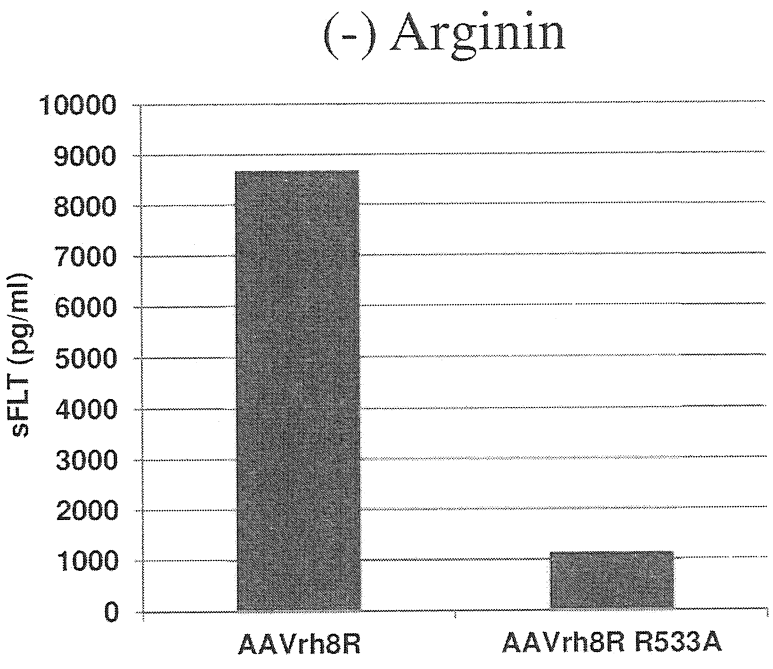
HÌNH 15

HÌNH 16A



HeLa
1 x 10^4 DRP/tế bào

HÌNH 16B



HeLaRC32
1 x 10^4 DRP/tế bào

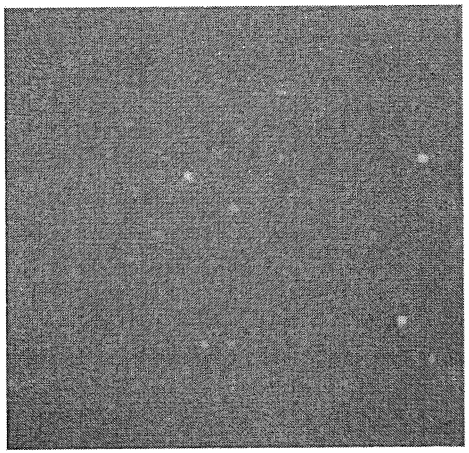
HÌNH 16A & 16B

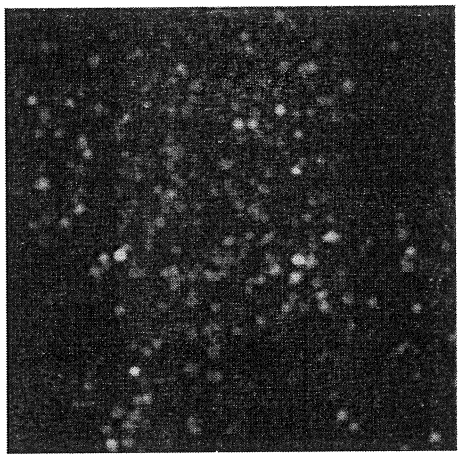
AAVrh8R

AAVrh8R A586R

HÌNH 17A

Tế bào NS1
1E5 DRP/tế bào
(+) Adts149



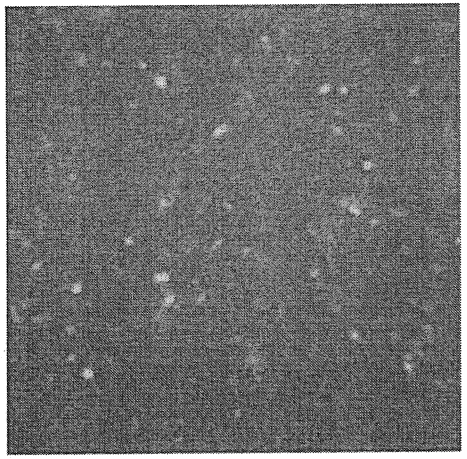


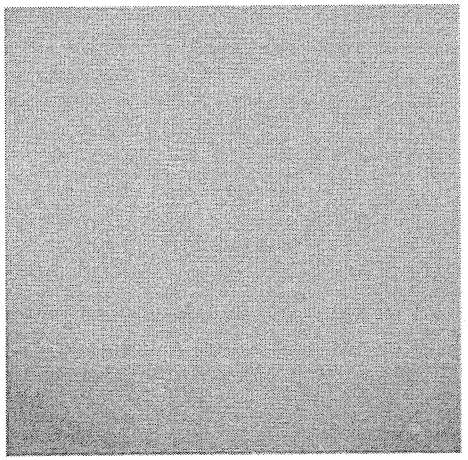
HÌNH 17B

(+) Arg

HÌNH 17C

Tế bào HeLa
1E5 DRP/tế bào (+)
Adts149





HÌNH 17D

(-) Arg

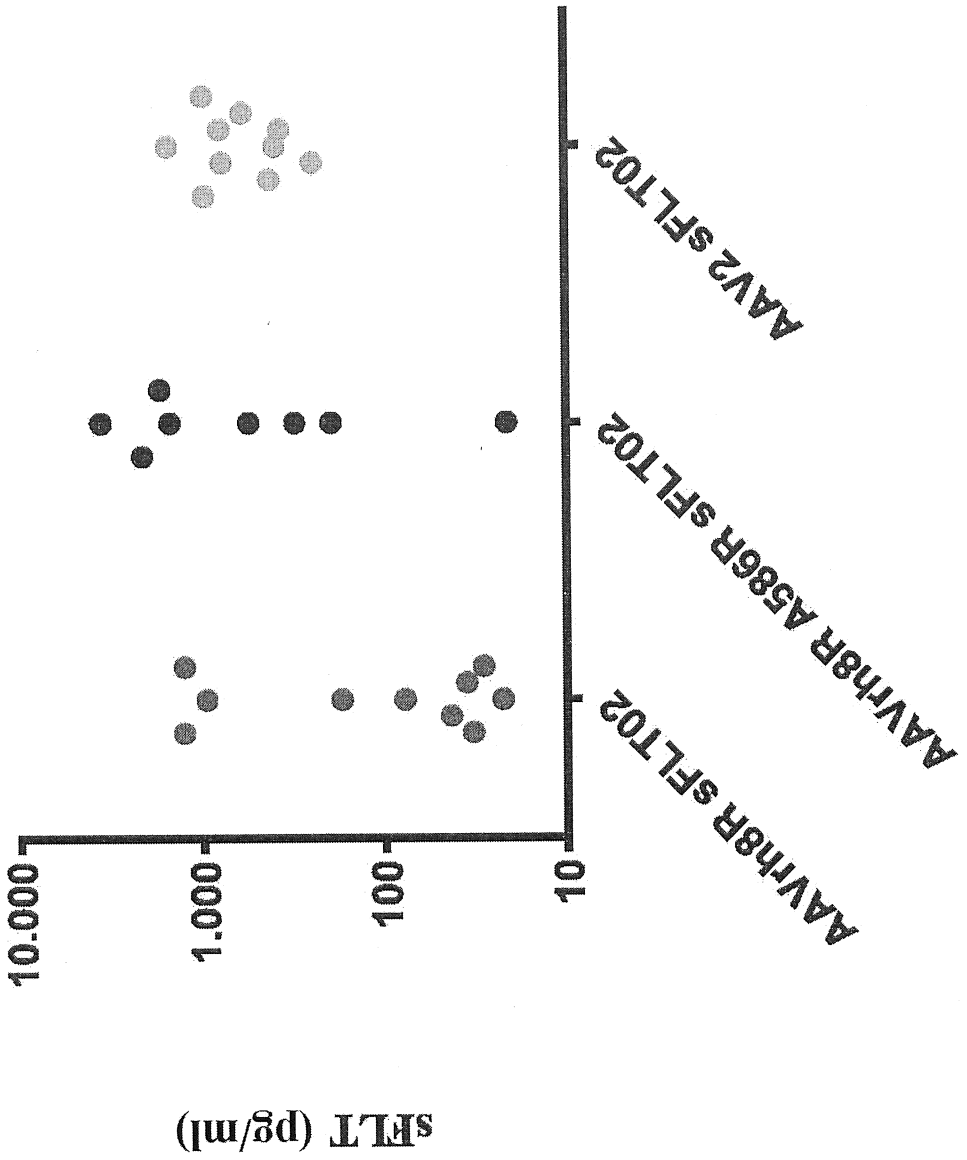
AAVrh8R

AAVrh8R R533A

HÌNH 17A-17D

HÌNH 18A
sFLT (pg/ml)
1000000
100000
10000
1000
100
10
AAV2
AAVrh8R A586R
AAVrh8R
HÌNH 18B
sFLT (pg/mL)
1.000.000
100.000
10.000
1.000
100
10
AAVrh8R R533A
AAVrh8R
Chưa quen thí nghiệm

HÌNH 18A & 18B


sFLT (pg/ml)
10.000
1.000
100
10
AAVrh8R sFLT02
AAVrh8R A586R sFLT02
AAV2 sFLT02

HÌNH 19

Axit amin AAV #	484	487	527	532	585	588
AAV2	R	R	K	K	R	R
Axit amin AAV #	485	488	528	533	586	589
AAV1	R	R	K	K	S	T
AAV6	R	R	K	K	S	T
AAV9	R	R	K	R	S	A
AAVrh8R	R	R	K	R	A	T
Axit amin AAV #	487	490	530	535	588	591
AAV8	R	R	K	R	Q	T
AAVrh10	R	R	K	R	Q	A

HÌNH 20