



(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)



1-0035215

(51)⁷ C12N 15/113; A61P 25/28

(13) B

(21) 1-2017-03511

(22) 09/02/2016

(86) PCT/US2016/017207 09/02/2016

(87) WO2016/130589 A2 18/08/2016

(30) 62/114,578 10/02/2015 US

(45) 25/04/2023 421

(43) 359A

(73) GENZYME CORPORATION (US)

500 Kendall Street, Cambridge, MA 02142, US

(72) STANEK Lisa M. (US); PALERMO Adam (US); RICHARDS Brenda (US); SARDI Sergio Pablo (AR); O'RIORDAN Catherine (US); SONG Antonius (US).

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

(54) PHÂN TỬ ARNI, PHƯƠNG PHÁP LÀM GIẢM ĐỘC TÍNH CỦA ARNI, CẤU TRÚC BIỂU HIỆN, VECTƠ, TẾ BÀO, HẠT VIRUT, VÀ BỘ KIT CHỨA PHÂN TỬ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất phân tử ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm trình tự dẫn và sợi thứ hai bao gồm trình tự không dẫn trong đó trình tự không dẫn bao gồm phần lồi đối diện với vùng hạt của trình tự dẫn; ví dụ, đối diện với trình tự phân cắt. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử ARNi để điều trị bệnh Huntington. Sáng chế còn đề xuất bằng biểu hiện, vectơ (ví dụ, *vector* rAAV, adenovirut tái tổ hợp, lentivirut tái tổ hợp, và HSV tái tổ hợp), các tế bào, hạt virut, và dược phẩm chứa ARNi. Sáng chế còn đề xuất phương pháp và bộ kit liên quan đến việc sử dụng ARNi, ví dụ, để điều trị bệnh Huntington. Sáng chế còn đề xuất hạt AAV tái tổ hợp (rAAV) và chế phẩm chứa hạt AAV tái tổ hợp.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phân tử ARNi biến thể. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề cập đến ARNi biến thể để điều trị bệnh Huntington.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

ARN can thiệp (ARNi) thể hiện là công cụ hữu dụng để làm câm gen trong nghiên cứu cơ sở về chức năng gen và thể hiện hứa hẹn lớn làm tác nhân chữa bệnh để triệt tiêu gen liên quan đến việc phát triển nhiều bệnh. Về bản chất, việc điều chỉnh gen bởi ARNi xảy ra thông qua các ARN nhỏ gọi là các microARN (các miARN) (Ambros, (2004) *Nature* 431:350-355; Krol và cộng sự, (2010) *Nat. Rev. Genet.* 11:597-610). Các microARN nổi lên là tác nhân điều chỉnh mạnh mẽ của nhiều quy trình gen khác nhau, và khi được phân phối bởi vector virus, các miARN nhân tạo được biểu hiện liên tục, tạo ra sự triệt tiêu mạnh và duy trì gen đích. Việc làm sáng tỏ cơ chế liên quan đến quy trình miARN đã cho phép các nhà khoa học đồng chọn thiết bị ARNi gen nội sinh và trực tiếp suy biến sản phẩm gen đích bằng cách sử dụng các miARN nhân tạo (tham khảo, ví dụ, US PG Pub. 2014/0163214 và Davidson và cộng sự, (2012) *Cell* 150:873-875).

Việc ngăn cản sự phát triển lâm sàng của các ARNi là tiềm năng để làm câm không nhắm đích trong đó vùng hạt (seed region) của ARNi (thường là nucleotit 1-7 hoặc 1-8) bắt cặp với các trình tự trong các mARN không nhắm đích trong vùng không dịch mã 3' (UTR) dẫn đến làm mất ổn định bản mã. Mục đích giảm làm câm không nhắm đích bao gồm việc sử dụng các thuật toán để xác định trình tự hạt ứng viên có tính đặc hiệu cao đối với mARN đích với tiềm năng không nhắm đích tối thiểu (Boudreau RL và cộng sự., (2012) *Nucl. Acids Res.* 41(1):e9) và đặt phần lõi trong ở trong vùng dẫn của ARNi (Terasawa và cộng sự, (2011) *Journal of axit nucleics* 2011:131579).

ARNi đã được nghiên cứu là liệu pháp để điều trị bệnh Huntington (HD). HD là bệnh thoái hóa thần kinh di truyền gây ra do sự mở rộng phân lặp CAG trong exon 1 của gen huntingtin (HTT). Sự mở rộng thu được của dải polyglutamin trong vùng đầu N tạo ra chức năng tạo độc cho protein huntingtin đột biến (mHtt). Khả năng làm câm biểu hiện mHtt là chiến lược chữa bệnh đối với HD được chứng minh lần đầu tiên ở mô hình chuột có điều kiện mắc bệnh (Yamamoto và cộng sự, (2000) *Cell* 101:57-66.). Khi biểu hiện của mHtt được cảm ứng trong các chuột này, sự sai sót bệnh lý và hành vi xuất hiện. Sự kìm hãm bởi được trung gian tetracyclin sau đó của gen chuyển mHtt đảo ngược sự bất thường này, cho thấy rằng việc làm giảm các mức mHtt tạo ra cơ chế dọn sạch protein trong neuron để chuẩn hóa các thay đổi cảm ứng mHtt. Do vậy, các chiến lược chữa bệnh mà làm giảm các mức mHtt có thể làm dừng một cách tiềm năng sự tiến triển bệnh và thuyên giảm triệu chứng HD.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất ARNi bao gồm sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép; b) sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn có ít nhất 19 bazơ, trong đó vùng dẫn bao gồm vùng hạt bao gồm các bazơ 1-N của sợi dẫn, N=7 hoặc N=8; và c) sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn có ít nhất 11 bazơ (ví dụ, ít nhất 19 bazơ) vùng không dẫn bao gồm trình tự lồi (bulge sequence) đối diện với bất kỳ một hoặc nhiều trong số các bazơ 1-(N+2) của vùng dẫn trong cấu trúc kép. Theo một số phương án, N=7 và phần lồi đối diện bazơ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc 9 của vùng dẫn. Theo các phương án khác, N=8 và phần lồi đối diện bazơ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 của vùng dẫn. Theo một số phương án, phần lồi đối diện bazơ 1 hoặc bazơ N+2 của vùng dẫn.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất ARNi bao gồm sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép; b) sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn có ít nhất 11 bazơ (ví dụ, ít nhất 19 bazơ), trong đó vùng dẫn bao gồm vùng hạt bao gồm các bazơ 1-N của sợi dẫn, N=7 hoặc N=8; và c) sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn có ít nhất 11 bazơ (ví dụ, ít nhất 19 bazơ), trong đó vùng không dẫn bao gồm trình tự lồi đối diện với bất kỳ một hoặc nhiều trong số các bazơ 1-(N+1) của vùng dẫn trong cấu trúc kép. Theo một số phương án, N=7 và phần lồi đối diện bazơ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 của vùng dẫn. Theo các phương án khác, N=8 và phần lồi đối diện bazơ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc 9

của vùng dẫn. Theo một số phương án, phần lõi đối diện bazơ 1 hoặc bazơ N+1 của vùng dẫn.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất ARNi bao gồm sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép; b) sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn có ít nhất 11 bazơ (*ví dụ*, ít nhất 19 bazơ), trong đó vùng dẫn bao gồm vùng hạt bao gồm các bazơ 1-N của sợi dẫn, N=7 hoặc N=8; và c) sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn có ít nhất 11 bazơ (*ví dụ*, ít nhất 19 bazơ), trong đó vùng không dẫn bao gồm trình tự lõi đối diện với bất kỳ một hoặc nhiều trong số các bazơ 1-N của vùng dẫn trong cấu trúc kép. Theo một số phương án, N=7 và phần lõi đối diện bazơ 1, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc 7 của vùng dẫn. Theo các phương án khác, N=8 và phần lõi đối diện bazơ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8 của vùng dẫn. Theo một số phương án, phần lõi đối diện bazơ 1 hoặc bazơ N của vùng dẫn. Theo một số phương án, phần lõi đối diện bazơ 1 của vùng dẫn.

Theo một số phương án của các khía cạnh và phương án trên, phần lõi được tạo thành bởi một hoặc nhiều bazơ của sợi không dẫn trong cấu trúc kép mà không có bazơ bổ sung trên vùng dẫn, trong đó phần lõi được kẹp bởi các bazơ mà bắt cặp bazơ với sợi dẫn. Theo một số phương án, phần lõi bao gồm 1 đến 10 nucleotit. Theo một số phương án, phần lõi bao gồm 1-3 nucleotit. Theo các phương án khác, ARNi bao gồm phần lõi thứ hai, trong đó phần lõi thứ hai nằm trên sợi thứ nhất trong vùng dẫn ở 3' đến vùng hạt.

Theo một số phương án của các khía cạnh và phương án trên, cấu trúc kép có chiều dài nằm trong khoảng từ 19 đến 25 hoặc 19 đến 23 cặp bazơ. Theo một số phương án, sợi thứ nhất và/hoặc sợi thứ hai còn bao gồm vùng nhô ra 3', vùng nhô ra 5', hoặc cả vùng nhô ra 3' và 5'. Theo một số phương án, sợi thứ nhất và sợi thứ hai được liên kết với nhau bởi liên kết ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp. Theo một số phương án, liên kết ARN bao gồm từ 4 đến 50 nucleotit. Theo một số phương án, cấu trúc vòng lặp bao gồm 4 đến 20 nucleotit. Theo một số phương án, ARNi bao gồm sợi thứ hai đầu 5' đến 3', liên kết ARN, và sợi thứ nhất. Theo một số phương án, ARNi bao gồm sợi thứ nhất đầu 5' đến 3', liên kết ARN, và sợi thứ hai. Theo một số phương án, ARNi là ARN ức chế nhỏ (siARN), microARN (miARN), hoặc ARN kẹp tóc nhỏ (shARN).

Theo một số phương án của các khía cạnh trên, trình tự nucleotit của ARNi được cải thiện để làm giảm cân gen không nhắm đích (ví dụ, improved làm giảm cân gen trong đó vùng hạt bắt cặp với các trình tự trong các 3'-UTR của các mARN không mong muốn và trực tiếp ngăn cản và làm mất ổn định dịch mã của các bản mã đó). Theo một số phương án, trình tự axit nucleic bao gồm một hoặc nhiều mô típ CpG. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic bao gồm một hoặc nhiều mô típ CpG trong vùng hạt.

Theo một số phương án của các khía cạnh và phương án trên, ARNi nhắm đích ARN mã hóa polypeptit liên quan đến rối loạn. Theo một số phương án, rối loạn là rối loạn CNS. Theo một số phương án, rối loạn là bệnh chuyển hóa tiêu thể (LSD), bệnh Huntington, chứng động kinh, bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, đột quỵ, bệnh thoái hóa hạch nền - vỏ não (CBD), thoái hóa vỏ não hạch đáy (CBGD), bệnh sa sút trí tuệ trán-thái dương (FTD), bệnh teo đa hệ thống (MSA), liệt trên nhân tiến triển (PSP) hoặc ung thư não. Theo một số phương án, rối loạn là bệnh Huntington. Theo các phương án khác, polypeptit là huntingtin. Theo các phương án khác nữa, huntingtin bao gồm đột biến liên quan đến bệnh Huntington. Theo một số phương án, vùng dẫn bao gồm trình tự 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) và vùng không dẫn bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2). Theo một số phương án, vùng dẫn bao gồm trình tự 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) và vùng không dẫn bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16). Theo một số phương án, vùng dẫn bao gồm trình tự 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) và vùng không dẫn bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm độc tính của ARNi bao gồm việc đưa phần lõi vào vùng không dẫn của ARNi để tạo ra ARNi như được mô tả ở đây.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất cấu trúc biểu hiện bao gồm axit nucleic mã hóa ARNi như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa ARNi bao gồm khung miARN. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa ARNi liên kết hoạt động với promoter. Theo một số phương án, promoter được chọn từ promoter rất sớm của virus cự bào (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, promoter phosphoglyxerat kinasz- 1 (PGK), promoter của virus khỉ 40 (SV40), promoter CK6, promoter transthyretin (TTR), promoter

TK, promoter đáp ứng tetracyclin (TRE), promoter HBV, promoter hAAT, promoter LSP, promoter đặc hiệu gan khảm (LSP), promoter E2F, promoter telomeraza (hTERT); vùng tăng cường của virus cự bào/promoter beta-actin ở gà/ β -globin ở thỏ (promoter CAG), promoter 1-alpha yếu tố kéo dài (promoter EFl-alpha), promoter β -glucuronidaza ở người, promoter β -actin ở gà (CBA), promoter LTR của virus sarcom retrovirus, promoter dihydrofolat reductaza, và promoter 13-actin. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện còn bao gồm tín hiệu polyadenyl hóa. Theo một số phương án, tín hiệu polyadenyl hóa là tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò, tín hiệu polyadenyl hóa SV40, hoặc HSV TK pA.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vector bao gồm cấu trúc biểu hiện như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, vector là vector virus liên quan đến adeno (rAAV) tái tổ hợp, vector adenovirus tái tổ hợp, vector lentivirus tái tổ hợp hoặc vector herpes đơn dạng tái tổ hợp (HSV) vector. Theo một số phương án, vector là vector adenovirus tái tổ hợp. Theo một số phương án, vector adenovirus tái tổ hợp thu được từ kiểu huyết thanh của adenovirus 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad loại 3 của bò, Ad loại 2 của chó, Ad của cừu, hoặc Ad loại 3 của lợn. Theo một số phương án, vector adenovirus tái tổ hợp thu được từ kiểu huyết thanh 2 của adenovirus hoặc biến thể của kiểu huyết thanh 5 của adenovirus. Theo các phương án khác, vector là vector lentivirus tái tổ hợp. Theo một số phương án, vector lentivirus tái tổ hợp thu được từ lentivirus được tạo kiểu giả với virus gây viêm miệng có mụn nước (VSV), virus gây viêm màng não lympho bào (LCMV), Virus sông Ross (RRV), Virus Ebola, Virus Marburg, Virus Mokala, Virus Rabies, RD114 hoặc các biến thể của chúng. Theo các phương án khác, vector là vector rHSV. Theo một số phương án, vector rHSV thu được từ rHSV-1 hoặc rHSV-2.

Theo một số phương án của các khía cạnh và phương án trên, sáng chế đề xuất vector rAAV bao gồm cấu trúc biểu hiện mã hóa ARNi như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện được kẹp bởi một hoặc nhiều trình tự đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR) của AAV. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện được kẹp bởi hai ITR AAV. Theo một số phương án, ITR AAV là AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7,

AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, các ITR kiểu huyết thanh AAV của dê, AAV của bò, hoặc AAV của chuột. Theo một số phương án, ITR AAV là các ITR AAV2. Theo một số phương án, vector còn bao gồm đoạn nhồi axit nucleic. Theo một số phương án, đoạn nhồi axit nucleic là ở giữa promoter và axit nucleic mã hóa ARNi. Theo một số phương án, vector là vector rAAV tự bổ sung. Theo một số phương án, vector bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa ARNi và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa phần bổ sung của ARNi, trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trên cùng sợi với trình tự axit nucleic thứ hai dọc theo hầu 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, sáng chế đề xuất tế bào bao gồm vector (ví dụ, vector rAAV) như được mô tả ở đây.

Theo một số phương án của các khía cạnh và phương án trên, sáng chế đề xuất hạt virus bao gồm vector mã hóa ARNi như được mô tả ở đây trong đó hạt virus là hạt AAV bọc vector rAAV, hạt adenovirus bọc vector adenovirus tái tổ hợp, hạt lentivirus bọc vector lentivirus tái tổ hợp hoặc hạt HSV bọc vector HSV tái tổ hợp. Theo một số phương án, hạt virus là hạt adenovirus bọc vector adenovirus tái tổ hợp. Theo một số phương án, hạt adenovirus bao gồm capsit từ kiểu huyết thanh của adenovirus 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad loại 3 của bò, Ad loại 2 của chó, Ad của cừu, hoặc Ad loại 3 của lợn. Theo một số phương án, hạt adenovirus bao gồm kiểu huyết thanh của capsit adenovirus 2 hoặc biến thể của kiểu huyết thanh của capsit adenovirus 5. Theo các phương án khác, hạt virus là hạt lentivirus bọc vector lentivirus tái tổ hợp. Theo một số phương án, hạt lentivirus bao gồm capsit được tạo kiểu giả với virus gây viêm miệng có mụn nước (VSV), virus gây viêm màng não lympho bào (LCMV), Virus sông Ross (RRV), Virus Ebola, Virus Marburg, Virus Mokala, Virus Rabies, RD114 hoặc các biến thể của chúng. Theo các phương án khác, hạt virus là hạt HSV. Theo một số phương án, hạt HSV là hạt rHSV-1 hoặc hạt rHSV-2.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt AAV tái tổ hợp bao gồm vectơ rAAV mã hóa ARNi như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, hạt virus AAV bao gồm AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV của dê, AAV1/AAV2 khảm, AAV của bò, hoặc capsit AAV của chuột capsit kiểu huyết thanh rAAV2/HBoV1. Theo một số phương án, ITR và capsit của hạt virus rAAV thu được từ cùng kiểu huyết thanh AAV. Theo các phương án khác, ITR và capsit của hạt virus rAAV thu được từ các kiểu huyết thanh AAV khác nhau. Theo một số phương án, ITR thu được từ AAV2 và capsit của hạt rAAV thu được từ AAV1.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm hạt virus (ví dụ, hạt rAAV) bao gồm vectơ mã hóa ARNi như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, chế phẩm còn bao gồm chất mang được dụng.

Theo một số khía cạnh sáng chế đề xuất phương pháp ức chế hoặc làm giảm biểu hiện của polypeptit ở bệnh của động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú a ARNi, cấu trúc biểu hiện, vectơ, vectơ rAAV, hạt virus, hạt rAAV, hoặc chế phẩm như được mô tả ở đây, trong đó ARNi nhắm đích ARN mã hóa polypeptit. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự tích tụ của polypeptit trong tế bào của động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi, cấu trúc biểu hiện, vectơ, vectơ rAAV, hạt virus, hạt rAAV, hoặc chế phẩm như được mô tả ở đây, trong đó ARNi nhắm đích ARN mã hóa polypeptit. Theo một số phương án, động vật có vú là người.

Theo một số phương án sáng chế đề xuất việc sử dụng ARNi, cấu trúc biểu hiện, vectơ, vectơ rAAV, hạt virus, hạt rAAV, hoặc chế phẩm như được mô tả ở đây trong sản xuất thuốc để dùng trong bất kỳ trong số phương pháp được mô tả ở đây. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất ARNi, cấu trúc biểu hiện, vectơ, vectơ rAAV, hạt virus, hạt rAAV, hoặc chế phẩm như được mô tả ở đây để dùng trong bất kỳ trong số phương pháp được mô tả ở đây. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất bộ kit để tạo ra ARN can thiệp ở động vật có vú bao gồm ARNi, cấu trúc biểu hiện, vectơ, vectơ rAAV, hạt virus, hạt rAAV, hoặc chế phẩm như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, động vật có vú là người.

Theo một số phương án, bộ kit là để dùng trong bất kỳ trong số phương pháp như được mô tả ở đây.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn bao gồm trình tự 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), trong đó sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép và trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai tạo thành phần lồi trong vùng không dẫn. Theo một số phương án, vùng dẫn bao gồm trình tự axit nucleic có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, vùng không dẫn bao gồm trình tự axit nucleic có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:2. Theo một số phương án, các gốc U ở các gốc 11 và 12 của vùng dẫn tạo thành phần lồi trong vùng dẫn. Theo một số phương án, cấu trúc kép có chiều dài nằm trong khoảng từ 19 đến 25 hoặc 19 đến 23 cặp bazơ. Theo một số phương án, sợi thứ nhất và/hoặc thứ hai còn bao gồm vùng nhô ra 3', vùng nhô ra 5', hoặc cả vùng nhô ra 3' và 5'. Theo một số phương án, sợi thứ nhất và sợi thứ hai được liên kết với nhau bởi liên kết ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp. Theo một số phương án, liên kết ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp bao gồm từ 4 đến 50 nucleotit. Theo một số phương án, liên kết ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp bao gồm từ 4 đến 20 nucleotit. Theo một số phương án, liên kết ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp bao gồm 13 nucleotit. Theo một số phương án, ARNi bao gồm trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO:3. Theo các phương án khác, ARNi bao gồm trình tự nucleotit khoảng 90% tương đồng với trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, ARNi là ARN ức chế nhỏ (siARN), microARN (miARN), hoặc ARN kẹp tóc nhỏ (shARN).

Theo một số phương án của các khía cạnh trên, trình tự axit nucleic của ARNi được cải thiện để làm giảm cam gen không nhắm đích. Theo một số phương án, trình tự bao gồm một hoặc nhiều mô típ CpG. Theo một số phương án, trình tự bao gồm một hoặc nhiều mô típ CpG trong vùng hạt. Theo một số phương án, ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn bao gồm trình tự 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) và vùng không dẫn bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16), trong đó sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép và trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai tạo thành phần lồi trong vùng không dẫn. Theo một số phương án, ARNi

bao gồm sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn bao gồm trình tự 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) và vùng không dẫn bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18), trong đó sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép và trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai tạo thành phần lồi trong vùng không dẫn. Theo một số phương án, vùng dẫn bao gồm trình tự axit nucleic có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:15 và vùng không dẫn bao gồm trình tự axit nucleic có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:16 hoặc trình tự axit nucleic có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:17 và vùng không dẫn bao gồm trình tự axit nucleic có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:18.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất cấu trúc biểu hiện bao gồm axit nucleic mã hóa ARNi như được mô tả ở trên. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa ARNi bao gồm khung miARN. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa ARNi bao gồm khung miR-155. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa ARNi liên kết hoạt động với promoter. Theo một số phương án, promoter có khả năng biểu hiện ARNi trong não của động vật có vú. Theo một số phương án, promoter được chọn từ promoter rất sớm của virus cự bào (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, promoter phosphoglycerat kinaza- 1 (PGK), promoter virus khỉ 40 (SV40), promoter CK6, promoter transthyretin (TTR), promoter TK, promoter đáp ứng tetracyclin (TRE), promoter HBV, promoter hAAT, promoter LSP, promoter đặc hiệu gan khảm (LSP), promoter E2F, promoter telomerase (hTERT); vùng tăng cường của virus cự bào/promoter beta-actin ở gà/ β -globin ở thỏ (promoter CAG), promoter 1-alpha yếu tố kéo dài (promoter EFl-alpha), promoter β -glucuronidaza ở người, promoter β -actin ở gà (CBA), promoter LTR của virus sarcom retrovirus, promoter dihydrofolat reductaza, và promoter 13-actin. Theo một số phương án, promoter là promoter β -actin lai ở gà. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện còn bao gồm tín hiệu polyadenyl hóa. Theo một số phương án, tín hiệu polyadenyl hóa là tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vector bao gồm cấu trúc biểu hiện như được mô tả ở trên. Theo một số phương án, vector là vector virus liên quan đến adeno (rAAV) tái tổ hợp, vector adenovirus tái tổ hợp, vector lentivirus tái tổ hợp hoặc vector herpes đơn dạng tái tổ hợp (HSV) vector. Theo một số phương án, vector adenovirus tái tổ hợp. Theo một số

phương án, vector adenovirut tái tổ hợp thu được từ kiểu huyết thanh của adenovirut 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad loại 3 của bò, Ad loại 2 của chó, Ad của cừu, hoặc Ad loại 3 của lợn. Theo một số phương án, vector adenovirut tái tổ hợp thu được từ kiểu huyết thanh 2 của adenovirut hoặc biến thể của kiểu huyết thanh 5 của adenovirut. Theo một số phương án, vector là vector lentivirut tái tổ hợp. Theo một số phương án, vector lentivirut tái tổ hợp thu được từ lentivirut được tạo kiểu giả với virus gây viêm miệng có mụn nước (VSV), virus gây viêm màng não lympho bào (LCMV), Virus sông Ross (RRV), Virus Ebola, Virus Marburg, Virus Mokala, Virus Rabies, RD114 hoặc các biến thể của chúng. Theo một số phương án, vector là vector rHSV. Theo một số phương án, vector rHSV thu được từ rHSV-1 hoặc rHSV-2.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vector AAV tái tổ hợp (rAAV) bao gồm cấu trúc biểu hiện mã hóa ARNi như được mô tả ở trên. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện được kẹp bởi một hoặc nhiều trình tự đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR) của AAV. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện được kẹp bởi hai ITR AAV. Theo một số phương án, ITR AAV là ITR AAV là AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, các ITR kiểu huyết thanh AAV của dê, AAV của bò, hoặc AAV của chuột. Theo một số phương án, ITR AAV là các ITR AAV2. Theo một số phương án, vector rAAV bao gồm 5' đến 3' ITR AAV2, promoter, axit nucleic mã hóa ARNi, tín hiệu polyadenyl hóa, và ITR AAV2. Theo một số phương án, promoter là promoter CBA. Theo một số phương án, tín hiệu polyadenyl hóa là tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò. Theo một số phương án, vector rAAV bao gồm 5' đến 3' của ITR AAV2, promoter CBA, axit nucleic mã hóa ARNi, tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò, và ITR AAV2. Theo một số phương án, vector còn bao gồm đoạn nhồi axit nucleic. Theo một số phương án, đoạn nhồi axit nucleic bao gồm axit nucleic mã hóa protein huỳnh quang màu xanh lá cây (GFP). Theo một số phương án, đoạn nhồi axit nucleic là ở giữa promoter và axit nucleic mã hóa ARNi. Theo một số phương án, ARNi bao gồm trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO:3. Theo các phương án khác, ARNi bao gồm trình tự nucleotit khoảng 90% tương đồng với trình tự

nucleotit nêu ở SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, vector là vector tự bổ sung. Theo một số phương án, vector bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa ARNi và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa phần bổ sung của ARNi, trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trên cùng sợi với trình tự axit nucleic thứ hai dọc theo hầu 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, sáng chế đề xuất tế bào bao gồm vector hoặc vector rAAV như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, tế bào là tế bào của hệ thần kinh trung ương (CNS).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt virus bao gồm vector mã hóa ARNi như được mô tả ở trên, trong đó hạt virus là hạt AAV bọc vector rAAV, hạt adenovirus bọc vector adenovirus tái tổ hợp, hạt lentivirus bọc vector lentivirus tái tổ hợp hoặc hạt HSV bọc vector HSV tái tổ hợp. Theo một số phương án, hạt virus là hạt adenovirus bọc vector adenovirus tái tổ hợp. Theo một số phương án, hạt adenovirus bao gồm capsit từ kiểu huyết thanh của adenovirus 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad loại 3 của bò, Ad loại 2 của chó, Ad của cừu, hoặc Ad loại 3 của lợn. Theo một số phương án, hạt adenovirus bao gồm kiểu huyết thanh của capsit adenovirus 2 hoặc biến thể của kiểu huyết thanh của capsit adenovirus 5. Theo các phương án khác, hạt virus là hạt lentivirus bọc vector lentivirus tái tổ hợp. Theo một số phương án, hạt lentivirus bao gồm capsit được tạo kiểu giả với virus gây viêm miệng có mụn nước (VSV), virus gây viêm màng não lympho bào (LCMV), Virus sông Ross (RRV), Virus Ebola, Virus Marburg, Virus Mokala, Virus Rabies, RD114 hoặc các biến thể của chúng. Theo các phương án khác, hạt virus là hạt HSV. Theo một số phương án, hạt HSV là hạt rHSV-1 hoặc hạt rHSV-2.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt AAV tái tổ hợp bao gồm vector rAAV mã hóa ARNi như được mô tả ở trên. Theo một số phương án, hạt virus AAV bao gồm AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2

N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV của dê, AAV1/AAV2 khảm, AAV của bò, hoặc capsit AAV của chuột capsit kiểu huyết thanh rAAV2/HBoV1. Theo một số phương án, ITR và capsit của hạt virus rAAV thu được từ cùng kiểu huyết thanh AAV. Theo các phương án khác, ITR và capsit của hạt virus rAAV thu được từ các kiểu huyết thanh AAV khác nhau. Theo một số phương án, hạt virus rAAV bao gồm capsit AAV2. Theo một số phương án, hạt virus rAAV bao gồm capsit của AAV1, và trong đó vector bao gồm ITR AAV2.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm hạt virus hoặc hạt rAAV như được mô tả ở trên. Theo các phương án khác, chế phẩm bao gồm chất mang dược dụng. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh Huntington ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú chế phẩm. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế biểu hiện của htt ở động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú chế phẩm. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự tích tụ của htt trong tế bào của động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú chế phẩm.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị bệnh Huntington ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế biểu hiện của htt ở động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự tích tụ của htt trong tế bào của động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ

ID NO:1) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất.

Theo một số phương án của các phương pháp nêu trên, vùng dẫn bao gồm trình tự axit nucleic có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, vùng không dẫn bao gồm trình tự axit nucleic có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:2. Theo một số phương án, các gốc U ở các gốc 11 và 12 của vùng dẫn tạo thành phần lõi trong vùng dẫn. Theo một số phương án, cấu trúc kẹp có chiều dài nằm trong khoảng từ 19 đến 25 hoặc 19 đến 23 cặp bazơ. Theo một số phương án, sợi thứ nhất và/hoặc thứ hai còn bao gồm vùng nhô ra 3', vùng nhô ra 5', hoặc cả vùng nhô ra 3' và 5'. Theo một số phương án, sợi thứ nhất và sợi thứ hai được liên kết với nhau bởi liên kết ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp. Theo một số phương án, liên kết ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp bao gồm từ 4 đến 50 nucleotit. Theo một số phương án, liên kết ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp bao gồm từ 4 đến 20 nucleotit. Theo một số phương án, liên kết ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp bao gồm 13 nucleotit. Theo một số phương án, ARNi bao gồm trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO:3. Theo các phương án khác, ARNi bao gồm trình tự nucleotit khoảng 90% tương đồng với trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, ARNi là ARN ức chế nhỏ (siARN), microARN (miARN), hoặc ARN kẹp tóc nhỏ (shARN).

Theo một số phương án của các phương pháp nêu trên, axit nucleic được cải thiện để làm giảm cảm gen không nhắm đích. Theo một số phương án, axit nucleic bao gồm một hoặc nhiều mô típ CpG. Theo một số phương án, axit nucleic bao gồm một hoặc nhiều mô típ CpG trong vùng hạt.

Theo một số phương án sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị bệnh Huntington ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số phương án sáng chế đề xuất phương pháp để ức chế biểu hiện của htt ở động vật có vú mắc bệnh

Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số phương án sáng chế đề xuất phương pháp để ức chế sự tích tụ của htt trong tế bào của động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số phương án, sợi thứ nhất bao gồm trình tự axit nucleic có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:15 nhưng vẫn giữ mô típ CpG. Theo một số phương án, sợi thứ hai bao gồm trình tự axit nucleic có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:16 nhưng vẫn giữ mô típ CpG.

Theo một số phương án sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị bệnh Huntington ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số phương án sáng chế đề xuất phương pháp để ức chế biểu hiện của htt ở động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số phương án sáng chế đề xuất phương pháp để ức chế sự tích tụ của htt trong tế bào của động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-

ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số phương án, sợi thứ nhất bao gồm trình tự axit nucleic có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:17 nhưng vẫn giữ mô típ CpG. Theo một số phương án, sợi thứ hai bao gồm trình tự axit nucleic có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:18 nhưng vẫn giữ mô típ CpG.

Theo một số phương án của các phương pháp nêu trên, cấu trúc biểu hiện bao gồm axit nucleic mã hóa ARNi như được mô tả ở trên. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa ARNi bao gồm khung miARN. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa ARNi bao gồm khung miR-155. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa ARNi liên kết hoạt động với promoter. Theo một số phương án, promoter có khả năng biểu hiện ARNi trong não của động vật có vú. Theo một số phương án, promoter được chọn từ promoter rất sớm của virus cự bào (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, promoter phosphoglycerat kinaza- 1 (PGK), promoter virus khỉ 40 (SV40), promoter CK6, promoter transthyretin (TTR), promoter TK, promoter đáp ứng tetracyclin (TRE), promoter HBV, promoter hAAT, promoter LSP, promoter đặc hiệu gan khảm (LSP), promoter E2F, promoter telomeraza (hTERT); vùng tăng cường của virus cự bào/promoter beta-actin ở gà/ β -globin ở thỏ (promoter CAG), promoter 1-alpha yếu tố kéo dài (promoter EFl-alpha), promoter β -glucuronidaza ở người, promoter β -actin ở gà (CBA), promoter LTR của virus sarcom retrovirus, promoter dihydrofolat reductaza, và promoter 13-actin. Theo một số phương án, promoter là promoter β -actin lai ở gà. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện còn bao gồm tín hiệu polyadenyl hóa. Theo một số phương án, tín hiệu polyadenyl hóa là tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò. Theo một số phương án,

Theo một số phương án của các phương pháp nêu trên, vector bao gồm cấu trúc biểu hiện như được mô tả ở trên. Theo một số phương án, vector là vector virus liên quan đến adeno (rAAV) tái tổ hợp, vector adenovirus tái tổ hợp, vector lentivirus tái tổ hợp hoặc vector herpes đơn dạng tái tổ hợp (HSV) vector. Theo một số phương án, vector adenovirus tái tổ hợp. Theo một số phương án, vector adenovirus tái tổ hợp thu được từ kiểu huyết thanh của adenovirus 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad loại 3

của bò, Ad loại 2 của chó, Ad của cừu, hoặc Ad loại 3 của lợn. Theo một số phương án, vectơ adenovirut tái tổ hợp thu được từ kiểu huyết thanh 2 của adenovirut hoặc biến thể của kiểu huyết thanh 5 của adenovirut. Theo một số phương án, vectơ là vectơ lentivirut tái tổ hợp. Theo một số phương án, vectơ lentivirut tái tổ hợp thu được từ lentivirut được tạo kiểu giả với virus gây viêm miệng có mụn nước (VSV), virus gây viêm màng não lympho bào (LCMV), Virus sông Ross (RRV), Virus Ebola, Virus Marburg, Virus Mokala, Virus Rabies, RD114 hoặc các biến thể của chúng. Theo một số phương án, vectơ là vectơ rHSV. Theo một số phương án, vectơ rHSV thu được từ rHSV-1 hoặc rHSV-2.

Theo một số phương án của các phương pháp nêu trên, vectơ rAAV tái tổ hợp (rAAV) bao gồm cấu trúc biểu hiện mã hóa ARNi như được mô tả ở trên. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện được kẹp bởi một hoặc nhiều trình tự đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR) của AAV. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện được kẹp bởi hai ITR AAV. Theo một số phương án, ITR AAV là ITR AAV là AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, các ITR kiểu huyết thanh AAV của dê, AAV của bò, hoặc AAV của chuột. Theo một số phương án, ITR AAV là các ITR AAV2. Theo một số phương án, vectơ rAAV bao gồm 5' đến 3' ITR AAV2, promoter, axit nucleic mã hóa ARNi, tín hiệu polyadenyl hóa, và ITR AAV2. Theo một số phương án, promoter là promoter CBA. Theo một số phương án, tín hiệu polyadenyl hóa là tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò. Theo một số phương án, vectơ rAAV bao gồm 5' đến 3' ITR AAV2, promoter CBA, axit nucleic mã hóa ARNi, tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò, và ITR AAV2. Theo một số phương án, vectơ còn bao gồm đoạn nhồi axit nucleic. Theo một số phương án, đoạn nhồi axit nucleic bao gồm axit nucleic mã hóa protein huỳnh quang màu xanh lá cây (GFP). Theo một số phương án, đoạn nhồi axit nucleic là ở giữa promoter và axit nucleic mã hóa ARNi. Theo một số phương án, ARNi bao gồm trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO:3. Theo các phương án khác, ARNi bao gồm trình tự nucleotit khoảng 90% tương đồng với trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, vectơ là vectơ tự bổ sung. Theo một số phương án, vectơ bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa ARNi và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa phần bổ sung của ARNi, trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trên cùng sợi với trình tự axit nucleic thứ

hai dọc theo hầu 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 phương pháp nêu trên, hạt virus bao gồm vector mã hóa ARNi như được mô tả ở trên, trong đó hạt virus là hạt AAV bọc vector rAAV, hạt adenovirus bọc vector adenovirus tái tổ hợp, hạt lentivirus bọc vector lentivirus tái tổ hợp hoặc hạt HSV bọc vector HSV tái tổ hợp. Theo một số phương án, hạt virus là hạt adenovirus bọc vector adenovirus tái tổ hợp. Theo một số phương án, hạt adenovirus bao gồm capsit từ kiểu huyết thanh của adenovirus 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad loại 3 của bò, Ad loại 2 của chó, Ad của cừu, hoặc Ad loại 3 của lợn. Theo một số phương án, hạt adenovirus bao gồm kiểu huyết thanh của capsit adenovirus 2 hoặc biến thể của kiểu huyết thanh của capsit adenovirus 5. Theo các phương án khác, hạt virus là hạt lentivirus bọc vector lentivirus tái tổ hợp. Theo một số phương án, hạt lentivirus bao gồm capsit được tạo kiểu giả với virus gây viêm miệng có mụn nước (VSV), virus gây viêm màng não lympho bào (LCMV), Virus sông Ross (RRV), Virus Ebola, Virus Marburg, Virus Mokala, Virus Rabies, RD114 hoặc các biến thể của chúng. Theo các phương án khác, hạt virus là hạt HSV. Theo một số phương án, hạt HSV là hạt rHSV-1 hoặc hạt rHSV-2.

Theo một số phương án của các phương pháp nêu trên, hạt AAV tái tổ hợp bao gồm vector rAAV mã hóa ARNi như được mô tả ở trên. Theo một số phương án, hạt virus AAV bao gồm AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV của dê, AAV1/AAV2 khảm, AAV của bò, hoặc capsit AAV của chuột capsit kiểu huyết thanh rAAV2/HBoV1. Theo một số phương án, ITR và capsit của hạt virus rAAV thu được từ cùng kiểu huyết thanh AAV. Theo các phương án khác, ITR và capsit của hạt virus rAAV thu được từ các kiểu huyết thanh AAV khác nhau. Theo một số phương án, hạt virus rAAV

bao gồm capsit AAV2. Theo một số phương án, hạt virus rAAV bao gồm capsit của AAV1, và trong đó vector bao gồm ITR AAV2.

Theo một số phương án của phương pháp nêu trên hạt virus hoặc hạt rAAV là trong chế phẩm. Theo một số phương án, chế phẩm còn bao gồm chất mang được dụng.

Theo một số phương án sáng chế đề xuất việc sử dụng ARNi, cấu trúc biểu hiện, vector, vector rAAV, hạt virus, hạt rAAV, hoặc chế phẩm như được mô tả ở đây trong sản xuất thuốc để dùng trong bất kỳ trong số phương pháp để điều trị bệnh Huntington được mô tả ở đây. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất ARNi, cấu trúc biểu hiện, vector, vector rAAV, hạt virus, hạt rAAV, hoặc chế phẩm như được mô tả ở đây để dùng trong bất kỳ trong số phương pháp để điều trị bệnh Huntington được mô tả ở đây. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất bộ kit để tạo ra ARN can thiệp để điều trị bệnh Huntington ở động vật có vú bao gồm ARNi, cấu trúc biểu hiện, vector, vector rAAV, hạt virus, hạt rAAV, hoặc chế phẩm như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, động vật có vú là người. Theo một số phương án, bộ kit là để dùng trong bất kỳ trong số phương pháp như được mô tả ở đây.

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 1A&B thể hiện AAV2/1-miARN-Htt được trung gian làm giảm mức Htt *in vitro*. **(HÌNH 1A)** Sơ đồ của cấu trúc tiền virus được sử dụng để tạo ra AAV2/1-miARN-Htt. Plasmid được thiết kế để biểu hiện GFP và trình tự miARN đối với Htt dưới sự kiểm soát phiên mã của promoter β -actin (CBA) ở gà. ITR, đoạn lặp cuối ngược chiều. eGFP, protein huỳnh quang màu xanh lá cây cải tiến. PolyA, polyA hoocmon tăng trưởng ở bò. **(HÌNH 1B)** Phân tích PCR định lượng ước lượng các mức Htt mRNA trong tế bào HEK293 48 giờ sau xử lý AAV-2/1-miARN-Htt. PPIA dùng làm gen đối chứng chuẩn hóa. Các giá trị đưa ra là $\pm$ SEM trung bình. * $p < 0,05$.

HÌNH 2A-D thể hiện phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS) sau khi lây nhiễm tế bào HEK293 bằng vector AAV2/1-eGFP-miARN-Htt. **(HÌNH 2A)** Đặc điểm tương quan phân tích tế bào theo dòng chảy của tế bào HEK293 với eGFP. Tán xạ ánh sáng góc hẹp A (FSC-A) thể hiện kích thước, vùng tế bào tương đối và SSC-A thể hiện độ phức

tập tế bào tương đối, vùng với mỗi chấm thể hiện một tế bào. **(HÌNH 2B)** Biểu đồ huỳnh quang của cường độ huỳnh quang eGFP của các tế bào với mỗi màu phân ranh giới các tế bào được phân loại là GFP-, GFP+, GFP++, hoặc GFP+++, tương ứng. **(HÌNH 2C)** Biểu đồ ánh sáng FACS của các tế bào HEK293 biểu hiện eGFP. **(HÌNH 2D)** Bảng tính tế bào sau khi phân loại FACS.

HÌNH 3A-E thể hiện sự chuyển nạp thể vân lan rộng và giảm Htt sau khi tiêm trong thể vân dịch tiêm AAV2/1-miARN-Htt trong chuột YAC128. **(HÌNH 3A)** Đặc điểm tương quan phân tích tế bào theo dòng chảy của tế bào thể vân với eGFP. Tán xạ ánh sáng góc hẹp A (FSC-A) thể hiện kích thước tế bào tương đối, vùng và SSC-A thể hiện độ phức tạp tế bào tương đối, vùng với mỗi chấm thể hiện một tế bào. **(HÌNH 3B)** Đồ thị điểm sử dụng phân tích FSC-A với FITC-A. Tế bào chết được loại ra và các tế bào eGFP+ và eGFP được chọn. Biểu hiện GFP từ các tế bào này được đánh giá và định lượng và thể hiện trên **HÌNH 3C**. **(HÌNH 3C)** Biểu đồ huỳnh quang của cường độ huỳnh quang eGFP gom bằng thiết bị lọc 505LP 530/30BP. **(HÌNH 3D)** Kính hiển vi huỳnh quang thể hiện biểu hiện eGFP lan rộng trong toàn thể vân sau khi dùng nội sọ AAV2/1-eGFP-miARN-Htt. **(HÌNH 3E)** Phân tích PCR định lượng ước lượng các mức Htt mRNA trong thể vân 1 và 5 tháng sau khi tiêm vector AAV2/1-miARN-Htt hoặc AAV2/1-trống đối chứng. PPIA dùng làm gen đối chứng chuẩn hóa. Các giá trị đưa ra là $\pm$ SEM trung bình. * $p < 0,05$. Chuột YAC128 được xử lý AAV2/1-miARN-Htt (N=8) thể hiện khoảng 50% giảm mức Htt mRNA trong thể vân khi so với chuột được tiêm to AAV2/1-trống (N=8 mỗi thời điểm) ở 1 và 5 tháng sau xử lý.

HÌNH 4 thể hiện mRNA Htt ở chuột giảm sau khi tiêm trong thể vân dịch tiêm AAV2/1-miARN-Htt ở chuột YAC128. Phân tích PCR định lượng ước lượng nội sinh các mức Htt mRNA ở chuột trong thể vân 1 và 5 tháng sau khi tiêm vector đối chứng AAV2/1-miARN-Htt hoặc AAV2/1-trống. PPIA dùng làm gen đối chứng chuẩn hóa. Các giá trị đưa ra là $\pm$ SEM trung bình. * $p < 0,05$.

HÌNH 5A-I thể hiện rằng sự hạ thấp mức Htt duy trì ở chuột YAC128 bằng AAV2/1-miARN-Htt không gây ra viêm thần kinh công khai. **(HÌNH 5A-C)** Nhuộm màu Hematoxylin và Eosin (H&E) các phần mô vân từ chuột YAC128 được xử lý bằng AAV2/1-miARN-Htt ở 1 **(HÌNH 5B)** hoặc 5 tháng **(HÌNH 5C)** sau tiêm AAV-miARN-Htt, so với chuột YAC128 được xử lý bằng vector AAV2/1-trống **(HÌNH 5A)**. **(HÌNH 5D-F)** nhuộm

màu hóa mô miễn dịch GFAP các phần mô vụn từ chuột YAC128 được xử lý bằng AAV2/1-miARN-Htt ở 1 (HÌNH 5E) hoặc 5 tháng (HÌNH 5F) sau tiêm AAV-miARN-Htt, so với chuột YAC128 được xử lý bằng vector AAV2/1-trống (HÌNH 5D). (HÌNH 5G-I) nhuộm màu hóa mô miễn dịch Iba-1 các phần mô vụn từ chuột YAC128 được xử lý bằng AAV2/1-miARN-Htt ở 1 (HÌNH 5H) hoặc 5 tháng (HÌNH 5I) sau tiêm AAV-miARN-Htt, so với chuột YAC128 được xử lý bằng vector AAV2/1-trống (HÌNH 5G). Tất cả ảnh được bày ngang nhau để so sánh chính xác. Khung tỷ lệ: 0,25mm.

HÌNH 5J&K thể hiện rằng sự hạ thấp mức Htt duy trì ở chuột YAC128 bởi AAV2/1-miARN-Htt không gây ra viêm thần kinh công khai. (HÌNH 5J) Các mức vụn của mức mARN GFAP bởi QPCR ở 1 hoặc 5 tháng sau khi tiêm AAV2/1-miARN-Htt. (HÌNH 5K) Các mức mARN Iba1 bởi QPCR ở 1 hoặc 5 tháng sau khi tiêm AAV2/1-miARN-Htt. Các giá trị đưa ra là $\pm$ SEM trung bình. *Khác biệt đáng kể từ chuột AAV2/1-trống, $p < 0,05$; ANOVA.

HÌNH 6A-D thể hiện thiết kế thử nghiệm để thử hiệu quả của cho dùng thể vụn AAV2/1-miARN-Htt ở chuột YAC128 về thiếu hụt hành vi. (HÌNH 6A) minh họa thời gian thử nghiệm. Chuột YAC128 hai tháng tuổi và kiểu đại nhận dịch tiêm vụn song song của AAV2/1-miARN-Htt (N=8 YAC và N=8 WT) hoặc đối chứng AAV2/1-trống (N=8 YAC và N=8 WT) và được đưa vào thử nghiệm cân quay và thử nghiệm bơi cưỡng bức ở 4 và 5 tháng tuổi, tương ứng. Tất cả chuột được gây chết ở 5 tháng tuổi, và sau đó gom mô để phân tích sinh hóa và mô học. (HÌNH 6B) Kính hiển vi huỳnh quang thể hiện biểu hiện eGFP trong thể vụn ở 3 tháng sau xử lý. Các mức protein Htt ở chuột (HÌNH 6C) và người (HÌNH 6D) bằng phương pháp Western blot 3 tháng sau xử lý AAV2/1-miARN-Htt.

HÌNH 6E&F thể hiện rằng việc cho dùng thể vụn AAV2/1-miARN-Htt làm giảm thiếu hụt hành vi ở chuột YAC128. (HÌNH 6E) Thử nghiệm cân quay đầy nhanh ở 2 tháng sau khi tiêm AAV2/1-miARN-Htt. (HÌNH 6F) Thời gian đứng im trong Thử nghiệm bơi cưỡng bức 3 tháng sau khi tiêm AAV2/1-miARN-Htt. Các giá trị đưa ra là $\pm$ SEM trung bình. *Khác biệt đáng kể từ chuột AAV2/1-trống, $p < 0,05$; ANOVA sau Thử nghiệm kiểm định sau của Tukey.

HÌNH 7A&B thể hiện rằng xử lý sử dụng AAV2/1-miARN-Htt hiệu chỉnh một phần rối loạn phiên mã của thụ thể DARPP-32 và D1 ở chuột YAC128. Thụ thể DARPP-32 và D1 các mức mARN trong thể vân của chuột YAC128 và kiểu đại được đánh giá bởi QPCR ở 3 tháng sau khi tiêm AAV2/1-miARN-Htt (N=8 YAC và N=8 WT) hoặc đối chứng AAV2/1-Trống (N=8 YAC và N=8 WT). (**HÌNH 7A**) các mức mARN DARPP-32 vân ở chuột YAC128 và chuột cùng lứa kiểu đại FVB sau xử lý AAV2/1-Trống hoặc AAV2/1-miARN-Htt. (**HÌNH 7B**) các mức mARN thụ thể D1 vân trong chuột YAC128 và chuột cùng lứa kiểu đại FVB sau xử lý AAV2/1-trống hoặc AAV2/1-miARN-Htt. Các giá trị đưa ra là $\pm$ SEM trung bình. *Khác biệt đáng kể từ các mẫu AAV2/1-trống, $p < 0,05$; ANOVA sau Thử nghiệm kiểm định sau của Tukey.

HÌNH 8A-D thể hiện cho dùng nội sọ AAV2/1-miARN-Htt cải thiện thiếu hụt vận động và làm giảm tập hợp Htt đột biến trong thể vân của chuột YAC128 có tuổi. (**HÌNH 8A**) Nhuộm màu hóa mô miễn dịch của các phần não chuột YAC128 thể hiện tập hợp Htt đột biến trong thể vân. Tập hợp được thấy ở chuột YAC128 6, 9, 12 (không thể hiện) và 24 tháng tuổi. Chuột kiểu đại thể hiện không có tập hợp ở tất cả các độ tuổi được thử. (**HÌNH 8B**) Minh họa thời gian thử nghiệm để thử nghiệm AAV2/1-miARN-HTT ở chuột YAC 128 có tuổi và kiểu đại. Chuột bảy tuần tuổi nhận dịch tiêm song song trong thể vân của AAV2/1-miARN-Htt (N=6 YAC và N=4 WT) hoặc đối chứng AAV2/1-GFP (N=6 YAC và N=4 WT) và sau đó được thử hành vi ở 10 tháng tuổi. Não được gom ở 5 tháng sau tiêm (khi chuột được 12 tháng tuổi). (**HÌNH 8C**) Năng lực của chuột YAC128 trên thử nghiệm cần quay ở 3 tháng sau khi tiêm AAV-miARN-Htt. (**HÌNH 8D**) phân tích hóa mô miễn dịch EM-48 của các phần não của chuột YAC 128 được xử lý AAV2/1-miARN-Htt hoặc AAV2/1-eGFO ở 5 tháng sau xử lý.

HÌNH 9A&B minh họa phần lỗi trong ở trình tự thân của shARN được dùng cho các thử nghiệm được mô tả ở đây. Như được so sánh với khớp trình tự hoàn toàn được thể hiện trên **HÌNH 9A** (SEQ ID NO:23), trình tự được dùng trong các thử nghiệm trên bao gồm nucleotit adenin (A) bổ sung ở đầu 3' của trình tự hạt (đánh dấu bằng mũi tên), mà không có nucleotit thymine (T) tương ứng trong sợi dẫn (SEQ ID NO:24) (**HÌNH 9B**). Trình tự bổ sung cho trình tự đích được đánh dấu.

HÌNH 10 thể hiện trình tự miARN PS170XA gốc (SEQ ID NO:19) và hai phiên bản không nhắm đích thấp được cải biến, PS170XAL1 (SEQ ID NO:25) và PS170XAL2 (SEQ ID NO:26).

HÌNH 11 thể hiện khả năng AAV khả năng của AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 và 170XAL2 trung gian làm giảm Htt in vitro. Các giá trị đưa ra là $\pm$ SEM trung bình.

HÌNH 12A-12D thể hiện khả năng AAV khả năng AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 và 170XAL2 để làm câm biểu hiện Htt trong thể vân của chuột YAC128. Htt ở người thể hiện trên **HÌNH 12A** và **12C**. Htt ở chuột được thể hiện trên **HÌNH 12B** và **12D**. Beta-tubulin dùng làm gen đối chứng chuẩn hóa cho tất cả các kỹ thuật western blot. *Khác biệt đáng kể từ chuột đối chứng không được xử lý, $p < 0,05$; ANOVA sau thử nghiệm kiểm định sau của Tukey.

HÌNH 13A thể hiện GFAP và **HÌNH 13B** thể hiện mức mARN Iba1 trong thể vân. PPIA người dùng làm gen đối chứng chuẩn hóa. Các giá trị đưa ra là $\pm$ SEM trung bình. *Khác biệt đáng kể từ chuột đối chứng không được xử lý, $p < 0,05$; ANOVA sau thử nghiệm kiểm định sau của Tukey.

HÌNH 14 thể hiện nhuộm màu hóa mô miễn dịch GFAP và Iba1 của các phần mô vân từ chuột YAC128 được xử lý bằng AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 hoặc AAV2/1-miARN-Htt 170XAL2. Khung tỷ lệ = 50 μ M.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một số khía cạnh sáng chế đề xuất ARNi cải tiến; ví dụ, ARNi cải tiến dùng để chữa bệnh. Theo một số phương án, ARNi bao gồm sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và thứ hai tạo thành cấu trúc kép; b) sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn có ít nhất 11 bazơ, trong đó vùng dẫn bao gồm vùng hạt bao gồm các bazơ 1-N của sợi dẫn, trong đó $N=7$ hoặc $N=8$; và c) sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn có ít nhất 11 bazơ, trong đó vùng không dẫn bao gồm trình tự lỗi đối diện với bất kỳ một hoặc nhiều trong số các bazơ 1-($N+2$) của vùng dẫn trong cấu trúc kép. Theo một số phương án, ARNi bao gồm sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và thứ hai tạo thành cấu trúc kép; b) sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn có ít nhất 10 bazơ, trong đó vùng dẫn bao gồm vùng hạt bao gồm các bazơ 1-N của sợi dẫn, trong đó $N=7$ hoặc $N=8$; và c) sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn

có ít nhất 10 bazơ, trong đó vùng không dẫn bao gồm trình tự lồi đối diện với bất kỳ một hoặc nhiều trong số các bazơ 1-(N+1) của vùng dẫn trong cấu trúc kép. Theo một số phương án, ARNi bao gồm sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và thứ hai tạo thành cấu trúc kép, b) sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn có ít nhất 9 bazơ, trong đó vùng dẫn bao gồm vùng hạt bao gồm bazơ 2-7 hoặc 2-8 của sợi dẫn, và c) sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn có ít nhất 9 bazơ, trong đó vùng không dẫn bao gồm trình tự lồi đối diện với bazơ 1 hoặc bazơ 9 của vùng dẫn trong cấu trúc kép. Theo một số phương án, ARNi bao gồm sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và thứ hai tạo thành cấu trúc kép, b) sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn có ít nhất 9 bazơ, trong đó vùng dẫn bao gồm vùng hạt bao gồm bazơ 2-7 hoặc 2-8 của sợi dẫn, và c) sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn có ít nhất 9 bazơ, trong đó vùng không dẫn bao gồm trình tự lồi đối diện với bazơ 1 của vùng dẫn trong cấu trúc kép. Theo một số phương án, ARNi là ARNi nhân tạo.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất bằng biểu hiện, vector (ví dụ, vector AAV, adenovirut, lentivirut, hoặc HSV tái tổ hợp), tế bào, hạt virus (ví dụ, hạt virus AAV, adenovirut, lentivirut, hoặc HSV), và dược phẩm bao gồm ARNi theo sáng chế. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị bệnh hoặc rối loạn ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú dược phẩm bao gồm ARNi theo sáng chế. Theo các khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất bộ kit bao gồm ARNi theo sáng chế.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất ARNi để điều trị bệnh Huntington. Theo một số phương án, ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), trong đó sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép và trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 nêu ở SEQ ID NO:2 sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất bằng biểu hiện, vector (ví dụ, vector AAV, adenovirut, lentivirut, hoặc HSV tái tổ hợp), các tế bào, hạt virus (ví dụ, hạt virus AAV, adenovirut, lentivirut, hoặc HSV), và dược phẩm bao gồm ARNi theo sáng chế. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị bệnh Huntington, ức chế biểu hiện của htt, và ức chế sự tích tụ của htt trong tế bào ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú dược phẩm bao gồm ARNi theo sáng chế. Còn theo các khía cạnh khác nữa,

sáng chế đề xuất để sử dụng được phẩm bao gồm ARNi theo sáng chế để điều trị bệnh Huntington (ví dụ, cải thiện các triệu chứng của bệnh Huntington), ức chế biểu hiện của htt, hoặc ức chế sự tích tụ của htt trong tế bào ở động vật có vú mắc bệnh Huntington. Theo các khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất bộ kit để điều trị bệnh Huntington ở động vật có vú bao gồm ARNi theo sáng chế.

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 chuyên gia 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 và cộng sự., 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, và cộng sự. eds., 2003); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames và G.R. Taylor eds., 1995); *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow và Lane, eds., 1988); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley và 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 và P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, và D.G. Newell, eds., J. Wiley và Sons, 1993-8); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir và C.C. Blackwell, eds., 1996); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller và M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis và cộng sự., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan và cộng sự., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel và cộng sự., eds., J. Wiley và Sons, 2002); *Immunobiology* (C.A. Janeway và cộng sự., 2004); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd và C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Sử dụng Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow và D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti và J. D. Capra, eds., Harwood Academic

Publishers, 1995); và *Cancer: Principles và Practice of Oncology* (V.T. DeVita và cộng sự., eds., J.B. Lippincott Company, 2011).

Định nghĩa

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

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 deoxyribonucleotit. Do đó, thuật ngữ này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ADN hoặc ARN sợi đơn, sợi đôi hoặc đa sợi, ADN hệ gen, cADN, thể lai ADN-ARN, hoặc polyme có chứa bazơ purin và pyrimidin, 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 phosphoramidat và do đó có thể là oligodeoxynucleosit phosphoramidat (P-NH₂) hoặc oligome phosphoramidat-phosphodiester hỗn hợp. Ngoài ra, polynucleotit cấu trúc 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 bazơ axit amin, và không bị giới hạn ở chiều dài tối thiểu. Các polyme của các bazơ axit amin như vậy có thể chứa các bazơ axit amin tự nhiên hoặc không tự nhiên, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, peptit, oligopeptit, đipe, tripe, và multipe của các bazơ 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, acetyl 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.

"Vector virus tái tổ hợp" chỉ vector polynucleotit tái tổ hợp có chứa một hoặc nhiều trình tự khác loại (*tức là*, trình tự axit nucleic không có nguồn gốc từ virus). Trong trường hợp vector AAV tái tổ hợp, axit nucleic tái tổ hợp được kẹp bởi ít nhất một và theo các phương án hai, trình tự đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR).

"Vector AAV tái tổ hợp (vector rAAV)" đề cập đến vector polynucleotit bao gồm một hoặc nhiều trình tự khác loại (*tức là*, trình tự axit nucleic không có nguồn gốc AAV) mà được kẹp bởi ít nhất một, và theo các phương án hai, AAV trình tự đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR). Các vector rAAV như vậy có thể được sao chép và được đóng gói vào các hạt virus lây nhiễm khi có mặt trong tế bào chủ đã được lây nhiễm virus 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 vector rAAV được kết hợp vào polynucleotit lớn hơn (*ví dụ*, trong nhiễm sắc thể hoặc trong vector khác như plasmit được sử dụng để tách dòng hoặc chuyển nhiễm), thì vector rAAV có thể được gọi là "tiền vector" mà có thể được "giải phóng" bởi sự sao chép và bao trong capsit với sự có mặt của chức năng đóng gói AAV và chức năng hỗ trợ thích hợp. Vector rAAV có thể ở một dạng bất kỳ trong số nhiều dạng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, plasmit, nhiễm sắc thể nhân tạo mạch thẳng, được tạo phức với lipid, được bọc trong liposom, và được bao trong capsit trong hạt virus, cụ thể là hạt AAV. Vector rAAV có thể được đóng gói vào capsit virus AAV để tạo ra "hạt virus kết hợp adeno tái tổ hợp (hạt rAAV)".

"Vector adenovirus tái tổ hợp" đề cập đến vector polynucleotit bao gồm một hoặc nhiều trình tự khác loại (*tức là*, trình tự axit nucleic không có nguồn gốc adenovirus) mà được kẹp bởi ít nhất một trình tự đoạn lặp cuối ngược chiều của adenovirus (ITR). Theo một số phương án, axit nucleic tái tổ hợp được kẹp bởi hai trình tự đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR). Vector virus tái tổ hợp này có thể được sao chép và đóng gói vào hạt virus lây nhiễm khi có mặt trong tế bào chủ mà biểu hiện các gen adenovirus cần thiết mất từ bộ gen virus tái tổ hợp (*ví dụ*, gen E1, gen E2, gen E4, v.v.). Khi vector virus tái tổ hợp được kết hợp vào polynucleotit lớn hơn (*ví dụ*, trong nhiễm sắc thể hoặc trong vector khác như plasmit được sử dụng để tách dòng hoặc chuyển nhiễm), thì vector virus tái tổ hợp có thể được gọi là "tiền

vector" mà có thể được "giải phóng" bởi sự sao chép và bao trong capsit với sự có mặt của chức năng đóng gói adenovirut. Vector virut tái tổ hợp có thể ở một dạng bất kỳ trong số nhiều dạng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, plasmit, nhiễm sắc thể nhân tạo mạch thẳng, được tạo phức với lipit, được bọc trong liposom, và được bao trong capsit trong hạt virut, ví dụ, hạt adenovirut. Vector virut tái tổ hợp có thể được đóng gói vào capsit virut adenovirut để tạo ra "hạt adenovirut tái tổ hợp."

"Vector lentivirut tái tổ hợp " đề cập đến vector polynucleotit bao gồm một hoặc nhiều trình tự khác loại (*tức là*, trình tự axit nucleic không có nguồn gốc lentivirut) mà được kẹp bởi ít nhất một trình tự đoạn lặp cuối lentivirut (LTR). Theo một số phương án, axit nucleic tái tổ hợp được kẹp bởi hai trình tự đoạn lặp cuối lentivirut (LTR). Vector virut tái tổ hợp này có thể được sao chép và đóng gói vào hạt virut lây nhiễm khi có mặt trong tế bào chủ mà đã lây nhiễm chức năng hỗ trợ thích hợp. Vector lentivirut tái tổ hợp có thể được đóng gói vào capsit lentivirut để tạo ra "hạt lentivirut tái tổ hợp."

"Vector herpes đơn dạng tái tổ hợp (Vector HSV tái tổ hợp)" đề cập đến vector polynucleotit bao gồm một hoặc nhiều trình tự khác loại (*tức là*, trình tự axit nucleic không có nguồn gốc HSV) mà được kẹp bởi trình tự đoạn lặp cuối HSV. Vector virut tái tổ hợp này có thể được sao chép và đóng gói vào hạt virut lây nhiễm khi có mặt trong tế bào chủ mà đã lây nhiễm chức năng hỗ trợ thích hợp. Khi vector virut tái tổ hợp được kết hợp vào polynucleotit lớn hơn (*ví dụ*, trong nhiễm sắc thể hoặc trong vector khác như plasmit được sử dụng để tách dòng hoặc chuyển nhiễm), thì vector virut tái tổ hợp có thể được gọi là "tiền vector" mà có thể được "giải phóng" bởi sự sao chép và bao trong capsit với sự có mặt của chức năng đóng gói HSV. Vector virut tái tổ hợp có thể ở một dạng bất kỳ trong số nhiều dạng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, plasmit, nhiễm sắc thể nhân tạo mạch thẳng, được tạo phức với lipit, được bọc trong liposom, và được bao trong capsit trong hạt virut, ví dụ, hạt HSV. Vector virut tái tổ hợp có thể được đóng gói vào capsit HSV để tạo ra "hạt virut herpes đơn dạng tái tổ hợp."

"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 vector virus là trình tự nucleotit khác loại so với vector 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 can thiệp ARN, chẳng hạn như miARN, siARN, hoặc shARN.

"Promoter 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, "promoter β -actin ở gà" có thể đề cập đến promoter có chứa yếu tố vùng tăng cường sớm virus cự bào (CMV), promoter và exon và intron thứ nhất của gen β -actin ở gà, và vật nhận ghép của gen beta-globin ở thỏ, như trình tự được mô tả trong Miyazaki, J. và cộng sự (1989) *Gene* 79(2):269-77. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "promoter 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/promoter beta actin (CAG) ở gà" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau.

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 virus, đề cập đến 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 vector 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 và cộng sự. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk và cộng sự. (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278.

Thuật ngữ "hệ gen vector (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 vector, ví dụ, vector virus. Hệ gen vector có thể được bọc capsit trong hạt virus. Tùy thuộc vào vector virus cụ thể, hệ gen vector có thể có chứa ADN sợi đơn, ADN sợi đôi, hoặc ARN sợi đơn, hoặc ARN sợi đôi. Hệ gen vector có thể bao gồm các trình tự nội sinh kết hợp với vector virus cụ thể và/hoặc trình tự khác loại bất kỳ được cài xen vào vector virus cụ thể thông qua kỹ

thuật tái tổ hợp. Ví dụ, hệ gen vector AAV tái tổ hợp có thể bao gồm ít nhất là một trình tự ITR kẹp promoter, đoạn nhồi, trình tự được quan tâm (*ví dụ*, ARNi), và trình tự polyadenyl hóa. Hệ gen vector hoàn chỉnh có thể bao gồm tập hợp hoàn chỉnh của các trình tự polynucleotit của vector. Theo một số phương án, độ chuẩn axit nucleic của vector virus 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).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ức chế" có thể đề cập đến tác động phong tỏa, làm giảm, loại trừ, hoặc đối kháng khác đi sự có mặt, hoặc hoạt tính của, đích cụ thể. Sự ức chế có thể đề cập đến sự ức chế một phần hoặc sự ức chế hoàn toàn. Ví dụ, ức chế biểu hiện của gen có thể đề cập đến tác động bất kỳ dẫn đến phong tỏa, làm giảm, loại trừ, hoặc bất kỳ đối kháng khác của biểu hiện gen, bao gồm làm giảm mRNA (*ví dụ*, làm câm phiên mã mRNA), suy biến mRNA, ức chế dịch mã mRNA, và v.v.. Theo một số phương án, ức chế biểu hiện của HTT có thể đề cập đến phong tỏa, làm giảm, loại trừ, hoặc bất kỳ đối kháng khác của biểu hiện HTT, bao gồm làm giảm sự dồi dào *HTT* mRNA (*ví dụ*, làm câm phiên mã *HTT* mRNA), suy biến *HTT* mRNA, ức chế dịch mã *HTT* mRNA, và v.v.. Ví dụ khác, ức chế sự tích tụ của protein trong tế bào có thể đề cập đến tác động bất kỳ dẫn đến phong tỏa, làm giảm, loại trừ, hoặc đối kháng khác của biểu hiện protein, bao gồm làm giảm sự dồi dào mRNA (*ví dụ*, làm câm phiên mã mRNA), làm suy biến mRNA, ức chế dịch mã mRNA, suy biến protein, và v.v.. Theo một số phương án, ức chế sự tích tụ của protein HTT trong tế bào đề cập đến phong tỏa, làm giảm, loại trừ, hoặc đối kháng khác của biểu hiện protein HTT trong tế bào, bao gồm làm giảm sự dồi dào *HTT* mRNA (*ví dụ*, làm câm phiên mã *HTT* mRNA), suy biến *HTT* mRNA, ức chế dịch mã *HTT* mRNA, suy biến protein HTT, và v.v.

Thuật ngữ "đơn vị lây nhiễm (iu)," "hạt lây nhiễm," hoặc "đơn vị sao chép," như được sử dụng liên quan đến độ chuẩn virus, chỉ số lượng hạt vector 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 và cộng sự. (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973.

Thuật ngữ "đơn vị chuyển nạp (tu)" như được sử dụng liên quan đến độ chuẩn virus, chỉ số lượng hạt vector 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 và cộng sự. (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124; hoặc trong tài liệu Fisher và cộng sự. (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 virus 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 virus. Trình tự phân tách cuối đột biến là chống lại sự phân cắt bởi Protein rep AAV.

"Chức năng hỗ trợ AAV" đề cập đến chức năng mà cho phép AAV được sao chép và đóng gói bởi tế bào chủ. Chức năng hỗ trợ AAV có thể được đề xuất ở dạng bất kỳ trong số nhiều dạng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, virus hỗ trợ hoặc gen virus hỗ trợ mà hỗ trợ trong việc sao chép và đóng gói AAV. Chức năng hỗ trợ AAV khác là đã biết trong lĩnh vực như tác nhân tạo thành ung thư.

"Virus hỗ trợ" cho AAV dùng để chỉ virus cho phép AAV (là parvovirus khiếm khuyết) được sao chép và đóng gói bởi tế bào chủ. Virus hỗ trợ tạo ra "chức năng hỗ trợ" mà cho phép sao chép AAV. Nhiều virus hỗ trợ này đã được xác định, bao gồm adenovirus, herpesvirus và, poxvirus như virus đậu mùa và baculovirus. Adenovirus bao gồm nhiều nhóm phụ khác nhau, mặc dù Adenovirus typ 5 của nhóm phụ C (Ad5) được sử dụng phổ biến nhất. Nhiều adenovirus 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. Virus thuộc họ herpes, cũng

có sẵn ở các cơ quan lưu giữ như ATCC, bao gồm, ví dụ, virus gây bệnh mụn giộp (HSV), virus Epstein-Barr (EBV), virus cự bào (CMV) và virus gây bệnh giả dại (PRV). Các ví dụ của chức năng hỗ trợ adenovirus cho sao chép AAV bao gồm chức năng E1A, chức năng E1B, chức năng E2A, chức năng VA và chức năng E4orf6. Baculovirus có sẵn ở các cơ quan lưu giữ bao gồm virus đa diện nhân *Autographa californica*.

Điều chế rAAV được cho là "cơ bản không có" virus hỗ trợ nếu tỷ lệ hạt AAV lây nhiễm so với hạt hỗ trợ virus lây nhiễm ít nhất bằng khoảng $10^2:1$; ít nhất khoảng $10^4:1$, ít nhất khoảng $10^6:1$; hoặc ít nhất khoảng $10^8:1$ hoặc hơn. Theo một số phương án, điều chế còn là không có lượng tương đương của protein virus hỗ trợ (*tức là*, protein đáng lẽ có mặt do mức virus hỗ trợ này nếu các chất bản hạt virus hỗ trợ được nêu trên có mặt ở dạng bị đứt đoạn). Sự nhiễm virus và/hoặc protein tế bào thường có thể thấy là có sự có mặt của dải nhuộm màu Coomassie trên gel SDS (*ví dụ*, sự xuất hiện của dải khác loại này tương ứng với các protein capsid AAV VP1, VP2 và VP3).

"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 bazơ axit amin hoặc nucleotit trong trình tự tương ứng giống với bazơ 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. Việc sắp xếp thẳng hàng cho mục đích xác định phần trăm độ tương đồng trình tự axit amin hoặc axit nucleic có thể đạt được theo nhiều cách khác nhau đã biết với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, chẳng hạn, sử dụng chương trình phần mềm máy tính có sẵn công khai, ví dụ, các chương trình được mô tả trong Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel và cộng sự, eds., 1987), Supp. 30, phần 7.7.18, Bảng 7.7.1, và bao gồm phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Chương trình sắp xếp thẳng hàng được ưu tiên là ALIGN Plus (Scientific và Educational Software, Pennsylvania). Chuyên gia 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 bazơ axit amin được tính điểm là bất 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 bazơ 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 bất 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 tạo ra kết quả có lợi hoặc mong muốn, bao gồm kết quả lâm sàng (ví dụ, cải thiện các triệu chứng, đạt được điểm đau mức lâm sàng, và 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. Cho mục đích của sáng chế, kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, làm thuyên giảm các triệu chứng, làm giảm bớt mức độ của bệnh, làm ổn định (ví dụ, không làm tệ hơn) tình trạng của bệnh, ngăn ngừa sự lan rộng (ví dụ, di căn) của bệnh, làm trễ hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc làm giảm nhẹ tình trạng bệnh, và làm thuyên giảm (một phần hoặc hoàn toàn), dù ở mức 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.

"Bệnh Huntington (HD)" đề cập đến rối loạn não tiến triển thường gây ra bởi đột biến trong gen *HTT* (aka huntingtin, *HD* hoặc *IT15*). Nó có thể được đặc trưng bởi các triệu chứng bao gồm các chuyển động không bình thường (chứng múa giật định kỳ), mất dần chức năng vận động, bệnh thần kinh hoặc cảm xúc, và sa sút trí tuệ tăng dần. Mặc dù hầu hết các triệu chứng xuất hiện trong những năm 30 và 40, cũng đã quan sát được dạng thanh thiếu niên của bệnh. Để mô tả thêm về HD, tham khảo OMIM số đơn 143100.

"Huntingtin (*HTT*)" còn có thể đề cập đến hoặc là gen hoặc sản phẩm polypeptit của nó liên quan đến hầu hết các trường hợp của bệnh Huntington. Chức năng thông thường của huntingtin không được hiểu đầy đủ. Tuy nhiên, các đột biến ở gen huntingtin được biết là gây ra HD. Các đột biến này thường được di truyền theo cách di truyền gen trội và tham gia vào sự mở rộng của đoạn lặp CAG trinucleotit trong gen *HTT*, dẫn đến vùng polyglutamin (polyQ) trong protein Htt.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "ARNi" có thể đề cập đến bất kỳ phân tử ARN mà tạo ra ARN can thiệp trong tế bào. Các ví dụ của ARNi bao gồm không giới hạn ARN ức chế nhỏ (siARNs), microARNs (miARNs), và ARN kẹp tóc nhỏ (shARNs).

"Khung miARN" có thể đề cập đến polynucleotit chứa (i) trình tự sợi đôi nhắm đích gen có lợi để bị đánh gục bởi ARNi và (ii) trình tự bổ sung mà tạo thành cấu trúc thân-vòng giống cấu trúc của miARN nội sinh. Trình tự nhắm đích gen có lợi đối với ARNi (ví dụ, trình tự ngắn, ~20-nt) có thể thắt vào các trình tự mà tạo ra thân-vòng giống miARN và trình tự mà bắt cặp bazơ với trình tự có lợi để tạo thành cấu trúc kép khi polynucleotit được tập hợp vào cấu trúc thứ hai giống miARN. Như được mô tả ở đây, cấu trúc kép này có thể lai không hoàn toàn, ví dụ, nó có thể chứa một hoặc nhiều bazơ không bắt cặp hoặc bắt cặp sai. Theo phân cắt của polynucleotit này bởi Dicer, cấu trúc kép này chứa trình tự nhắm đích gen có lợi có thể là bị tuột và kết hợp vào phức RISC. Khung miARN có thể đề cập đến bản thân miARN hoặc đến polynucleotit ADN mã hóa miARN. Ví dụ của khung miARN là trình tự miR-155 (Lagos-Quintana, M. và cộng sự (2002) *Curr. Biol.* 12:735-9). Bộ kit bán trên thị trường để tách dòng trình tự vào khung miARN là đã biết trong lĩnh vực (ví dụ, bộ kit vector biểu hiện miR ARNi Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II từ Life Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "phần lồi" đề cập đến vùng axit nucleic mà không bổ sung cho axit nucleic đối diện nó trong axit nucleic kép. Ví dụ, phần lồi có thể đề cập đến trình tự axit nucleic mà không bổ sung cho axit nucleic đối diện trong axit nucleic kép trong đó phần lồi được kẹp bởi các vùng axit nucleic mà bổ sung cho axit nucleic đối diện trong axit nucleic kép. Trong một số ví dụ, phần lồi có thể có chiều dài bất kỳ trong số 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10 hoặc lớn hơn 10 bazơ. Trong một số ví dụ, phần lồi có thể là kết quả của việc bắt cặp sai (ví dụ, sợi đối diện chứa bazơ mà không bổ sung) hoặc phần lồi là kết quả của việc không bắt cặp (ví dụ, sợi đối diện bao gồm axit nucleic bổ sung cho axit nucleic bao quanh phần lồi nhưng sợi đối diện không bao gồm axit nucleic đối diện phần lồi).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ axit nucleic is axit nucleic "có nghĩa" bao gồm trình tự mà mã hóa toàn bộ hoặc một phần gen chuyển. Trong một số ví dụ, mARN cho gen chuyển là axit nucleic có nghĩa.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, axit nucleic "đối nghĩa" là trình tự của axit nucleic mà bổ sung cho axit nucleic "có nghĩa". Ví dụ, axit nucleic đối nghĩa có thể bổ sung cho mARN mã hóa gen chuyển.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "vùng dẫn" của ARNi là sợi của ARNi mà liên kết mARN đích, thường trên cơ sở bổ sung. Vùng bổ sung có thể bao hàm toàn bộ hoặc một phần của vùng dẫn. Thông thường, vùng bổ sung bao gồm ít nhất vùng hạt. Trong nhiều trường hợp, vùng đối nghĩa của ARNi là vùng dẫn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "vùng kèm theo," hoặc "vùng không dẫn," được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này, của ARNi là vùng ARNi mà bổ sung cho vùng dẫn. Trong nhiều trường hợp, vùng có nghĩa của ARNi là vùng kèm theo.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "vùng hạt" của ARNi (*ví dụ*, miARN) là vùng có chiều dài khoảng 1–8 nucleotit của microARN. Trong một số ví dụ, vùng hạt và 3'-UTR của mARN đích của nó có thể là vùng xác định chính trong nhận diện ARNi.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "câm gen không nhắm đích" đề cập đến sự bất cặp của vùng hạt của ARNi với trình tự trong các 3'-UTR của mARN không định trước và nhắm đến việc ngăn cản và làm mất ổn định dịch mã của các bản mã đó (*ví dụ*, làm giảm biểu hiện của các mARN không định trước).

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.

ARNi

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất ARNi cải tiến. Theo một số phương án, ARNi là ARN ức chế nhỏ (siARN), microARN (miARN), hoặc ARN kẹp tóc nhỏ (shARN). ARN ức chế nhỏ hoặc can thiệp (siARN) đã biết trong lĩnh vực là phân tử ARN sợi đôi có chiều dài khoảng 19-25 (*ví dụ*, 19-23) cặp bazơ mà cảm ứng ARNi trong tế bào. ARN kẹp tóc nhỏ (shARN) đã biết trong lĩnh vực là phân tử ARN bao gồm khoảng 19-25 (*ví dụ*, 19-23) cặp

bazơ của ARN sợi đôi được liên kết bởi vòng ngắn (*ví dụ*, ~4-11 nucleotit) mà cảm ứng ARNi trong tế bào.

microARN (miARN) đã biết trong lĩnh vực là phân tử ARN mà bao gồm ARNi trong tế bào bao gồm trình tự ngắn (*ví dụ*, 19-25 cặp bazơ) của ARN sợi đôi được liên kết bởi vòng và chứa một hoặc nhiều trình tự bổ sung của ARN sợi đôi bao gồm một hoặc nhiều phần lồi (*ví dụ*, cặp bazơ bắt cặp sai hoặc không bắt cặp). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "miARN" bao hàm miARN nội sinh cũng như miARN ngoại sinh hoặc khác loại. Theo một số phương án, "miARN" có thể đề cập đến pri-miARN hoặc pre-miARN. Trong quá trình xử lý miARN, bản mã pri-miARN được tạo ra. pri-miARN được xử lý bằng Drosha-DGCR8 để tạo ra pre-miARN bằng cách nhắm một hoặc nhiều trình tự để phân cắt pre-miARN với vùng hai bên 5', sợi dẫn, vùng vòng, vùng không dẫn, và vùng hai bên 3'; hoặc vùng hai bên 5', vùng không dẫn, vùng vòng, sợi dẫn, và vùng hai bên 3'. Sau đó pre-miARN được xuất đến tế bào chất và được xử lý bằng Dicer để tạo ra siARN với sợi dẫn và sợi không dẫn (hoặc đi kèm). Sau đó sợi dẫn được sử dụng bởi phức RISC để xúc tác làm câm gen, *ví dụ*, bằng cách nhận diện trình tự ARN đích bổ sung cho sợi dẫn. Mô tả thêm của các miARN có thể tìm thấy, *ví dụ*, trong WO 2008/150897. Việc nhận diện trình tự đích bởi miARN chủ yếu được xác định bằng cách bắt cặp giữa đích và trình tự hạt miARN, *ví dụ*, nucleotit 1-8 (5' đến 3') của sợi dẫn (tham khảo, *ví dụ*, Boudreau, R.L. và cộng sự (2013) *Axit nucleics Res.* 41:e9).

Trong cấu trúc pri/pre-miARN, giao diện sợi dẫn:sợi không dẫn trong cấu trúc kép được tạo thành một phần thông qua bắt cặp bazơ bổ sung (*ví dụ*, bắt cặp bazơ Watson-Crick). Tuy nhiên, theo một số phương án, việc bắt cặp bazơ bổ sung này không mở rộng qua toàn bộ cấu trúc kép. Theo một số phương án, phần lồi trong giao diện có thể tồn tại ở một hoặc nhiều vị trí nucleotit. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phần lồi" có thể đề cập đến vùng axit nucleic mà không bổ sung cho axit nucleic đối diện nó trong cấu trúc kép. Theo một số phương án, phần lồi được tạo thành khi vùng axit nucleic bổ sung liên kết với nhau, trong khi đó vùng tâm không bổ sung không liên kết. Theo một số phương án, phần lồi được tạo thành khi hai chuỗi axit nucleic được định vị giữa hai vùng bổ sung có chiều dài khác nhau. Như được mô tả dưới đây, phần lồi có thể 1 hoặc nhiều nucleotit.

Trong quá trình xử lý miARN, miARN được phân cắt ở vị trí phân cắt liền kề với giao diện sợi dẫn:sợi không dẫn, do đó giải phóng cấu trúc kẹp siARN của sợi dẫn và sợi không dẫn. Theo một số phương án, miARN bao gồm phần lồi trong sợi có nghĩa hoặc đối nghĩa liền kề với vị trí phân cắt. Nói theo cách khác, theo một số phương án, miARN bao gồm phần lồi trong sợi dẫn hoặc sợi không dẫn liền kề với trình tự hạt. Phần lồi ở vị trí này được chỉ ra bằng mũi tên trong phương án ví dụ được thể hiện trên **HÌNH 9B**.

Theo một số phương án, miARN bao gồm phần lồi trong sợi dẫn đối diện vị trí phân cắt 5' của sợi không dẫn hoàn chỉnh. Theo một số phương án, miARN bao gồm phần lồi đối diện nucleotit 5' của sợi không dẫn. Theo một số phương án, miARN bao gồm phần lồi trong sợi có nghĩa đối diện vị trí phân cắt 3' của sợi dẫn hoàn chỉnh. Theo một số phương án, miARN bao gồm phần lồi đối diện nucleotit 3' của sợi dẫn.

Theo một số phương án, ARNi bao gồm sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và thứ hai tạo thành cấu trúc kẹp; b) sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn có ít nhất 11 bazơ, trong đó vùng dẫn bao gồm vùng hạt bao gồm các bazơ 1-N của sợi dẫn, trong đó N=7 hoặc N=8; và c) sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn có ít nhất 11 bazơ, trong đó vùng không dẫn bao gồm trình tự lồi đối diện với bất kỳ một hoặc nhiều trong số các bazơ 1-(N+2) của vùng dẫn trong cấu trúc kẹp. Theo một số phương án, trong đó N=7 và phần lồi đối diện bazơ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc 9 của vùng dẫn. Theo các phương án khác, N=8 và phần lồi đối diện bazơ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 của vùng dẫn.

Theo một số phương án, ARNi bao gồm sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và thứ hai tạo thành cấu trúc kẹp; b) sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn có ít nhất 10 bazơ, trong đó vùng dẫn bao gồm vùng hạt bao gồm các bazơ 1-N của sợi dẫn, trong đó N=7 hoặc N=8; và c) sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn có ít nhất 10 bazơ, trong đó vùng không dẫn bao gồm trình tự lồi đối diện với bất kỳ một hoặc nhiều trong số các bazơ 1-(N+1) của vùng dẫn trong cấu trúc kẹp. Theo một số phương án, trong đó N=7 và phần lồi đối diện bazơ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 của vùng dẫn. Theo các phương án khác, N=8 và phần lồi đối diện bazơ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc 9 của vùng dẫn.

Theo một số phương án, vùng không dẫn bao gồm trình tự lồi đối diện với bất kỳ một hoặc nhiều trong số các bazơ 1-N của vùng dẫn trong cấu trúc kẹp. Theo một số phương án,

N=7 và phần lõi đối diện bazơ 1, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc 7 của vùng dẫn. Theo các phương án khác, N=8 và phần lõi đối diện bazơ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8 của vùng dẫn.

Theo một số phương án, ARNi bao gồm sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và thứ hai tạo thành cấu trúc kép, b) sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn có ít nhất 9 bazơ, trong đó vùng dẫn bao gồm vùng hạt bao gồm bazơ 2-7 hoặc 2-8 của sợi dẫn, và c) sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn có ít nhất 9 bazơ, trong đó vùng không dẫn bao gồm trình tự lõi đối diện với bazơ 1 hoặc bazơ 9 của vùng dẫn trong cấu trúc kép.

Theo một số phương án, ARNi bao gồm sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và thứ hai tạo thành cấu trúc kép, b) sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn có ít nhất 9 bazơ, trong đó vùng dẫn bao gồm vùng hạt bao gồm bazơ 2-7 hoặc 2-8 của sợi dẫn, và c) sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn có ít nhất 9 bazơ, trong đó vùng không dẫn bao gồm trình tự lõi đối diện với bazơ 1 của vùng dẫn trong cấu trúc kép.

Theo một số phương án, phần lõi được tạo thành bởi một hoặc nhiều bazơ của sợi không dẫn trong cấu trúc kép mà không có bazơ bổ sung trên vùng dẫn, trong đó phần lõi được kẹp bởi các bazơ mà bắt cặp bazơ với sợi dẫn. Theo một số phương án, trình tự lõi có khoảng 1-10 nucleotit. Theo một số phương án, trình tự lõi có khoảng 2-15 nucleotit. Theo một số phương án, trình tự lõi có khoảng 1, khoảng 2, khoảng 3, khoảng 4, khoảng 5, khoảng 6, khoảng 7, khoảng 8, khoảng 9, khoảng 10, khoảng 11, khoảng 12, khoảng 13, khoảng 14, hoặc khoảng 15 nucleotit.

Tính an toàn của liệu pháp trên cơ sở ARNi có thể đảm bảo bởi khả năng của ARN ức chế nhỏ (các siARN) liên kết với các mARN không định trước và làm giảm biểu hiện của chúng, tác động được biết là cam gen không nhắm đích. Không nhắm đích chủ yếu xảy ra khi vùng hạt (nucleotit 2–8 của ARN nhỏ) bắt cặp với trình tự trong các 3'-UTR của các mARN không định trước và trực tiếp ngăn cản và làm mất ổn định dịch mã của các bản mã đó. ARNi không nhắm đích giảm có thể được thiết kế bằng cách thế bazơ trong các trình tự dẫn và trình tự không dẫn; *ví dụ*, bằng cách tạo ra mô típ CpG. Việc thế tiềm năng mà có thể tạo ra điểm không nhắm đích thấp hơn đáng kể có thể được đánh giá bằng cách sử dụng thuật toán SiSPOTR, thuật toán thiết kế siARN tập trung đặc trưng mà xác định các trình tự ứng viên với các tiềm năng không nhắm đích tối thiểu và khả năng làm cam tiềm năng (Boudreau và

cộng sự, *Axit nucleic Res.* 2013 Jan; 41(1) e9. Điểm SiSPOTR giảm dự báo trình tự mà có điểm không nhắm đích tiềm năng ở người thấp hơn so với phân tử ARNi bố mẹ. Theo một số phương án của sáng chế, ARNi được cải thiện để làm giảm cam gen không nhắm đích. Theo một số phương án, ARNi bao gồm một hoặc nhiều mô típ CpG. Theo một số phương án, ARNi bao gồm một hoặc nhiều mô típ CpG trong vùng hạt.

Theo một số phương án, sợi thứ nhất và sợi thứ hai được liên kết với nhau bởi ARN (ví dụ, ARN liên kết) có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp. Như thường được biết trong lĩnh vực, cấu trúc vòng lặp ARN (ví dụ, thân-vòng oặc kẹp tóc) được tạo thành khi phân tử ARN bao gồm hai trình tự ARN mà bắt cặp bazơ với nhau được phân chia bởi trình tự ARN mà không bắt cặp bazơ với nhau. Ví dụ, cấu trúc vòng lặp có thể tạo thành trong phân tử ARN A-B-C nếu các trình tự A và C bổ sung hoặc bổ sung một phần sao cho chúng bắt cặp bazơ với nhau, nhưng các zơ ở trình tự B không bắt cặp bazơ với nhau.

Theo một số phương án, ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp bao gồm từ 4 đến 50 nucleotit. Theo các phương án nhất định, ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp bao gồm 13 nucleotit. Theo một số phương án, số lượng nucleotit trong ARN có khả năng tạo thành vòng là từ 4 đến 50 nucleotit hoặc số nguyên bất kỳ giữa đó. Theo một số phương án, từ 0-50% vòng có thể bổ sung cho phần khác của vòng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "cấu trúc vòng lặp" là trình tự mà nối hai sợi bổ sung của axit nucleic. Theo một số phương án, 1-3 nucleotit của cấu trúc vòng lặp là liên tục với chuỗi axit nucleic bổ sung và có thể bổ sung cho 1-3 nucleotit của phần ngoại biên của cấu trúc vòng lặp. Ví dụ, ba nucleotit ở đầu 5' của cấu trúc vòng lặp có thể bổ sung cho ba nucleotit ở đầu 3' của cấu trúc vòng lặp.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa ARNi theo sáng chế bao gồm khung miARN khác loài. Theo một số phương án, việc sử dụng khung miARN khác loài là để điều biến sự biểu hiện của miARN; ví dụ, để làm tăng sự biểu hiện của miARN hoặc để làm giảm sự biểu hiện của miARN. Khung miARN bất kỳ đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng. Theo một số phương án, khung miARN thu được từ khung miR-155 (tham khảo, ví dụ, Lagos-Quintana, M. và *cộng sự* (2002) *Curr. Biol.* 12:735-9 và bộ kit vectơ biểu hiện miR ARNi Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II từ Life Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA).

Bệnh Huntington và mô hình thử nghiệm của nó

Bệnh Huntington (HD) là bệnh thoái hóa thần kinh di truyền gây ra do sự mở rộng phần lặp CAG trong exon 1 của gen huntingtin (HTT). Sự mở rộng thu được của dải polyglutamin trong vùng đầu N tạo ra chức năng tạo độc cho protein huntingtin đột biến (mHtt). Độc tố của mHtt có thể tăng từ việc hình thành các tập hợp chứa mHtt không tan, rối loạn phiên mã, và nhiễu loạn nội cân bằng protein, tất cả chúng có thể dẫn đến làm chết neuron (Saudou và cộng sự (1998) *Cell*, 95:55-66; Zuccato và cộng sự (2003) *Nat. Genet.* 35:76-83; Schaffar và cộng sự. (2004) *Mol.Cell.* 15:95-105; Benn và cộng sự, (2008) *J. Neurosci.* 28:10720-10733). Phát hiện bệnh lý ở bệnh nhân mắc HD bao gồm làm mỏng vỏ não và mất tiến triển phát động của neuron vận (Rosas và cộng sự, (2002) *Neurology* 58:695-701). Khởi phát bệnh thường xảy ra trong khoảng thập kỷ thứ ba hoặc thứ tư của cuộc đời; các triệu chứng bao gồm chuyển động múa giật, phối hợp suy yếu, phối hợp tăng dần, và mất cân bằng tâm thần khác (Vonsattel và cộng sự, (1985) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44:559-577). Trong hầu hết các trường hợp, các triệu chứng bắt đầu xuất hiện ở độ tuổi từ 30 đến 40 với sự phát vỡ nhẹ về kỹ năng vận động, nhận thức, và tính cách. Qua thời gian, chúng tiến triển thành chuyển động giật, không kiểm soát được và mất kiểm soát cơ, chứng mất trí, và bệnh tâm thần như chứng trầm cảm, gây hấn, lo sợ, và hành vi tự ám ảnh. Thường bị chết 10-15 năm sau khi khởi phát triệu chứng. Ít hơn 10% trường hợp HD liên quan đến dạng khởi phát bệnh thiếu niên, khác biệt ở chỗ tiến triển bệnh nhanh hơn. Hiếm rằng khoảng 1 trong 10,000 người Mỹ mắc HD.

Mặc dù cơ sở gen của HD đã biết gần 20 năm, các liệu pháp chữa bệnh hiện nay giảm nhẹ ở mức độ lớn và không nhắm đến cơ sở tiềm tàng của bệnh. Điều này có thể một phần do thực tế là căn bệnh của bệnh này phức tạp, với các tác động bất lợi thấy được trong nhiều quy trình gen khác nhau. Do đó, tập trung phát triển thuốc hướng đến việc nhắm vào nơi phát động khó chịu đầu tiên, tức là, bản thân gen HTT đột biến.

Hầu hết các trường hợp HD liên quan đến việc mở rộng phần lặp CAG trinucleotit trong gen *HTT*. Số lượng phần lặp CAG trong gen *HTT* liên quan mạnh đến sự thể hiện của HD. Ví dụ, cá thể có 35 hoặc ít hơn phần lặp thường không phát triển HD, nhưng cá thể có từ 27 đến 35 phần lặp có nguy cơ cao là có con mắc. Cá thể có từ 36 đến 40-42 phần lặp có sự xâm nhập HD không đầy đủ, trong khi đó cá thể có nhiều hơn 40-42 phần lặp thể hiện xâm

nhập đầy đủ. Các trường hợp HD khởi phát từ thiếu niên có thể liên quan đến kích thước phần lặp CAG bằng 60 hoặc hơn.

Protein Htt mở rộng polyQ tạo ra từ việc mở rộng phần lặp CAG này liên quan đến các tập hợp gen hoặc thể vùi, nhiễu loạn nội cân bằng protein, và rối loạn phiên mã. Trong khi phenotyp độc tính này có thể liên quan đến một số phần của cơ thể, hầu hết chúng thường liên quan đến việc chết tế bào nơron. Bệnh nhân HD thường thấy là mỏng vỏ não và mất tiến triển vận động của nơron vận. Thể vận xuất hiện là vùng hầu như tổn thương ủa não đối với HD (cụ thể là nơron gai môi trường vận), với tác động sớm thấy ở nhân đuôi và hạch. Chết tế bào ở nơron gai vận, tăng số lượng tế bào hình sao, và hoạt hóa tiểu thần kinh đệm được thấy trong não của bệnh nhân HD. HD còn có thể tác động một số vùng trong số cá ngựa, vỏ não, đồi não, vùng dưới đồi, và tiểu não.

Nghiên cứu được đề xuất để chặn biểu hiện Htt bao gồm sử dụng oligonucleotit đôi nghĩa (ASOs) cũng như ARN can thiệp (ARNi) mà sử dụng các ARN sợi kép (dsARN) hoặc các ARN sợi đơn biến đổi hóa học (ssARN) (Harper và cộng sự, (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5820-5825; DiFiglia và cộng sự, (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:17204-17209; Boudreau và cộng sự, (2009b) *Mol. Ther.* 17:1053-1063; Drouet và cộng sự, (2009) *Ann. Neurol.* 65:276-285; Sah và cộng sự, (2011) *J. Clin. Invest.* 121:500-507; Matsui và cộng sự, (2012) *Drug Discov. Today* 17:443-450; Yu và cộng sự, (2012) *Cell* 150:895-908). Tuy nhiên, việc ngăn cản dịch mã ASO tiếp cận lâm sàng có thể bao gồm nhu cầu kết hợp thiết bị để tạo thuận lợi cho việc tiêm truyền lặp lại và kinh niên ASO vào CNS, và nhu cầu phân bố thích hợp thuốc vào vùng đích trong não rộng.

Để phá hỏng các mô tiềm năng này với ASO, sử dụng biểu hiện được trung gian AAV của ARNi (ví dụ, siARN), mà tạo ra khả năng tăng an toàn, tăng hiệu quả, và hiệu quả kéo dài, có thể có lợi. Do bệnh nhân HD biểu hiện cả các alen Htt đột biến và kiểu dại, đa số trình tự nhắm đích siARN sẽ có thể suy thoái cả hai alen. Tuy nhiên, việc làm câm Htt không đặc hiệu alen trong chuột HD thể hiện sức kháng tốt và có thể tạo ra cùng lợi ích như việc chỉ làm giảm Htt đột biến (Boudreau và cộng sự, (2009b) *Mol. Ther.* 17:1053-1063; Drouet và cộng sự, (2009) *Ann. Neurol.* 65:276-285; Kordasiewicz và cộng sự, (2012) *Neuron* 74(6):1031-1044). Tuy nhiên, sự kìm hãm một phần và duy trì của Htt kiểu dại trong hạch của động vật linh trưởng không phải người sau ARNi được trung gian AAV không báo cáo có bất kỳ tác

động ngược, đề xuất rằng não người trưởng thành có thể chịu mức giảm Htt kiểu đại (McBride và cộng sự, (2011) *Mol. Ther.* 19:2152-2162; Grondin và cộng sự, (2012) *Brain* 135:1197-1209).

Mô hình chuột mắc HD có thể được sử dụng để thử nghiệm chiến lược chữa bệnh tiềm năng, như chế phẩm và phương pháp theo sáng chế. Mô hình chuột mắc HD là đã biết trong lĩnh vực. Mô hình này bao gồm mô hình chuột có các đoạn *HTT* đột biến như chuột HD R6/1 và N171-82Q (Harper và cộng sự, (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5820-5825, Rodriguez-Lebron và cộng sự, (2005) *Mol. Ther.* 12:618-633, Machida và cộng sự, (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:190-197). Ví dụ khác về mô hình HD ở chuột được mô tả ở đây là mô hình chuột YAC128. Mô hình này có nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (YAC) biểu hiện gen *HTT* đột biến ở người với phần lặp 128 CAG, và chuột YAC128 thể hiện tích tụ đáng kể và rộng rãi các tập hợp Htt trong thể vân ở 12 tháng tuổi (Slow và cộng sự, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567, Pouladi và cộng sự, (2012) *Hum. Mol. Genet.* 21:2219-2232).

Các mô hình động vật khác mắc HD cũng có thể được sử dụng. Ví dụ, các mô hình chuột chuyển gen (von Horsten, S. và cộng sự (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:617-24) và khi nâu (Yang, S.H. và cộng sự (2008) *Nature* 453:921-4) được mô tả. Các mô hình không phải gen là đã biết. Chúng thường liên quan đến việc sử dụng các hợp chất kích thích nhiễm độc (như axit quinolinic hoặc axit kainic) hoặc độc tố ty thể (như axit 3-nitropropionic và axit malonic) để gây chết tế bào neuron vân ở động vật gặm nhấm hoặc động vật linh trưởng không phải người (để mô tả và tham khảo thêm, xem Ramaswamy, S. và cộng sự (2007) *ILAR J.* 48:356-73).

Phương pháp để điều trị bệnh Huntington

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp và chế phẩm để điều trị bệnh Huntington ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú dược phẩm theo sáng chế (ví dụ, dược phẩm bao gồm hạt virus theo sáng chế). Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp và chế phẩm để ức chế biểu hiện của htt ở động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú dược phẩm theo sáng chế (ví dụ, dược phẩm bao gồm hạt virus theo sáng chế). Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương

pháp và chế phẩm để ức chế sự tích tụ của htt trong tế bào của động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú được phẩm theo sáng chế (*ví dụ*, được phẩm bao gồm hạt virus theo sáng chế).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp và chế phẩm để cải thiện triệu chứng của HD, bao gồm cho dùng lượng có hiệu quả của hạt virus tái tổ hợp bao gồm vector mã hóa ARNi theo sáng chế cho não của động vật có vú. 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. Như vậy, phương pháp được mô tả ở đây có thể được sử dụng để xử lý phòng bệnh HD vì chẩn đoán có thể xảy ra trước khi khởi phát triệu chứng. Ví dụ, HD có thể được chẩn đoán bằng cách thử nghiệm gen (thử nghiệm trước sinh, thử nghiệm khi sinh, v.v.) và được xử lý phòng bệnh (*ví dụ*, sử dụng hạt rAAV được mô tả ở đây) trước khi khởi phát triệu chứng (*ví dụ*, mất tế bào CNS) để phòng ngừa khởi phát triệu chứng và/hoặc tiến triển của HD. 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 Thử Thức Chữ Số Ký Hiệu.

Theo một số khía cạnh của sáng chế, các phương pháp và chế phẩm 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*.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất ARNi cải tiến để nhắm đích htt mARN ở động vật có vú mắc bệnh Huntington. Theo một số phương án, ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), trong đó sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kẹp và trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 nêu ở SEQ ID NO:2 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. ARNi được mô tả ở đây (*ví dụ*, là

một phần của vector rAAV) có thể thấy được sử dụng, *không kể những cái khác*, trong điều trị bệnh Huntington.

Theo một số phương án của sáng chế, ARNi được cải thiện để làm giảm cảm gen không nhắm đích. Theo một số phương án, ARNi bao gồm một hoặc nhiều mô típ CpG. Theo một số phương án, ARNi bao gồm một hoặc nhiều mô típ CpG trong vùng hạt.

Theo một số phương án sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị bệnh Huntington ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số phương án sáng chế đề xuất phương pháp để ức chế biểu hiện của htt ở động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số phương án sáng chế đề xuất phương pháp để ức chế sự tích tụ của htt trong tế bào của động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số phương án, sợi thứ nhất bao gồm trình tự axit nucleic có nhiều hơn khoảng bất kỳ trong số 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO:15 nhưng vẫn giữ mô típ CpG. Theo một số phương án, sợi thứ hai bao gồm trình tự axit nucleic có nhiều hơn khoảng bất kỳ trong số 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO:16 nhưng vẫn giữ mô típ CpG.

Theo một số phương án sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị bệnh Huntington ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm

axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số phương án sáng chế đề xuất phương pháp để ức chế biểu hiện của htt ở động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số phương án sáng chế đề xuất phương pháp để ức chế sự tích tụ của htt trong tế bào của động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số phương án, sợi thứ nhất bao gồm trình tự axit nucleic có nhiều hơn khoảng bất kỳ trong số 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO:17 nhưng vẫn giữ mô típ CpG. Theo một số phương án, sợi thứ hai bao gồm trình tự axit nucleic có nhiều hơn khoảng bất kỳ trong số 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO:18 nhưng vẫn giữ mô típ CpG.

Theo một số phương án, ARNi là ARN ức chế nhỏ (siARN), microARN (miARN), hoặc ARN kẹp tóc nhỏ (shARN). ARN ức chế nhỏ hoặc can thiệp (siARN) đã biết trong lĩnh vực là phân tử ARN sợi đôi có chiều dài khoảng 19-25 (*ví dụ*, 19-23) cặp bazơ mà tạo ra ARNi trong tế bào. ARN kẹp tóc nhỏ (shARN) đã biết trong lĩnh vực là phân tử ARN bao gồm khoảng 19-25 (*ví dụ*, 19-23) cặp bazơ của ARN sợi đôi được liên kết bởi vòng ngắn (*ví dụ*, ~4-11 nucleotit) mà tạo ra ARNi trong tế bào.

Theo một số phương án, miARN bao gồm trình tự dẫn mà có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, miARN bao gồm trình tự dẫn mà có khoảng bất kỳ trong số 90% tương đồng, 91% tương đồng, 92% tương đồng, 93% tương đồng, 94% tương

đồng, 95% tương đồng, 96% tương đồng, 97% tương đồng, 98% tương đồng, 99% tương đồng, hoặc 100% tương đồng với SEQ ID NO:1.

Theo một số phương án, miARN bao gồm trình tự không dẫn mà có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:2. Theo một số phương án, miARN bao gồm trình tự không dẫn mà có khoảng bất kỳ trong số 90% tương đồng, 91% tương đồng, 92% tương đồng, 93% tương đồng, 94% tương đồng, 95% tương đồng, 96% tương đồng, 97% tương đồng, 98% tương đồng, 99% tương đồng, hoặc 100% tương đồng với SEQ ID NO:2.

Theo một số phương án, các gốc U ở các gốc 11 và 12 nêu ở SEQ ID NO:1 của axit nucleic thứ nhất không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ hai. Theo một số phương án, cấu trúc kép có chiều dài nằm trong khoảng từ 18 đến 25 cặp bazơ. Theo một số phương án, sợi thứ nhất và/hoặc thứ hai còn bao gồm vùng nhô ra 3', vùng nhô ra 5', hoặc cả vùng nhô ra 3' và 5'. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất ARNi, cũng như phương pháp và chế phẩm để sử dụng chúng, bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), trong đó sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép và trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 nêu ở SEQ ID NO:2 không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất và các gốc U ở các gốc 11 và 12 nêu ở SEQ ID NO:1 của axit nucleic thứ nhất không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ hai.

Theo một số phương án, sợi thứ nhất và sợi thứ hai được liên kết với nhau bởi ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp. Như đã biết trong lĩnh vực, ARN cấu trúc vòng lặp (ví dụ, thân-vòng hoặc kẹp tóc) được tạo thành khi phân tử ARN bao gồm hai trình tự ARN mà bắt cặp bazơ với nhau được tách biệt bởi trình tự ARN mà không bắt cặp bazơ với nhau. Ví dụ, cấu trúc vòng lặp có thể tạo thành trong phân tử ARN A-B-C nếu các trình tự A và C bổ sung hoặc bổ sung một phần sao cho chúng bắt cặp bazơ với nhau, nhưng các bazơ trong trình tự B không bắt cặp bazơ với nhau.

Theo một số phương án, ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp bao gồm từ 4 đến 50 nucleotit. Theo các phương án nhất định, ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp bao gồm 13 nucleotit. Theo các phương án nhất định, ARN có khả năng tạo thành cấu trúc

vòng lặp bao gồm trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO:7. Theo một số phương án, bộ gen vector bao gồm trình tự nucleotit mà có ít nhất khoảng bất kỳ trong số 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng với trình tự nêu ở SEQ ID NO:13.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm việc dùng cho động vật có vú (ví dụ, động vật có vú mắc HD) ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), trong đó gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 nêu ở SEQ ID NO:2 không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số phương án, các gốc U ở các vị trí 11 và 12 nêu ở SEQ ID NO:1 của axit nucleic thứ nhất không bắt cặp bazơ với các gốc của sợi thứ hai. Theo một số phương án, gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 nêu ở SEQ ID NO:2 không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất và các gốc U ở các vị trí 11 và 12 nêu ở SEQ ID NO:1 của axit nucleic thứ nhất không bắt cặp bazơ với các gốc của sợi thứ hai. Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp bao gồm ARNi. Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp là hạt AAV bọc vector rAAV, hạt adenovirus bọc vector adenovirus tái tổ hợp, hạt lentivirus bọc vector lentivirus tái tổ hợp hoặc hạt HSV bọc vector HSV tái tổ hợp trong đó vector rAAV, vector adenovirus, vector lentivirus hoặc vector HSV mã hóa ARNi.

Theo một số phương án, phân phối hạt virus tái tổ hợp là bằng cách tiêm hạt virus vào não. Theo một số phương án, phân phối hạt virus tái tổ hợp là bằng cách tiêm hạt virus vào thể vân. Việc dùng trong thể vân phân phối hạt virus tái tổ hợp vào vùng não, thể vân (bao gồm nhân đuôi và hạch), mà bị tác động nhiều bởi HD. Ngoài ra, và không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, hiểu rằng hạt virus tái tổ hợp (ví dụ, hạt rAAV) được tiêm vào thể vân còn có thể được phân tán (ví dụ, qua vận chuyển ngược chiều) đến các vùng khác của não, bao gồm không giới hạn vùng chiếu (ví dụ, vỏ não). Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp được phân phối bằng cách phân phối tăng cường đối lưu (ví dụ, phân phối tăng cường đối lưu vào thể vân).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị bệnh Huntington ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú được phẩm theo sáng chế. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để ức chế sự tích tụ của htt trong tế bào của động

vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú được phẩm theo sáng chế. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để ức chế biểu hiện của htt ở động vật có vú mắc bệnh Huntington bao gồm việc dùng cho động vật có vú được phẩm theo sáng chế. Theo một số phương án, htt là htt đột biến (*ví dụ*, htt bao gồm nhiều hơn 35, nhiều hơn 36, nhiều hơn 37, nhiều hơn 38, nhiều hơn 39, nhiều hơn 40, nhiều hơn 41, hoặc nhiều hơn 42 phần lặp CAG). Theo một số phương án, biểu hiện và/hoặc tích tụ của htt kiểu đại cũng bị ức chế. Như được mô tả ở đây, và không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, hiểu rằng sự ức chế of biểu hiện và/hoặc tích tụ của htt đột biến ở động vật có vú mắc HD là có lợi lớn, nhưng sự ức chế biểu hiện và/hoặc tích tụ của htt kiểu đại trong cùng động vật có vú là tác dụng phụ (*ví dụ*, của ARNi theo sáng chế) có thể chịu tốt (*ví dụ*, tạo ra một vài hoặc không có tác dụng phụ không mong muốn).

Theo một số phương án, tế bào bao gồm vector (*ví dụ*, vector bao gồm cấu trúc biểu hiện mã hóa ARNi theo sáng chế). Theo một số phương án, vector là vector rAAV. Theo một số phương án, vector là vector adenovirus tái tổ hợp, vector lentivirus tái tổ hợp hoặc vector herpes đơn dạng tái tổ hợp (HSV). Theo một số phương án, tế bào là tế bào của hệ thần kinh trung ương (CNS).

Theo một số phương án, việc cho dùng lượng có hiệu quả của hạt virus tái tổ hợp bao gồm vector mã hóa ARNi theo sáng chế chuyển đổi các neuron (*ví dụ*, neuron vận, như neuron gai) ở hoặc gần vị trí cho 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% neuron 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 neuron được chuyển nạp. Phương pháp để xác định các neuron được chuyển đổi bởi hạt virus tái tổ hợp biểu hiện miARN là đã biết trong lĩnh vực; ví dụ, hóa mô miễn dịch, dò ARN (*ví dụ*, qPCR, Kỹ thuật Northern blotting, Phương pháp giải trình tự ARN (ARN-seq), phương pháp lai tại chỗ, và tương tự) hoặc việc sử dụng chất đánh dấu đồng biểu hiện như protein huỳnh quang màu xanh lá cây cải tiến có thể được sử dụng để phát hiện sự biểu hiện.

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp bao gồm việc dùng vào não của động vật có vú lượng có hiệu quả của hạt virus tái tổ hợp bao gồm vector mã hóa ARNi theo

sáng chế để điều trị động vật có vú, *ví dụ*, người, mắc HD. Theo một số phương án, chế phẩm được tiêm vào một hoặc nhiều vị trí trong não để cho phép biểu hiện ARNi theo sáng chế trong ít nhất các neuron. Theo một số phương án, chế phẩm được tiêm vào vị trí bất kỳ trong số một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười hoặc nhiều hơn mười vị trí trong não. Theo một số phương án, chế phẩm được tiêm vào thể vân. Theo một số phương án, chế phẩm được tiêm vào thể vân lưng. Theo một số phương án, chế phẩm được tiêm vào hạch. Theo một số phương án, chế phẩm được tiêm vào nhân đuôi. Theo một số phương án, chế phẩm được tiêm vào hạch và vào nhân đuôi.

Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp được cho dùng vào một bán cầu não. Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp được sử dụng cho cả hai bán cầu của não.

Theo một số phương án hạt virus tái tổ hợp được cho dùng vào nhiều hơn một vị trí đồng thời hoặc liên tục. Theo một số phương án, nhiều mũi tiêm của hạt virus 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 điều trị người mắc HD bằng cách cho dùng lượng có hiệu quả của được phẩm bao gồm vector virus tái tổ hợp mã hóa ARNi theo sáng chế để chặn hoạt tính của *HTT* đột biến. Theo một số phương án, được phẩm có chứa một hoặc nhiều tá được được dùng.

Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc cho dùng lượng có hiệu quả của được phẩm bao gồm vector virus tái tổ hợp mã hóa ARNi theo sáng chế để chặn hoạt tính của *HTT* đột biến. Theo một số phương án, độ chuẩn virus của các hạt virus (*ví dụ*, các hạt rAAV) bằng ít nhất 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 virus của các hạt virus (*ví dụ*, các hạt rAAV) là khoảng giá trị bất kỳ trong số 5×10^{12} đến 6×10^{12} , 6×10^{12} đến 7×10^{12} , 7×10^{12} đến 8×10^{12} , 8×10^{12} đến 9×10^{12} , 9×10^{12} đến 10×10^{12} , 10×10^{12} đến 11×10^{12} , 11×10^{12} đến 15×10^{12} , 15×10^{12} đến 20×10^{12} , 20×10^{12} đến 25×10^{12} , 25×10^{12} đến 30×10^{12} , 30×10^{12} đến 50×10^{12} , hoặc 50×10^{12} đến 100×10^{12} bản sao hệ gen/mL. Theo một số phương án, độ chuẩn virus của các hạt virus (*ví dụ*, các hạt rAAV) là khoảng giá trị bất kỳ trong số 5×10^{12} đến $10 \times$

10^{12} , 10×10^{12} đến 25×10^{12} , hoặc 25×10^{12} đến 50×10^{12} bản sao hệ gen/mL. Theo một số phương án, độ chuẩn virus của các hạt virus (ví dụ, các hạt rAAV) bằng ít nhất 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 virus của các hạt virus (ví dụ, các hạt rAAV) là khoảng giá trị bất kỳ trong số 5×10^9 đến 6×10^9 , 6×10^9 đến 7×10^9 , 7×10^9 đến 8×10^9 , 8×10^9 đến 9×10^9 , 9×10^9 đến 10×10^9 , 10×10^9 đến 11×10^9 , 11×10^9 đến 15×10^9 , 15×10^9 đến 20×10^9 , 20×10^9 đến 25×10^9 , 25×10^9 đến 30×10^9 , 30×10^9 đến 50×10^9 hoặc 50×10^9 đến 100×10^9 đơn vị chuyển nạp /mL. Theo một số phương án, độ chuẩn virus của các hạt virus (ví dụ, các hạt rAAV) là khoảng giá trị bất kỳ trong số 5×10^9 đến 10×10^9 , 10×10^9 đến 15×10^9 , 15×10^9 đến 25×10^9 , hoặc 25×10^9 đến 50×10^9 đơn vị chuyển nạp /mL. Theo một số phương án, độ chuẩn virus của các hạt virus (ví dụ, các hạt rAAV) bằng ít nhất bất kỳ trong số 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 lây nhiễm/mL. Theo một số phương án, độ chuẩn virus của các hạt virus (ví dụ, các hạt rAAV) bằng ít nhất bất kỳ trong số khoảng 5×10^{10} đến 6×10^{10} , 6×10^{10} đến 7×10^{10} , 7×10^{10} đến 8×10^{10} , 8×10^{10} đến 9×10^{10} , 9×10^{10} đến 10×10^{10} , 10×10^{10} đến 11×10^{10} , 11×10^{10} đến 15×10^{10} , 15×10^{10} đến 20×10^{10} , 20×10^{10} đến 25×10^{10} , 25×10^{10} đến 30×10^{10} , 30×10^{10} đến 40×10^{10} , 40×10^{10} đến 50×10^{10} , hoặc 50×10^{10} đến 100×10^{10} đơn vị lây nhiễm/mL. Theo một số phương án, độ chuẩn virus của các hạt virus (ví dụ, các hạt rAAV) bằng ít nhất bất kỳ trong số khoảng 5×10^{10} đến 10×10^{10} , 10×10^{10} đến 15×10^{10} , 15×10^{10} đến 25×10^{10} , hoặc 25×10^{10} đến 50×10^{10} đơn vị lây nhiễm/mL.

Theo một số phương án, liều dùng của hạt virus được dùng cho cá thể bằng ít nhất khoảng giá trị bất kỳ trong số 1×10^8 đến khoảng 1×10^{13} bản sao hệ gen/kg trọng lượng cơ thể. Theo một số phương án, liều dùng của hạt virus được dùng cho cá thể là khoảng giá trị bất kỳ trong số 1×10^8 đến khoảng 1×10^{13} bản sao hệ gen/kg trọng lượng cơ thể.

Theo một số phương án, tổng lượng của hạt virus được dùng cho cá thể bằng ít nhất 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 lượng của hạt virus 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.

Theo một số phương án của sáng chế, thể tích của chế phẩm được tiêm vào thể vân là lớn hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l, 5 μ l, 6 μ l, 7 μ l, 8 μ l, 9 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l, 400 μ l, 500 μ l, 600 μ l, 700 μ l, 800 μ l, 900 μ l, hoặc 1 mL, hoặc lượng bất kỳ giữa chúng.

Theo một số phương án, thể tích thứ nhất của chế phẩm được tiêm vào vùng thứ nhất của não, và thể tích thứ hai của chế phẩm được tiêm vào vùng thứ hai của não. Ví dụ, theo một số phương án, thể tích thứ nhất của chế phẩm được tiêm vào nhân đuôi, và thể tích thứ hai của chế phẩm được tiêm vào hạch. Theo một số phương án, thể tích 1X của chế phẩm được tiêm vào nhân đuôi, và thể tích 1,5X, 2X, 2,5X, 3X, 3,5X, hoặc 4X của chế phẩm được tiêm vào hạch, trong đó X là thể tích mà lớn hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l, 5 μ l, 6 μ l, 7 μ l, 8 μ l, 9 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l, 400 μ l, 500 μ l, 600 μ l, 700 μ l, 800 μ l, 900 μ l, hoặc 1 mL, hoặc lượng bất kỳ giữa chúng.

Chế phẩm theo sáng chế (ví dụ, hạt virus tái tổ hợp bao gồm vector mã hóa ARNi theo sáng chế) có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân trị bệnh bổ sung để điều trị 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.

Cấu trúc và vector biểu hiện ARNi

Sáng chế đề xuất cấu trúc biểu hiện, vector và hạt virus để biểu hiện ARNi được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa ARNi theo sáng chế bao gồm khung miARN khác loài. Theo một số phương án, việc sử dụng khung miARN khác loài là để điều biến sự biểu hiện của miARN; ví dụ, để làm tăng sự biểu hiện của miARN hoặc để làm giảm sự biểu hiện của miARN. Bất kỳ khung miARN đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng. Theo một số phương án, khung miARN thu được từ khung miR-155 (tham khảo, ví dụ, Lagos-Quintana, M. và cộng sự (2002) *Curr. Biol.* 12:735-9 và bộ kit vector biểu hiện miR ARNi Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II từ Life Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA). Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa ARNi theo sáng chế bao gồm khung miARN. Theo một số phương án, khung miARN được đề xuất bởi SEQ ID NO:14.

Theo một số phương án, ARNi nhắm đích ARN mã hóa polypeptit liên quan đến rối loạn. Theo một số phương án, rối loạn là rối loạn CNS. Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, hiểu rằng ARNi có thể được sử dụng làm giảm hoặc loại trừ biểu hiện và/hoặc hoạt tính của polypeptit mà chức năng đạt được của nó có liên quan đến rối loạn. Các ví dụ không giới hạn của các rối loạn CNS theo sáng chế mà có thể được điều trị bởi polypeptit chữa bệnh hoặc axit nucleic chữa bệnh theo sáng chế (các gen ví dụ mà có thể nhắm đích hoặc được cung cấp được đề xuất trong dấu ngoặc cho mỗi rối loạn) bao gồm đột quỵ (*ví dụ, caspaza-3, Beclin1, Ask1, PAR1, HIF1 α , PUMA*, và/hoặc bất kỳ trong số các gen được mô tả trong Fukuda, A.M. và Badaut, J. (2013) *Genes (Basel)* 4:435-456), bệnh Huntington (mutant *HTT*), chứng động kinh (*ví dụ, SCN1A, NMDAR, ADK*, và/hoặc 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 gọi là bệnh xơ cứng teo cơ một bên; *SOD1*), bệnh Alzheimer (protein tiền chất dạng tinh bột, hạt tơ), bệnh thoái hóa hạch nền - vỏ não hoặc CBD (hạt tơ), thoái hóa vỏ não hạch đáy hoặc CBGD (hạt tơ), bệnh sa sút trí tuệ trán-thái dương hoặc FTD (hạt tơ), liệt trên nhân tiến triển hoặc PSP (hạt tơ), bệnh teo đa hệ thống hoặc MSA (alpha-synuclein), ung thư não (*ví dụ, đột biến hoặc gen đột biến gây bệnh ung thư biểu hiện quá mức có trong ung thư não*), và bệnh chuyển hóa tiêu thể (LSD). Rối loạn theo sáng chế có thể bao gồm các rối loạn 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, gen chuyển (*ví dụ., ARNi theo sáng chế*) liên kết hoạt động với promoter. Promoter ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, promoter rất sớm của virus cự bào (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, promoter phosphoglycerat kinaza- 1 (PGK), promoter virus khi 40 (SV40) và promoter CK6, promoter transthyretin (TTR), promoter TK, promoter đáp ứng tetracyclin (TRE), promoter HBV, promoter hAAT, promoter LSP,

promoter đặc hiệu gan khảm (LSPs), promoter E2F, promoter telomeraza (hTERT); vùng tăng cường của virus cự bào/promoter beta-actin ở gà/ β -globin ở thỏ (promoter CAG; Niwa và cộng sự., *Gene*, 1991, 108(2):193-9) và promoter 1-alpha yếu tố kéo dài (promoter EFl-alpha) (Kim và cộng sự., *Gene*, 1990, 91(2):217-23 và Guo và cộng sự., *Gene Ther.*, 1996, 3(9):802-10). Theo một số phương án, promoter bao gồm promoter β -glucuronidaza của người hoặc vùng tăng cường virus cự bào được liên kết với promoter β -actin của gà (CBA). Promoter có thể là promoter 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 promoter CBA. Các promoter ví dụ và mô tả có thể tìm thấy, ví dụ, trong U.S. PG Pub. 20140335054. Theo một số phương án, promoter là Promoter CBA, a minimum Promoter CBA, promoter CMV hoặc promoter GUSB.

Các ví dụ của promoter cấu trúc bao gồm, không giới hạn, promoter LTR của virus Rous sarcom retrovirus (RSV) (tùy ý với vùng tăng cường RSV), promoter của virus cự bào (CMV) (tùy ý với vùng tăng cường CMV) [xem, ví dụ, Boshart và cộng sự, *Cell*, 41:521-530 (1985)], promoter SV40, promoter dihydrofolat reductaza, promoter 13-actin, promoter phosphoglycerol kinaza (PGK), và promoter EFla [Invitrogen].

Promoter cảm ứng cho phép điều chỉnh biểu hiện gen và có thể được điều chỉnh ngoại sinh bởi các hợp chất được cung cấp, các yếu tố môi trường như nhiệt độ, hoặc sự có mặt của tình trạng sinh lý cụ thể, ví dụ, pha cấp, tình trạng khác biệt cụ thể của tế bào, hoặc chỉ trong sao chép tế bào. Promoter 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. Các ví dụ của promoter cảm ứng được điều chỉnh ngoại sinh bởi các promoter được cung cấp bao gồm promoter metallothionine (MT) của cừu cảm ứng kẽm, promoter virus gây ung thư vú chuột nhắt (MMTV) cảm ứng dexamethason (Dex), hệ promoter polymeraza T7 (WO 98/10088); promoter hoocmon điều khiển lột xác côn trùng (No và cộng sự, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351 (1996)), hệ kìm hãm tetracyclin (Gossen và cộng sự, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992)), hệ cảm ứng tetracyclin (Gossen và cộng sự, *Science*, 268:1766-1769 (1995), tham khảo thêm Harvey và cộng sự, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998)), hệ cảm ứng RU486 (Wang và cộng sự, *Nat. Biotech.*, 15:239-243 (1997) và

Wang và cộng sự, *Gene Ther.*, 4:432-441 (1997)) và hệ cảm ứng rapamycin (Magari và cộng sự, *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872 (1997)). Các dạng khác nữa của promoter cảm ứng mà có thể hữu dụng trong bối cảnh này là các dạng được điều chỉnh bởi tình trạng sinh lý cụ thể, ví dụ, nhiệt độ, pha cấp, tình trạng khác biệt cụ thể của tế bào, hoặc chỉ trong sao chép tế bào.

Theo phương án khác, promoter tự nhiên, hoặc mảnh của chúng, đối với gen chuyển sẽ được sử dụng. Promoter tự nhiên có thể được ưu tiên khi mong muốn rằng biểu hiện của gen chuyển cần bắt chước biểu hiện tự nhiên. Promoter 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 polyadenyl hóa hoặc các trình tự liên ứng Kozak có thể còn được sử dụng để bắt chước sự biểu hiện tự nhiên.

Theo một số phương án, các trình tự điều chỉnh truyền khả năng biểu hiện gen đặc hiệu mô. Trong một số trường hợp, các trình tự điều chỉnh 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 chỉnh đặc hiệu mô này (ví dụ, promoter, vùng tăng cường, v.v.) là đã biết rõ trong lĩnh vực. Các trình tự điều chỉnh đặc hiệu mô ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở promoter đặc hiệu mô sau: thuộc neuron như promoter enolaza (NSE) đặc hiệu neuron (Andersen và cộng sự, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993)), promoter gen chuỗi nhẹ sợi thần kinh (Piccioli và cộng sự, *Proc. Natl. Acad. Sci. IDSA*, 88:5611-5 (1991)), và promoter gen vgf đặc hiệu neuron (Piccioli và cộng sự, *Neuron*, 15:373-84 (1995)). Theo một số phương án, promoter đặc hiệu mô là promoter của gen được chọn từ: nhân neuron (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 promoter 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, promoter là promoter beta-actin ở gà.

Theo một số phương án, promoter biểu hiện axit nucleic khác loài trong 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, promoter làm biểu hiện axit nucleic khác loại trong tế bào não. Tế bào não có thể đề cập đến bất kỳ tế bào não đã biết trong lĩnh vực, bao gồm không giới hạn neuron (như neuron cảm giác, neuron vận

động, noron trung gian, noron dẫn truyền thần kinh, noron gai môi trường, noron tác động kiểu colin, Noron dẫn truyền thần kinh GABA, noron hình tháp, v.v.), tế bào thần kinh đệm (như tiểu thần kinh đệm, thần kinh đệm, tế bào hình sao, tế bào thần kinh đệm ít sao, tế bào ống nội tủy, radial tế bào thần kinh đệm hướng tâm, v.v.), tế bào nhu mô não, vi tế bào thần kinh đệm, tế bào ependemal, và/hoặc tế bào Purkinje. Theo một số phương án, promoter biểu hiện axit nucleic khác loài trong noron và/hoặc tế bào thần kinh đệm. Theo một số phương án, noron là noron gai môi trường của nhân đuôi, noron gai môi trường của hạch, noron của lớp vỏ não IV và/hoặc noron của lớp vỏ não V.

Các promoter khác nhau mà biểu hiện bản mã (*ví dụ*, gen chuyển khác loài) trong tế bào CNS, tế bào não, noron, và tế bào thần kinh đệm là đã biết trong lĩnh vực và được mô tả ở đây. Promoter này có thể bao gồm các trình tự đối chứng thường liên quan đến gen được chọn hoặc các trình tự đối chứng khác loài. Thông thường, các trình tự đối chứng khác loài hữu dụng bao gồm các trình tự có nguồn gốc từ các trình tự mã hóa gen của động vật có vú hoặc gen của virus. Các ví dụ bao gồm, không giới hạn, promoter sớm SV40, promoter LTR của virus gây ung thư vú chuột nhắt, promoter muộn chính của adenovirus (Ad MLP), promoter của virus herpes đơn dạng (HSV), promoter của virus cự bào (CMV) như promoter rất sớm của CMV (CMVIE), a promoter của virus sarcom Rous (RSV), promoter tổng hợp, promoter lai, và tương tự. Ngoài ra, trình tự có nguồn gốc từ gen không phải virus, như gen metallothionein ở chuột, cũng có thể được sử dụng. Trình tự của promoter này thường bán trên thị trường bởi, *ví dụ*, Stratagene (San Diego, CA). Promoter đặc hiệu CNS và promoter cảm ứng có thể được sử dụng. Các ví dụ của promoter đặc hiệu CNS bao gồm không giới hạn các promoter phân lập từ Gen đặc hiệu CNS như myelin protein bazơ (MBP), protein axit sợi tế bào thần kinh đệm hướng tâm (GFAP), và enolaza đặc hiệu noron (NSE). Các ví dụ của promoter cảm ứng bao gồm các yếu tố đáp ứng AND đối với ecdyson, tetracyclin, metallothionein, và hypoxia, *không kể những cái khác*.

Sáng chế bao gồm việc sử dụng bộ gen virus tái tổ hợp để đưa một hoặc nhiều trình tự axit nucleic mã hóa đối với ARNi như được mô tả ở đây hoặc đóng gói vào hạt virus AAV. Bộ gen virus tái tổ hợp có thể bao gồm yếu tố bất kỳ để thiết lập biểu hiện của ARNi, ví dụ, promoter, axit nucleic khác loài, ITR, yếu tố liên kết ribosome, vùng kết thúc, vùng tăng cường, vùng đánh dấu chọn lọc, intron, tín hiệu polyA, và/hoặc gốc sao chép. Theo một số

phương án, vectơ rAAV bao gồm một hoặc nhiều trong số vùng tăng cường, cặp bật cho ghép/vật nhận ghép, vị trí gắn ma trận, hoặc tín hiệu polyadenyl hóa.

Theo một số phương án, việc cho dùng lượng có hiệu quả của các hạt rAAV bao gồm vectơ mã hóa ARNi chuyển nạp các tế bào (ví dụ, tế bào CNS, tế bào não, neuron, và/hoặc tế bào thần kinh đệm) ở hoặc gần vị trí cho dùng (ví dụ, thể vân và/hoặc vỏ não) hoặc xa hơn vị trí cho 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% neuron 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 neuron được chuyển nạp. Phương pháp để xác định các neuron được chuyển nạp bởi hạt virus tái tổ hợp biểu hiện miARN là đã biết trong lĩnh vực; ví dụ, hóa mô miễn dịch, dò ARN (ví dụ, qPCR, kỹ thuật Northern blotting, phương pháp giải trình tự ARN (ARN-seq), phương pháp lai tại chỗ, và tương tự) hoặc việc sử dụng chất đánh dấu đồng biểu hiện như protein huỳnh quang màu xanh lá cây cải tiến có thể được sử dụng để phát hiện sự biểu hiện.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt virus bao gồm bộ gen tự bổ sung tái tổ hợp (ví dụ, vectơ rAAV tự bổ sung). Hạt virus AAV với bộ gen vectơ tự bổ sung và phương pháp sử dụng bộ gen AAV tự bổ sung được mô tả trong Sáng chế 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., và cộng sự., (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111, mỗi trong số chúng được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. rAAV bao gồm bộ gen tự bổ sung sẽ nhanh chóng tạo thành phân tử ADN sợi đôi bởi trình tự bổ sung một phần (ví dụ, bổ sung cho sợi mã hóa và không mã hóa của axit nucleic khác loài). Theo một số phương án, vectơ có chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa cho axit nucleic khác loài 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 loài thứ nhất mã hóa ARNi và trình tự axit nucleic khác loài thứ hai mã hóa phần bổ sung của ARNi được liên kết bởi ITR đột biến (ví dụ, ITR bên phải). Theo một số phương án, ITR bao gồm trình tự polynucleotit 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC

GGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG – 3' (SEQ ID NO:12). ITR đột biến có chứa sự mất của vùng D có chứa trình tự phân giải cuối. Kết quả là, trong quá trình sao chép hệ gen virus AAV, protein rep sẽ không phân cắt hệ gen virus ở ITR đột biến và như vậy, hệ gen virus tái tổ hợp có chứa trình tự sau theo thứ tự 5' đến 3' sẽ được đóng gói trong capsit virus: 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.

Hạt virus và phương pháp sản xuất hạt virus

Sáng chế đề xuất, *không kể những cái khác*, hạt virus tái tổ hợp bao gồm axit nucleic mã hóa ARNi theo sáng chế, cũng như phương pháp sử dụng chúng để điều trị bệnh hoặc rối loạn ở động vật có vú; *ví dụ*, bệnh Huntington.

Hạt virus

Sáng chế đề xuất hạt virus bao gồm ARNi như được bộc lộ ở đây. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt virus để phân phối ARNi theo sáng chế như được bộc lộ ở đây. Ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng hạt virus tái tổ hợp để phân phối ARNi để điều trị bệnh hoặc rối loạn ở động vật có vú; *ví dụ*, các hạt rAAV bao gồm ARNi để điều trị HD. Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp là hạt AAV tái tổ hợp. Theo một số phương án, hạt virus là hạt AAV tái tổ hợp bao gồm axit nucleic bao gồm trình tự ARNi theo sáng chế được kẹp bởi một hoặc hai ITR. Axit nucleic được bao trong capsit trong hạt AAV. Hạt AAV cũng có chứa protein capsit. Theo một số phương án, axit nucleic bao gồm (các) trình tự mã hóa có lợi (*ví dụ*, axit nucleic của ARNi theo sáng chế) các thành phần được liên kết hoạt động theo hướng phiên mã, các trình tự đối chứng bao gồm trình tự khởi đầu phiên mã và kết thúc phiên mã, nhờ 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 virus AAV. Xem Davidson và cộng sự., *PNAS*, 2000, 97(7)3428-32; Passini và cộng sự., *J. Virol.*, 2003, 77(12):7034-40; và Pechan và cộng sự., *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 vector theo sáng chế không cần phải có trình tự nucleotit kiểu đại (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 kiểu huyết thanh AAV. Hiện nay hơn 40 kiểu huyết thanh của AAV đã được biết, và các kiểu huyết thanh mới và biến thể của các kiểu huyết thanh hiện có tiếp tục được xác định Xem Gao và cộng sự., *PNAS*, 2002, 99(18): 11854-6; Gao và cộng sự., *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6; và Bossis và cộng sự., *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810. Việc sử dụng kiểu huyết thanh AAV bất kỳ được coi như là nằm trong phạm vi của sáng chế. Theo một số phương án, vector rAAV là vector có nguồn gốc từ kiểu huyết thanh AAV, bao gồm không giới hạn, ITR AAV là AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, ITR kiểu huyết thanh capsit AAV của dê, AAV của bò, hoặc AAV của chuột hoặc tương tự. Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV bao gồm ITR của AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, ITR kiểu huyết thanh capsit AAV của dê, AAV của bò, hoặc AAV của chuột hoặc tương tự. Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV còn mã hóa ARNi như được mô tả ở đây. Ví dụ, axit nucleic trong AAV có thể bao gồm ít nhất một ITR trong số bất kỳ kiểu huyết thanh AAV được dự tính trong đó và có thể còn mã hóa ARNi bao gồm sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và thứ hai tạo thành cấu trúc kép; b) sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn có ít nhất 11 bazơ, trong đó vùng dẫn bao gồm vùng hạt bao gồm các bazơ 1-N của sợi dẫn, trong đó N=7 hoặc N=8; và c) sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn có ít nhất 11 bazơ, trong đó vùng không dẫn bao gồm trình tự lỗi đối diện với bất kỳ một hoặc nhiều trong số các bazơ 1-(N+2) của vùng dẫn trong cấu trúc kép. Theo một số phương án, rAAV có thể bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV bao gồm axit nucleic 5' đến 3' mã hóa vùng sau đây: ITR (ví dụ, ITR AAV2), promoter, axit nucleic mã hóa ARNi như được bộc lộ ở đây, tín hiệu polyadenyl hóa, và ITR AAV (ví dụ, ITR AAV2). Theo một số phương án, axit nucleic trong

AAV bao gồm axit nucleic 5' đến 3' mã hóa vùng sau đây: ITR (*ví dụ*, ITR AAV2), promoter, axit nucleic mã hóa ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), tín hiệu polyadenyl hóa, và ITR AAV (*ví dụ*, ITR AAV2). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV bao gồm axit nucleic 5' đến 3' mã hóa vùng sau đây: ITR (*ví dụ*, ITR AAV2), promoter CBA, axit nucleic mã hóa ARNi như được bộc lộ ở đây, tín hiệu polyadenyl hóa (*ví dụ*, a polyA hoocmon tăng trưởng ở bò), và ITR AAV (*ví dụ*, ITR AAV2). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV bao gồm axit nucleic 5' đến 3' mã hóa vùng sau đây: ITR (*ví dụ*, ITR AAV2), promoter CBA, axit nucleic mã hóa ARNi bao gồm sợi thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), tín hiệu polyadenyl hóa (*ví dụ*, a polyA hoocmon tăng trưởng ở bò), và ITR AAV (*ví dụ*, ITR AAV2). Theo một số phương án, sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép, và gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 nêu ở SEQ ID NO:2 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất. Theo một số phương án, các gốc U là các gốc 11 và 12 nêu ở SEQ ID NO:1 của sợi thứ nhất không tạo thành bắt cặp bazơ với sợi thứ hai. Theo một số phương án, gốc A ở gốc 18 hoặc gốc 19 nêu ở SEQ ID NO:2 của sợi thứ hai không tạo thành cặp bazơ với gốc trong sợi thứ nhất và các gốc U là các gốc 11 và 12 nêu ở SEQ ID NO:1 của sợi thứ nhất không tạo thành bắt cặp bazơ với sợi thứ hai.

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 promoter và axit nucleic mã hóa cho ARNi. Theo một số phương án, đoạn nhồi axit nucleic có thể là trình tự đoạn nhồi alpha-1-antitrypsin (AAT) ở người hoặc trình tự đoạn nhồi dòng vô tính 16 P1 nhiễm sắc thể C16 P1 (C16 ở người).

Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV có chứa axit nucleic có trình tự SEQ ID NO:13. Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV bao gồm axit nucleic mà có ít nhất khoảng 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương

đồng với SEQ ID NO:13. Theo các phương án khác, hạt rAAV bao gồm các protein capsit of AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8, AAVrh8R, AAVrh.10, AAV11, AAV12, hoặc đột biến của các protein capsit này. Theo một số phương án, protein capsit đột biến duy trì được khả năng tạo thành capsit AAV. Theo một số phương án, hạt rAAV bao gồm capsit đột biến tyrosin AAV5 (Zhong L. và cộng sự, (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(22):7827-7832. Theo các phương án khác, hạt rAAV có chứa protein capsit của kiểu huyết thanh AAV từ Nhánh gai nổi A-F (Gao, và cộng sự, *J. Virol.* 2004, 78(12):6381).

Các kiểu huyết thanh AAV khác nhau được sử dụng để tối ưu hóa sự chuyển nạp các tế bào đích cụ thể hoặc để nhắm đích các loại tế bào đặc hiệu trong mô đích cụ thể (ví dụ, mô bị bệnh). Hạt rAAV có thể có chứa protein virus và axit nucleic virus của cùng kiểu huyết thanh hoặc kiểu huyết thanh hỗn hợp. Ví dụ, theo một số phương án hạt rAAV có thể bao gồm Protein capsit AAV1 và ít nhất một ITR AAV2 hoặc nó có thể bao gồm Protein capsit AAV2 và ít nhất một ITR AAV1. Hỗn hợp bất kỳ của các kiểu 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 các hạt rAAV bao gồm capsit của AAV1 và vectơ rAAV theo sáng chế (ví dụ, băng biểu hiện bao gồm axit nucleic mã hóa ARNi theo sáng chế), được kẹp by ít nhất một ITR AAV2. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các hạt rAAV bao gồm capsit AAV2.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt virus có chứa hệ gen tự bổ sung tái tổ hợp. Các hạt virus 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., và cộng sự., (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 cấu trúc 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, sáng chế đề xuất hạt virus AAV bao gồm bộ gen AAV, trong đó bộ gen rAAV bao gồm trình tự polynucleotit khác loài thứ nhất (ví dụ, ARNi theo sáng chế) và trình tự polynucleotit khác loài thứ hai (ví dụ, sợi đối nghĩa của ARNi theo sáng chế) trong đó trình tự polynucleotit khác loài thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trên cùng sợi với trình tự polynucleotit thứ

hai dọc theo hầu hết hoặc toàn bộ chiều dài của nó. Theo một số phương án, trình tự polynucleotit khác loài thứ nhất và trình tự polynucleotit khác loài thứ hai được liên kết bởi trình tự xúc tiến sự bắt cặp bazơ nội chuỗi; *ví dụ*, cấu trúc ADN hình cặp tóc. Cấu trúc kẹp tóc là đã biết trong lĩnh vực, ví dụ trong phân tử miARN hoặc siARN. Theo một số phương án, trình tự polynucleotit khác loài thứ nhất và trình tự polynucleotit khác loài thứ hai được liên kết bởi ITR đột biến (*ví dụ*, ITR thẳng). Theo một số phương án, ITR có chứa trình tự polynucleotit

5'-

CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGC
CCACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCG – 3' (SEQ ID NO:12). 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 virus AAV, protein rep sẽ không phân cắt hệ gen virus ở ITR đột biến và như vậy, hệ gen virus tái tổ hợp có chứa trình tự sau theo thứ tự 5' đến 3' sẽ được đóng gói trong capsit virus: 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. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt virus AAV bao gồm bộ gen virus tái tổ hợp bao gồm ITR AAV2 chức, trình tự polynucleotit mã hóa ARNi thứ nhất theo sáng chế, ITR AAV2 đột biến bao gồm đột biến làm khuyết của vùng D và khuyết trình tự chức phân giải cuối, trình tự polynucleotit thứ hai bao gồm trình tự bổ sung cho trình tự mã hóa ARNi theo sáng chế, của trình tự polynucleotit thứ nhất và ITR AAV2 chức.

Theo một số phương án, hạt virus là hạt adenovirus. Theo một số phương án, hạt adenovirus là hạt adenovirus tái tổ hợp, *ví dụ*, vectơ polynucleotit bao gồm ARNi theo sáng chế giữa hai ITR. Theo một số phương án, hạt adenovirus không có hoặc chứa bản sao khuyết của một hoặc nhiều gen E1, mà liên quan đến khiếm khuyết sao chép adenovirus. Adenovirus bao gồm bộ gen ADN sợi đôi, thẳng trong capsit hai mươi mặt không bọc, lớn (~950Å). Adenovirus có bộ gen lớn mà có thể kết hợp hơn 30kb trình tự khác loài (*ví dụ*, ở vị trí vùng E1 và/hoặc E3), làm chúng đều phù hợp để dùng với gen khác loài lớn hơn. Chúng còn được biết là gây nhiễm tế bào phân chia và không phân chia và không tích hợp một cách tự nhiên vào bộ gen chủ (mặc dù các biến thể lai có thể có khả năng này). Theo một số phương án, vectơ adenovirus có thể là vectơ adenovirus thể hệ thứ nhất với trình tự khác loài ở vị trí E1. Theo một số phương án, vectơ adenovirus có thể là vectơ adenovirus thể hệ thứ hai với các

đột biến hoặc loại bỏ bổ sung ở E2A, E2B, và/hoặc E4. Theo một số phương án, vector adenovirut có thể là vector adenovirut thể hệ thứ ba hoặc phá hủy bên trong mà không có tất cả gen mã hóa virus, chỉ còn các ITR và tín hiệu đóng gói và cần adenovirut hỗ trợ *in trans* để sao chép, và đóng gói. Các hạt adenovirut được khảo sát để dùng làm vector cho chuyển nhiễm tạm thời của tế bào động vật có vú cũng như vector liệu pháp gen. Để mô tả thêm, tham khảo, *ví dụ*, Danthinne, X. và Imperiale, M.J. (2000) *Gene Ther.* 7:1707-14 và Tatsis, N. và Ertl, H.C. (2004) *Mol. Ther.* 10:616-29.

Theo một số phương án, hạt virus là hạt adenovirut tái tổ hợp bao gồm axit nucleic mã hóa ARNi theo sáng chế. Sử dụng bất kỳ kiểu huyết thanh của adenovirut được xem là thuộc phạm vi của sáng chế. Theo một số phương án, vector adenovirut tái tổ hợp là vector có nguồn gốc từ kiểu huyết thanh của adenovirut, bao gồm không giới hạn, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu5, AdHu7, AdHu11, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad loại 3 của bò, Ad loại 2 của chó, Ad của cừu, và Ad loại 3 của lợn. Hạt adenovirut còn bao gồm các protein capsit. Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp bao gồm hạt adenovirut kết hợp với một hoặc nhiều các protein capsit virus lạ. Các kết hợp này có thể được gọi là hạt adenovirut tái tổ hợp kiểu giả. Theo một số phương án, các protein capsit virus lạ được dùng trong hạt adenovirut tái tổ hợp kiểu giả thu được từ các virus lạ hoặc từ kiểu huyết thanh khác của adenovirut. Theo một số phương án, các protein capsit virus lạ có nguồn gốc từ, bao gồm không giới hạn, reovirut loại 3. Các ví dụ của vector và kết hợp protein capsit dùng trong các hạt adenovirut kiểu giả có thể tìm thấy trong tài liệu sau (Tatsis, N. và cộng sự (2004) *Mol. Ther.* 10(4):616-629 và Ahi, Y. và cộng sự (2011) *Curr. Gene Ther.* 11(4):307-320). Kiểu huyết thanh khác của adenovirut có thể được sử dụng để tối ưu hóa sự chuyển nạp của gen đích cụ thể hoặc để nhắm đích loại gen đặc hiệu trong mô đích cụ thể (*ví dụ*, mô bị bệnh). Mô hoặc tế bào được nhắm đích bởi kiểu huyết thanh đặc hiệu của adenovirut, bao gồm không giới hạn, phổi (*ví dụ* HuAd3), lá lách và gan (*ví dụ* HuAd37), cơ trơn, hoạt dịch khớp, tế bào đuôi gai, tế bào tim mạch, dòng tế bào u (*ví dụ* HuAd11), và tế bào đuôi gai (*ví dụ* HuAd5 được tạo kiểu giả với reovirut loại 3, HuAd30, hoặc HuAd35). Để mô tả thêm, tham khảo Ahi, Y. và cộng sự (2011) *Curr. Gene Ther.* 11(4):307-320, Kay, M. và cộng sự. (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40, và Tatsis,

N. và cộng sự (2004) *Mol. Ther.* 10(4):616-629. Vector adenovirut được dùng bằng cách dùng trong thể vận (tham khảo, ví dụ, Mittoux, V. và cộng sự (2002) *J. Neurosci.* 22:4478-86).

Theo một số phương án, hạt virus là hạt lentivirut. Theo một số phương án, hạt lentivirut là hạt lentivirut tái tổ hợp, ví dụ, vector polynucleotit mã hóa ARNi theo sáng chế giữa hai LTR. Lentivirut là retrovirus ssARN, dương -có nghĩa với bộ gen bằng khoảng 10 kb. Lentivirut được biết là tích hợp vào bộ gen của tế bào phân chia và không phân chia. Hạt lentivirut có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách chuyển nhiễm nhiều plasmid (thường bộ gen lentivirut và gen cần cho sao chép và/hoặc đóng gói được tách riêng để phòng ngừa sao chép virus) vào dòng tế bào đóng gói, mà đóng gói bộ gen lentivirut cải biến vào hạt lentivirut. Theo một số phương án, hạt lentivirut có thể đề cập đến vector thế hệ thứ nhất không có protein bọc. Theo một số phương án, hạt lentivirut có thể đề cập đến vector thế hệ thứ hai mà không có tất cả gen trừ các vùng gag/pol và tat/rev. Theo một số phương án, hạt lentivirut có thể đề cập đến vector thế hệ thứ ba mà chỉ chứa gen rev, gag, và pol nội sinh và có LTR khả năng chuyển nạp không có gen tat (see Dull, T. và cộng sự (1998) *J. Virol.* 72:8463-71). Để mô tả thêm, tham khảo Durand, S. và Cimorelli, A. (2011) *Viruses* 3:132-59.

Theo một số phương án, hạt virus là hạt lentivirut tái tổ hợp bao gồm axit nucleic mã hóa ARNi theo sáng chế. Sử dụng any lentivirut vector được xem là thuộc phạm vi của sáng chế. Theo một số phương án, vector lentivirut thu được từ lentivirut bao gồm, không giới hạn, virus-1 gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV-1), virus-2 gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV-2), virus gây suy giảm miễn dịch ở khỉ (SIV), virus gây suy giảm miễn dịch ở mèo (FIV), virus gây bệnh thiếu máu lầy nhiễm ở ngựa (EIAV), virus gây suy giảm miễn dịch ở bò (BIV), virus gây bệnh Jembrana (JDV), virus visna (VV), và virus gây viêm não ở dê (CAEV). Hạt lentivirut also bao gồm các protein capsit. Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp bao gồm vector lentivirut kết hợp với một hoặc nhiều các protein capsit virus lạ. Tổ hợp này có thể được gọi là hạt lentivirut tái tổ hợp kiểu giả. Theo một số phương án, các protein capsit virus lạ được sử dụng trong hạt lentivirut tái tổ hợp kiểu giả thu được từ virus lạ. Theo một số phương án, protein capsit virus lạ us được sử dụng trong hạt lentivirut tái tổ hợp kiểu giả là virus gây viêm miệng có mụn nước glycoprotein (VSV-GP). VSV-GP tương tác với thụ thể tế bào khắp nơi, tạo ra tính hướng kích thích mô rộng cho hạt lentivirut tái tổ hợp kiểu giả. Ngoài ra, VSV-GP được cho là tạo ra tính ổn định cao cho hạt lentivirut tái tổ hợp kiểu

giả. Theo các phương án khác, các protein capsit virus lại có nguồn gốc từ, bao gồm không giới hạn, virus Chandipura, Virus Rabies, virus Mokola, virus gây viêm màng não lympho bào (LCMV), virus sông Ross (RRV), virus Sindbis, virus rừng Semliki (SFV), virus gây viêm não ngựa Venezuela, Virus Ebola Reston, Virus Ebola Zaire, Virus Marburg, virus Lassa, virus gây bệnh bạch cầu ở gà (ALV), Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV), Moloney Murine leukemia virus (MLV), Gibbon ape leukemia virus (GALV), retrovirus nội sinh ở mèo (RD114), virus gây u lympho T ở người loại 1 (HTLV-1), virus gây sùi mào gà ở người, virus Maedi-visna (MVV), SARS-CoV, virus Sendai, virus hợp bào hô hấp (RSV), virus gây bệnh nhiễm khuẩn hô hấp loại 3 ở người, virus viêm gan C (HCV), virus cúm, virus dịch tả gà (FPV), hoặc virus nucleopolyhedro *Autographa californica* (AcMNPV). Các ví dụ của tổ hợp vector và protein capsit được dùng trong các hạt lentivirus kiểu giả có thể tìm thấy, ví dụ, trong Cronin, J. và cộng sự. (2005). *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398. Các hạt lentivirus tái tổ hợp kiểu giả có thể được sử dụng để tối ưu hóa sự chuyển nạp của tế bào đích cụ thể hoặc nhắm đích các loại tế bào đặc hiệu trong mô đích cụ thể (ví dụ, mô bị bệnh). Ví dụ, mô được nhắm đích bởi hạt lentivirus tái tổ hợp kiểu giả đặc hiệu, bao gồm không giới hạn, gan (ví dụ được tạo kiểu giả với protein VSV-G, LCMV, RRV, hoặc SeV F), phổi (ví dụ được tạo kiểu giả với protein Ebola, Marburg, SeV F và HN, hoặc JSRV), tế bào mạch tuyến tụy (ví dụ được tạo kiểu giả với protein LCMV), hệ thần kinh trung ương (ví dụ được tạo kiểu giả với protein VSV-G, LCMV, Rabies, hoặc Mokola), võng mạc (ví dụ được tạo kiểu giả với protein VSV-G hoặc Mokola), bạch cầu đơn nhân hoặc cơ (ví dụ được tạo kiểu giả với protein Mokola hoặc Ebola), hệ tạo huyết (ví dụ được tạo kiểu giả với protein RD114 hoặc GALV), hoặc tế bào ung thư (ví dụ được tạo kiểu giả với protein GALV hoặc LCMV). Để mô tả thêm, tham khảo Cronin, J. và cộng sự (2005). *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398 và Kay, M. và cộng sự. (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40.

Theo một số phương án, hạt virus là hạt virus herpes đơn dạng (HSV). Theo một số phương án, hạt HSV là hạt rHSV, ví dụ, vector polynucleotit mã hóa ARNi theo sáng chế giữa hai TR. HSV là virus ADN sợi đôi, được bọc với bộ gen bằng khoảng 152 kb. Có lợi là, khoảng một nửa gen của nó là không thiết yếu và có thể xóa bỏ để điều tiết trình tự khác loài. Hạt HSV lây nhiễm các tế bào không phân chia. Ngoài ra, chúng thiết lập một cách tự nhiên thời gian đợi trong neuron, di chuyển bằng cách chuyển tải lùi, và có thể chuyển qua khớp thần

kinh, làm chúng có lợi để chuyển nhiễm nơon và/hoặc nghiên cứu liệu pháp gen liên quan đến hệ thần kinh. Theo một số phương án, hạt HSV có thể sao chép thiếu hoặc sao chép đủ (ví dụ, đủ cho chu kỳ sao chép đơn thông qua bất hoạt một hoặc nhiều gen muộn). Để mô tả thêm, tham khảo Manservigi, R. và cộng sự (2010) *Open Virol. J.* 4:123-56.

Theo một số phương án, hạt virus là hạt rHSV bao gồm axit nucleic mã hóa ARNi theo sáng chế. Sử dụng bất kỳ vectơ HSV được coi là thuộc phạm vi của sáng chế. Theo một số phương án, vectơ HSV thu được từ kiểu huyết thanh HSV, bao gồm không giới hạn, HSV-1 và HSV-2. Hạt HSV còn bao gồm các protein capsit. Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp bao gồm vectơ HSV kết hợp với một hoặc nhiều các protein capsit virus lạ. Tổ hợp này có thể được gọi là hạt rHSV kiểu giả. Theo một số phương án, các protein capsit virus lạ được dùng trong hạt rHSV kiểu giả thu được từ virus lạ hoặc từ kiểu huyết thanh HSV khác. Theo một số phương án, các protein capsit virus lạ được dùng trong hạt rHSV kiểu giả là virus gây viêm miệng có mụn nước glycoprotein (VSV-GP). VSV-GP tương tác với thụ thể tế bào khắp nơi, tạo ra tính hướng kích thích mở rộng cho hạt rHSV tái tổ hợp kiểu giả. Ngoài ra, VSV-GP được cho là tạo ra tính ổn định cao cho hạt rHSV tái tổ hợp kiểu giả. Theo các phương án khác, các protein capsit virus lạ có thể từ kiểu huyết thanh HSV khác. Ví dụ, vectơ HSV-1 có thể gồm có một hoặc nhiều các protein capsit HSV-2. Các kiểu huyết thanh HSV khác có thể được sử dụng để tối ưu hóa sự chuyển nạp của tế bào đích cụ thể hoặc nhắm đích các kiểu tế bào đặc hiệu trong mô đích cụ thể (ví dụ, mô bị bệnh). Mô hoặc tế bào được nhắm đích bởi kiểu huyết thanh đặc hiệu của adenovirus bao gồm không giới hạn, hệ thần kinh trung ương và nơon (ví dụ HSV-1). Để mô tả thêm, tham khảo Manservigi, R. và cộng sự (2010) *Open Virol J* 4:123-156, Kay, M. và cộng sự. (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40, và Meignier, B. và cộng sự (1987) *J. Infect. Dis.* 155(5):921-930.

Sản xuất hạt virus

Các hạt rAAV có thể được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, các patent 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. Vector AAV được tinh chế và bào chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phương pháp đã biết trong lĩnh vực để sản xuất vector rAAV bao gồm nhưng không giới hạn ở chuyển nhiễm, tạo ra dòng tế bào ổn định, và hệ sản xuất virus lai lây nhiễm mà bao gồm thể lai adenovirus-AAV, thể lai herpesvirus-AAV (Conway, JE và cộng sự, (1997) *J. Virology* 71(11):8780-8789) và thể lai baculovirus-AAV. môi trường sản xuất rAAV để sản xuất hạt virus rAAV đều yêu cầu; 1) tế bào chủ thích hợp, bao gồm, ví dụ, dòng tế bào có nguồn gốc từ người như tế bào HeLa, A549, hoặc 293, hoặc dòng tế bào có nguồn gốc từ côn trùng như SF-9, trong trường hợp hệ sản xuất baculovirus; 2) chức năng virus hỗ trợ thích hợp, được cung cấp bởi adenovirus kiểu dại hoặc đột biến (như adenovirus nhạy cảm nhiệt độ), herpes virus, baculovirus, hoặc cấu trúc plasmid cung cấp chức năng hỗ trợ; 3) Gen rep và cap AAV và sản phẩm gen; 4) axit nucleic (như axit nucleic chữa bệnh) được kẹp bởi ít nhất một trình tự ITR AAV ; và 5) môi trường thích hợp và thành phần của môi trường để hỗ trợ sản xuất AAV. Theo một số phương án, sản phẩm gen rep và cap AAV có thể từ bất kỳ kiểu huyết thanh AAV. Thông thường, nhưng không bắt buộc, sản phẩm gen rep AAV là của cùng kiểu huyết thanh như các ITR của bộ gen vector rAAV cho đến khi sản phẩm gen rep có thể thực hiện chức năng để được sao chép và đóng gói bộ gen rAAV. Môi trường thích hợp đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng để sản xuất vector 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 vector AAV tái tổ hợp. Theo một số phương án, chức năng hỗ trợ AAV được cung cấp bởi adenovirus hoặc HSV. Theo một số phương án, chức năng hỗ trợ AAV được cung cấp bởi baculovirus và tế bào chủ là tế bào côn trùng (ví dụ, tế bào *Spodoptera frugiperda* (Sf9)).

Theo một số phương án, các hạt rAAV có thể được tạo ra bởi phương pháp chuyển nhiễm ba lần, như phương pháp chuyển nhiễm ba lần ví dụ được đề xuất dưới đây. Tóm lại, plasmid chứa gen rep và gen capsid, cùng với plasmid adenovirus trợ giúp, có thể được chuyển

nhễm (ví dụ, sử dụng phương pháp canxi phosphat) vào dòng tế bào (ví dụ, tế bào HEK-293), và virus có thể được gom và tùy ý được tinh chế. Như vậy, theo một số phương án, hạt rAAV được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm ba lần axit nucleic mã hóa vector rAAV, axit nucleic mã hóa rep và cap AAV, và chức năng virus hỗ trợ AAV vào tế bào chủ, trong đó chuyển nhiễm của axit nucleic vào tế bào chủ tạo ra tế bào chủ có khả năng tạo ra các hạt rAAV.

Theo một số phương án, các hạt rAAV có thể được tạo ra bởi phương pháp dòng tế bào sản xuất, như phương pháp dòng tế bào sản xuất ví dụ được đề xuất dưới đây (tham khảo thêm (tham khảo đến Martin và cộng sự, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269). Tóm lại, dòng tế bào (ví dụ, dòng tế bào HeLa) có thể được chuyển nhiễm một cách ổn định với plasmid chứa gen rep, gen capsit, và promoter- trình tự axit nucleic khác loài. Dòng tế bào có thể được sàng lọc để chọn dòng vô tính dẫn cho việc sản xuất rAAV, mà sau đó có thể được mở rộng đến bể phản ứng sinh học sản xuất và được lây nhiễm bằng adenovirus (ví dụ, adenovirus kiểu đại) làm tác nhân hỗ trợ để khởi đầu sản xuất rAAV. Sau đó có thể thu hoạch virus, adenovirus có thể được bất hoạt (ví dụ, bằng nhiệt) và/hoặc được loại ra, và các hạt rAAV có thể được tinh chế. Như vậy, theo một số phương án, hạt rAAV được tạo ra bởi dòng tế bào sản xuất bao gồm một hoặc nhiều trong số axit nucleic mã hóa vector rAAV, axit nucleic mã hóa AAV rep và cap, và axit nucleic mã hóa chức năng virus hỗ trợ AAV.

Theo một số khía cạnh, phương pháp được đề xuất để sản xuất bất kỳ hạt rAAV như được bộc lộ ở đây bao gồm (a) nuôi cấy tế bào dưới các điều kiện mà các hạt rAAV tạo ra, trong đó tế bào chủ bao gồm (i) một hoặc nhiều gen đóng gói AAV, trong đó mỗi gen đóng gói AAV này mã hóa sao chép AAV và/hoặc protein bao trong capsit; (ii) tiền vector rAAV bao gồm axit nucleic mã hóa ARNi theo sáng chế như được mô tả ở đây được kẹp bởi ít nhất một ITR AAV, và (iii) chức năng trợ giúp AAV; và (b) thu hồi các hạt rAAV được tạo ra bởi tế bào chủ. Theo một số phương án, ARNi bao gồm trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO:7. Theo một số phương án, ít nhất một ITR AAV này được chọn từ nhóm bao gồm ITR AAV là AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, ITR kiểu huyết thanh capsit AAV của dê, AAV của bò, hoặc AAV của chuột hoặc tương tự. Theo một số phương án, protein bao trong capsit này được chọn từ nhóm bao gồm AAV1, AAV2, AAV3, AAV4,

AAV5, AAV6 (ví dụ, capsit AAV6 kiểu đại, hoặc capsit AAV6 biến thể như ShH10, như được mô tả trong U.S. PG Pub. 2012/0164106), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9 (ví dụ, capsit AAV9 kiểu đại, hoặc capsit AAV9 cải biến như được mô tả trong U.S. PG Pub. 2013/0323226), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, thể đột biến capsit tyrosin, thể đột biến capsit liên kết heparin, capsit AAV2R471A, capsit AAVAAV2/2-7m8, capsit AAV DJ (ví dụ, capsit AAV-DJ/8, capsit AAV-DJ/9, hoặc capsit bất kỳ khác trong số các capsit được mô tả trong U.S. PG Pub. 2012/0066783), capsit N587 AAV2, capsit E548 AAV2, capsit N708 AAV2, capsit V708K AAV, capsit AAV của dê, capsit khảm AAV1/AAV2, capsit AAV của bò, capsit AAV của chuột, capsit rAAV2/HBoV1, hoặc capsit AAV được mô tả trong Sáng chế Mỹ số 8,283,151 hoặc Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO/2003/042397. Theo một số phương án, protein capsit đột biến duy trì được khả năng tạo thành capsit AAV. Theo một số phương án, protein bao trong capsit là protein capsit đột biến tyrosin AAV5. Theo các phương án khác, hạt rAAV bao gồm các protein capsit của kiểu huyết thanh AAV từ nhánh gai nổi A-F. Theo một số phương án, các hạt rAAV bao gồm capsit của AAV1 và bộ gen tái tổ hợp bao gồm ITR AAV2, ITR AAV2 đột biến và axit nucleic mã hóa ARNi theo sáng chế. 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 can 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 virus hỗ trợ, các thành phần của môi trường, và các chất tương tự.

Nhiều phương pháp là đã biết trong lĩnh vực để sản xuất hạt vector của adenovirus. Ví dụ, đối với vector adenovirus phá hủy bên trong, bộ gen vector adenovirus và bộ gen adenovirus trợ giúp có thể được chuyển nhiễm vào dòng tế bào đóng gói (ví dụ, dòng tế bào 293). Theo một số phương án, bộ gen adenovirus trợ giúp có thể gồm có các vị trí tái tổ hợp kẹp tín hiệu

đóng gói của nó, và cả bộ gen có thể được chuyển nhiễm vào dòng tế bào đóng gói mà biểu hiện recombinaza (ví dụ, hệ Cre/loxP có thể được sử dụng), sao cho vector adenovirut có lợi được đóng gói hiệu quả hơn adenovirut trợ giúp (tham khảo, ví dụ, Alba, R. và cộng sự (2005) *Gene Ther.* 12 Suppl 1:S18-27). Vector adenovirut có thể được thu hoạch và được tinh chế sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn, như các phương pháp được mô tả ở đây.

Nhiều phương pháp là đã biết trong lĩnh vực để sản xuất hạt vector lentivirut. Ví dụ, đối với vector lentivirut thế hệ thứ ba, vector chứa bộ gen lentivirut có lợi với gen gag và pol có thể được đồng chuyển nhiễm vào dòng tế bào đóng gói (ví dụ, dòng tế 293) cùng với vector chứa gen rev. Bộ gen lentivirut có lợi còn gồm có LTR khảm mà khởi động sự phiên mã vắng mặt Tat (tham khảo Dull, T. và cộng sự (1998) *J. Virol.* 72:8463-71). Vector lentivirut có thể được thu hoạch và được tinh chế sử dụng phương pháp (ví dụ, Segura MM, và cộng sự, (2013) *Expert Opin Biol Ther.* 13(7):987-1011) được mô tả ở đây.

Nhiều phương pháp là đã biết trong lĩnh vực để sản xuất hạt HSV. Vector HSV có thể được thu hoạch và được tinh chế sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn, như các phương pháp được mô tả ở đây. Ví dụ, đối với vector HSV sao chép khiếm khuyết, bộ gen HSV có lợi khi thiếu tất cả trong số gen rất sớm (IE) có thể được chuyển nhiễm vào dòng tế bào bổ sung mà đề xuất gen cần để tạo ra virus, như ICP4, ICP27, và ICP0 (tham khảo, ví dụ, Samaniego, L.A. và cộng sự (1998) *J. Virol.* 72:3307-20). HSV vector có thể được thu hoạch và được tinh chế sử dụng phương pháp được mô tả (ví dụ, Goins, WF và cộng sự, (2014) *Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology* 1144:63-79).

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm hạt virus tái tổ hợp bao gồm gen chuyển mã hóa ARNi theo sáng chế và chất mang được dùng. Các được phẩm này có thể thích hợp cho cách thức sử dụng bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này. Được phẩm gồm hạt virus tái tổ hợp bao gồm axit nucleic mã hóa ARNi theo sáng chế có thể được đưa vào não. Ví dụ, hạt virus tái tổ hợp bao gồm axit nucleic mã hóa ARNi theo sáng chế có thể được dùng trong thể vân. Bất kỳ trong số hạt virus tái tổ hợp theo sáng chế có thể được sử dụng, bao gồm hạt rAAV, adenovirut, lentivirut, và HSV.

Theo một số phương án, được phẩm bao gồm hạt virus tái tổ hợp bao gồm gen chuyển mã hóa ARNi theo sáng chế được mô tả ở đây và chất mang được dùng 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 bao gồm rAAV được mô tả ở đây và chất mang được dụng thích hợp để tiêm vào não của động vật có vú (*ví dụ*, dùng trong thể vân). Theo một số phương án, dược phẩm bao gồm hạt lentivirus tái tổ hợp được mô tả ở đây và chất mang được dụng thích hợp để tiêm vào não của động vật có vú (*ví dụ*, dùng trong thể vân). Theo một số phương án, dược phẩm bao gồm hạt adenovirus tái tổ hợp được mô tả ở đây và chất mang được dụng thích hợp để tiêm vào não của động vật có vú (*ví dụ*, dùng trong thể vân). Theo một số phương án, dược phẩm bao gồm hạt HSV tái tổ hợp được mô tả ở đây và chất mang được dụng thích hợp để tiêm vào não của động vật có vú (*ví dụ*, dùng trong thể vân).

Các chất mang được 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 bazơ 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.

Vật phẩm sản xuất và bộ kit

Sáng chế cũng đề xuất bộ kit hoặc vật phẩm sản xuất để sử dụng trong phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Theo các khía cạnh, bộ kit bao gồm chế phẩm được mô tả ở đây (*ví dụ*, hạt virus tái tổ hợp theo sáng chế, như hạt rAAV bao gồm axit nucleic mã hóa ARNi theo sáng chế) trong bao gói thích hợp. Bao gói thích hợp cho chế phẩm (như dùng trong chế phẩm thể vân) được mô tả ở đây là đã biết trong lĩnh vực, và bao gồm, *ví dụ*, lọ (như lọ bịt kín), bình, ống thuốc tiêm, chai, vial, bao gói mềm (*ví dụ*, túi Mylar bịt kín hoặc túi bằng chất dẻo), và tương tự. Các vật phẩm sản xuất có thể còn được vô trùng và/hoặc bịt kín.

Sáng chế cũng đề xuất bộ kit có chứa chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này và có thể còn chứa (các) hướng dẫn về phương pháp sử dụng chế phẩm này, như các cách sử dụng được mô tả trong bản mô tả này. 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. Ví dụ, theo một số phương án, bộ kit bao gồm chế phẩm của hạt virus tái tổ hợp bao gồm gen chuyển mã hóa ARNi theo sáng chế để phân phối ít nhất 1×10^9 bản sao hệ gen vào não của động vật có vú (ví dụ, thông qua việc dùng trong thể vân) cho động vật linh trưởng như được mô tả ở đây, chất mang được dùng thích hợp để tiêm vào não của động vật linh trưởng, và một hoặc nhiều trong số: chất đệm, chất pha loãng, giấy lọc, kim, bơm tiêm, và tờ giấy hướng dẫn thực hiện tiêm vào não of động vật linh trưởng (ví dụ, dùng trong thể vân). Theo một số phương án, bộ kit bao gồm hướng dẫn điều trị bệnh Huntington bằng hạt virus tái tổ hợp được mô tả ở đây. Theo một số phương án, bộ kit bao gồm hướng dẫn sử dụng hạt virus tái tổ hợp được mô tả ở đây theo bất kỳ một trong số các phương pháp được mô tả ở đây.

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 chuyên gia 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: AAV2/1-miARN-Htt làm giảm biểu hiện Htt *in vitro*.

Bệnh Huntington (HD) là bệnh thoái hóa thần kinh di truyền gen trội gây chết người gây ra bởi việc tăng số lượng các gốc polyglutamin trong protein huntingtin (Htt). Với việc xác định cơ sở tiềm tàng của HD, các liệu pháp chữa bệnh được phát triển mà làm giảm biểu hiện của Htt đột biến nguyên nhân. ARN can thiệp (ARNi) mà tìm kiếm để làm giảm chọn lọc biểu hiện của tác nhân gây bệnh này nổi lên là chiến lược chữa bệnh tiềm năng cho bệnh này và các rối loạn tương tự. Để đánh giá giá trị của liệu pháp ARNi trong mô hình chuột mắc

HD, trình tự đích mà thể hiện trước đó là nhắm đích hiệu quả các mARN Htt chuột và người (McBride và cộng sự, (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:5868-5873) được gắn vào mạch chính miARN nhân tạo và được tách dòng vào vector tiền virus.

Phương pháp

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). Chuột được sử dụng bao gồm chuột YAC128 (nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men chứa gen chuyển *HTT* đột biến của người có chiều dài đầy đủ với đoạn lặp 128 CAG trên nền FVB/NJ tinh khiết) và lúa chuột FVB/NJ (Slow và cộng sự, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567; Van Raamsdonk và cộng sự, (2005) *Hum. Mol. Genet.* 3823-3835). Cả hai lúa 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).

Plasmid và vector virus

Để tạo ra vector kiểu huyết thanh AAV2/1 tái tổ hợp mã hóa kẹp tóc trên cơ sở miARN đối lại gen huntingtin (AAV2/1-miARN-Htt), miARN đối với *HTT* của người được tách dòng vào plasmid hình thoi chứa đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR) của AAV, polyA hoocmon tăng trưởng ở bò, và vùng tăng cường virus cự bào 1.6-kb /promoter β -actin (CBA) ở gà. Khung cho miARN là từ bộ kit vector biểu hiện miR ARNi Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA). Vector đối chứng gồm có mạch vector rỗng (AAV2/1-Trống) hoặc biểu hiện protein huỳnh quang màu xanh lá cây cải tiến dưới sự kiểm soát của cùng promoter (AAV2/1-eGFP). Tất cả vector virus được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm plasmid ba lần của các tế bào 293 của người như được mô tả trước đây (Xiao và cộng sự (1998) *J. Virol.* 72:2224-2232), và các tái tổ hợp được tinh chế cột như được mô tả trước đây (Passini và cộng sự, (2001) *J. Virol.* 75:12382-12392). Độ chuẩn thu được của AAV2/1-miARN-Htt được xác định là $4,5 \times 10^{12}$ vg/ml, và độ chuẩn của AAV2/1-Null là $2,3 \times 10^{12}$ vg/ml sử dụng PCR định lượng.

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. Tiêm trong sọ được thực hiện như mô tả trước đây (Treleaven, C.M. và cộng sự (2012) *Mol. Ther.* 20:1713-1723). Tóm lại, 2 μ l vector virus tái tổ hợp (AAV2/1-eGFP hoặc AAV2/1-miARN-Htt) được tiêm vào thể vân (AP, +0,50; ML, $\pm$ 2,00; DV, -2,5 từ thóp và màng cứng; thanh chặn răng cửa, 0,0) sử dụng bơm tiêm Hamilton 10 μ l với tốc độ 0,5 μ l/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. Não được cắt đối xứng dọc dọc theo đường trung tuyến, và bán cầu trái được cố định sau trong 4% paraformaldehyt sau đó 30% sucroza và sau đó cắt thành các phần 20- μ m sử dụng máy điều lạnh. Bán cầu phải được cắt dọc theo trục trán thành các miếng 2-mm sử dụng ma trận não chuột (Harvard Apparatus, Holliston, MA) và sau đó đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và lưu trữ ở -80°C đến khi sử dụng. Để phân tích tập hợp Htt, não được cố định sau trong 4% paraformaldehyt trong 48 h, được rửa bằng PBS, và sau đó được cắt thành các phần trán 40- μ m sử dụng vibratome.

Nuôi cấy và chuyển nhiễm tế bào

Các tế bào HEK293 được lây nhiễm bằng 5×10^9 vg của AAV2/1-eGFP hoặc AAV2/1-miARN-Htt và được thu hoạch 3 ngày sau đó. Đo hàm lượng ARN bằng RT-PCR thời thực định lượng. Tổng ARN được phân lập sử dụng bộ kit TaqMan® Cells-to-CT™ (Ambion). Các phản ứng Q-PCR được thực hiện và phân tích trên thiết bị dò trình tự ABI Prism 7500 (Applied Biosystems) như được mô tả trước đây (Kordasiewicz, H.B. và cộng sự (2012) *Neuron* 74:1031-1044). Các mức biểu hiện được chuẩn hóa đến các mức PPIA (peptidylprolyl isomerase).

PCR thời thực định lượng (TaqMan)

Đo hàm lượng ARN bằng RT-PCR thời thực định lượng. Các mẫu mô não từ tám não 2 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 đại bằng cách sử dụng bộ kit hỗn hợp TaqMan® One-Step RT-PCR Master (Applied Biosystems) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để phát hiện mARN Htt của chuột, bộ dò sau được sử dụng: Mm01213820_m1 (Life Technologies Cat. Số 4,331,182). Để phát hiện mARN Htt của người, các oligos sau đây được sử dụng: 5'- ctccgtccggtagacatgct -3' (đoạn môi xuôi, SEQ ID NO:9); 5'- ggaaatcagaaccctcaaatgg-3' (đoạn môi ngược, SEQ ID NO:10); và 5'- tgagcactgttcaactgtgtgtatcggga-3' (mẫu dò, SEQ ID NO:11). Các phản ứng RT-PCR định lượng được thực hiện và phân tích trên hệ PCR thời gian thực ABI PRISM® 7500 (Applied Biosystems). Các mức biểu hiện của Htt mARN được chuẩn hóa đến các mức mARN hypoxanthin guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt1). Các đường 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. Biểu hiện gen tương đối được thực hiện bằng cách sử dụng đường cong tiêu chuẩn hoặc phương pháp $\Delta\Delta CT$ và chuẩn hóa đến các mức mARN Hprt1.

Kỹ thuật Western Blotting

Các mô được đồng nhất ở nồng độ cuối bằng 50 mg/ml trong đệm ly giải T-Per (Pierce) và chứa hỗn hợp ức chế proteaza toàn bộ (Roche). Dịch đồng nhất được làm sạch bằng ly tâm ở $10,000 \times g$ trong 6 phút ở 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 nitrocellulose. 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.

Phân tích tế bào theo dòng chảy và phân loại tế bào (phân loại tế bào FCM)

Huyền phù tế bào đơn được phân tích và phân lập sử dụng thiết bị phân loại tế bào FACS Aria II (BD Biosciences San Jose, CA) với ống 100 μm ở Genzyme Flow Cytometry Core Facility (công ty Sanofi). Phân tích các tế bào được thực hiện bằng cách phân biệt các tế bào đơn sống từ mảnh vụn bằng cách phát hiện trên tán xạ góc hẹp (FWD-Sc) và tán xạ bên (SSC). Các tế bào dương EGFP được gom bằng thiết bị dò E với thiết bị lọc 530/30 BP 505LP. Đặc điểm dữ liệu huỳnh quang EGFP được hiển thị là biểu đồ huỳnh quang thông số đơn và quyết định phân loại là dựa trên EGFP⁻ và EGFP⁺. Các tế bào được phân loại được gom trong môi trường nuôi cấy mô chứa 5% huyết thanh thai bò và được rải lên các bản kính hiển vi chia khoang 4 giếng (LabTek, Nalge Nunc International, Naperville, Ill) với nồng độ bằng 50 000 tế bào/giếng.

Hóa mô miễn dịch

Các phần vibratome được xử lý để nhuộm màu miễn dịch bằng EM48, kháng thể mà nhận diện ưu tiên huntingtin được tập hợp (Gutekunst và cộng sự, (1999) *J. Neurosci.* 19:2522-2534). Các phần nổi tự do đầu tiên được xử lý bằng Khối enzym nội sinh kép (Dako) trong 30 phút để chặn hoạt tính peroxidaza nội sinh. Sau đó chúng được rửa bằng 0,01 M PBS (3 phút) tiếp theo rửa ba lần với 0,5% Triton X-100 trong PBS 10 phút mỗi lần. Vị trí không đặc hiệu được chặn bằng cách ủ các phần trong Rodent Block M trong 1 h ở nhiệt độ phòng. Các phần được dò bằng kháng thể EM48 (Millipore, dịch pha loãng 1:25 trong PBS) bằng cách ủ ở phòng lạnh 4°C trên miếng gỗ cong nhẹ qua đêm. Ngày tiếp theo, các phần được ủ bằng kháng thể thứ cấp (MM HRP Polymer, Biocare Medical) trong 1 h ở nhiệt độ phòng trên miếng gỗ cong. Sau ba lần rửa trong PBS 15 phút mỗi lần tín hiệu được phát hiện sử dụng bộ kit nền DAB Peroxidaza (Vector). Sau khi rửa, các phần được gắn lên Superfrost cộng miếng kính trên kính hiển vi, được làm khô qua đêm và cửa sổ bảo vệ với môi trường gắn Acrytol.

Phân tích hành vi

Thử nghiệm cần quay đầy nhanh: Phối hợp vận động và học vận động được đánh giá trên thiết bị quay cần đầy nhanh (AccuScan Instruments). Chuột được đào tạo trên cần quay với ba thử nghiệm mỗi ngày trong 3 ngày liên tiếp. Vào ngày đào tạo thứ nhất, cần quay được cài đặt để đầy nhanh từ 0 đến 5 RPM trong 300 giây. Chuột mà rơi khỏi cần trước khi hết

khoảng thời gian 300 giây được đặt lại lên cần đến khi thời gian đủ 300 kết thúc. Vào ngày đào tạo thứ hai và thứ ba, cần quay được cài đặt để chạy nhanh từ 0 đến 40 RPM trong 300 giây, lại cần tắt cả chuột để hoàn thành đủ 300 giây trên cần. Vào ngày thứ tư (ngày thử), chuột được đặt lên cần quay được cài đặt để chạy nhanh từ 0 đến 40 RPM trong 300 giây. Các động vật không được đặt lại khi rơi, và thời gian đợi đến rơi được ghi qua 3 thử nghiệm. Thời gian đợi đến rơi được xác định bởi thời gian trôi qua đến khi động vật rơi khỏi cần quay.

Thử nghiệm bơi cưỡng bức: Sự bất động trong Thử nghiệm bơi cưỡng bức được sử dụng làm thước đo chứng trầm cảm ở động vật gặm nhấm (Porsolt và cộng sự, (1977) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 229:327-336, Cryan và cộng sự., (2002a) *Trends Pharmacol. Sci.* 23:238-245, Cryan và cộng sự., (2002b) *Eur. J. Pharmacol.* 436:197-205). Thử nghiệm được thực hiện bằng cách đặt chuột trong các trụ thủy tinh riêng (chiều cao 20 cm × đường kính 10 cm) nạp đầy nước ở 23°C đến chiều cao 15 cm. Chuột được đặt vào các trụ trong khoảng thời gian 7 phút. 3 phút đầu của thời gian này được xem là thời gian thích nghi, trong khoảng thời gian đó không có dữ liệu được gom. Trong suốt 4 phút còn lại của giai đoạn thử, năng lực của chuột được cho điểm bởi thiết bị quan sát được che sử dụng kỹ thuật tạo mẫu thời gian để đánh giá hành vi nổi trội sau các khoảng thời gian 10 giây. Hành vi bơi và đứng im được đánh giá và ghi lại ở cuối mỗi 10 giây, mà tạo ra 24 điểm dữ liệu mỗi thử nghiệm. Phần trăm thời gian tiêu thụ ở trạng thái đứng im được tính cho mỗi chuột.

Thống kê

Các giá trị trung bình được sử dụng để phân tích thống kê. Dữ liệu được biểu diễn dưới dạng $\pm$ 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 hướng được dùng sau thử nghiệm kiểm định sau đa Tukey (Prism GraphPad). $p < 0,05$ được coi là khác biệt đáng kể về thống kê.

Kết quả

Plasmid được thiết kế để biểu hiện Htt nhắm đích miARN và gen báo cáo GFP tăng cường (eGFP) dưới sự kiểm soát phiên mã của promoter beta-actin (CBA) ở gà (pSP70-CBA-EGFP) như được minh họa trên **HÌNH 1A**. Trình tự nhắm đích ứng viên, mà được chọn từ vùng mã hóa htt, là 5'- TAGACAATGATTCACACGGT -3' (SEQ ID NO: 4). Vector kiểu

huyết thanh AAV2/1 tái tổ hợp độ chuẩn cao mã hóa trình tự đích (AAV2/1-miARN-Htt) và vector đối chứng (AAV2/1-eGFP và AAV2/1-trống) được tạo ra và khả năng làm câm gen của chúng được thử bằng cách lây nhiễm tế bào 293 thận phôi (HEK). Các tế bào được lây nhiễm với 5×10^9 vg vector AAV. Sử dụng phân tích phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS) xác nhận rằng liều dùng này tạo ra nhiều hơn 90% hiệu quả lây nhiễm trong tế bào HEK293 sau khi lây nhiễm với AAV-eGFP-miARN-HTT (**HÌNH 2A-D**). Các tế bào lây nhiễm bằng AAV2/1-eGFP không thể hiện bất kỳ sự giảm các mức Htt nội sinh khi được phân tích bằng PCR thời gian thực ở 3 ngày sau lây nhiễm; tuy nhiên, các tế bào được lây nhiễm bằng AAV2/1-miARN-Htt thể hiện khoảng 40% giảm mức Htt mRNA (**HÌNH 1B**).

Ví dụ 2: Tiêm AAV2/1-miARN-Htt vào chuột YAC128 tạo ra sự chuyển nạp thể vân rộng rãi và làm giảm Htt mRNA.

Sau khi kiểm tra khả năng của AAV2/1-miARN-Htt kìm hãm các mức Htt mRNA *in vitro*, khả năng của vector này làm câm biểu hiện Htt trong thể vân của chuột YAC128 được đánh giá. Để xác định phần trăm chuyển nạp của các tế bào trong thể vân sau khi tiêm trong thể vân AAV2/1-miARN-Htt, phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS) được dùng theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1.

Kết quả

Chuột YAC128 trưởng thành nhận dịch tiêm trong thể vân song song gồm AAV2/1-eGFP-miARN-Htt ($4,5 \times 10^{12}$ vg/ml) hoặc vector đối chứng, AAV2/1-eGFP ($5,6 \times 10^{12}$ vg/ml). Một tháng sau khi tiêm vùng vân của mỗi động vật được vi cắt và các tế bào chứa eGFP- với không chứa eGFP được phân loại và định lượng bằng cách phân tích FACS (**HÌNH 3A&B**). Dữ liệu thể hiện rằng nhiều hơn 80% thể vân được chuyển đổi bởi vector như được chứng minh bởi sự có mặt của eGFP trong đa số tế bào vân được phân loại (**HÌNH 3C**).

Để đánh giá khả năng của vector làm giảm Htt *trong cơ thể* và phát hiện sự trưởng thọ của đáp ứng, chuột trưởng thành nhận dịch tiêm trong vân song song gồm AAV2/1-miARN-Htt ($4,5E12$ vg/ml) (N=16, N=8+8 mỗi thời điểm) hoặc vector đối chứng AAV2/1-trống ($2,3E12$ vg/ml) (N=8), và não được phân tích 1 hoặc 5 tháng sau xử lý. Phân tích hiển vi huỳnh quang của các phần não từ chuột được điều trị bằng AAV2/1-miARN-Htt ở cả hai thời điểm thể hiện huỳnh quang eGFP qua toàn bộ thể vân và vùng não xung quanh, thống nhất

với phân tích FACS giả thuyết việc chuyển nạp vẫn gần như hoàn toàn (**HÌNH 3D**). Các mức biểu hiện eGFP trong não của chuột đạt đến 1 tháng sau xử lý thể hiện không giảm ở thời điểm 5 tháng (**HÌNH 3D**). Các mức vẫn của mARN Htt đột biến ở người giảm đáng kể ở chuột được tiêm AAV2/1-miARN-Htt khi so với đối chứng được xử lý AAV2/1-trống và mức độ giảm tương đương (xấp xỉ 45%, $p < 0,01$) được lưu ý ở cả hai thời điểm (**HÌNH 3E**). Các mức vẫn của mARN Htt nội sinh của chuột giảm đáng kể sau AAV2/1-miARN-Htt khi so với đối chứng được xử lý AAV2/1-Trống. Mức độ giảm tương đương (xấp xỉ 45%, $p < 0,01$) được lưu ý ở cả hai thời điểm (**HÌNH 4**).

Ví dụ 3: Tiêm AAV2/1-miARN-Htt vào chuột YAC128 không gây độc tố rõ ràng trong não.

Để xác định xem việc tiêm AAV2/1-miARN-Htt và việc giảm độc tố thần kinh do Htt và viêm, hình thái tế bào và tính nguyên trạng của phần thể vân tạo thành được đánh giá bằng cách nhuộm màu hematoxylin và eosin (H&E) theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1. Các mức của protein axit sợi tế bào thần kinh đệm hướng tâm của chất đánh dấu viêm thần kinh (GFAP, chất đánh dấu của tế bào hình sao) và Iba-1 (chất đánh dấu của tiểu thần kinh đệm) cũng được đánh giá ở 1 và 5 tháng sau xử lý.

Kết quả

Phân tích bởi H&E thể hiện không có thay đổi mô bệnh học đáng kể trong vùng não được tiêm (**HÌNH 5A-C**). Không có sự tăng đáng kể về số lượng tế bào hình sao dương GFAP (được quan sát bằng hóa mô miễn dịch) hoặc các mức mARN GFAP (được định lượng bằng QPCR) được quan sát trong các vùng được tiêm ở 1 hoặc 5 tháng sau tiêm khi so với các động vật được xử lý AAV2/1-trống (**HÌNH 5D-F; HÌNH 5J**). Tuy nhiên, việc tăng số lượng tiểu thần kinh đệm hoạt hóa, được minh chứng bởi sự tăng nhuộm miễn dịch Iba-1 (**HÌNH 5H**) và các mức Iba-1 mARN trong thể vân được lưu ý ở 1 tháng sau tiêm (**HÌNH 5K**). Thú vị là, ở 5 tháng sau tiêm, hoạt hóa tiểu thần kinh đệm quay về mức đối chứng (**HÌNH 5I&5K**), cho rằng đáp ứng là tạm thời. không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, vì vector đối chứng AAV2/1-trống được dùng trong nghiên cứu này không dùng gen eGFP, hiểu rằng biểu hiện của eGFP từ AAV2/1-miARN-Htt có thể đáp ứng đối với hoạt hóa tiểu thần kinh đệm tạm thời.

Cùng với nhau, các kết quả này chứng minh và mở rộng khám phá rằng AAV2/1-miARN-Htt có khả năng trung gian làm câm Htt duy trì không chỉ *in vitro* mà cả trong thể vân của chuột YAC128. Hơn nữa, biểu hiện một phần các mức Htt trong khoảng thời gian lên đến 5 tháng không dẫn đến độc tố rõ ràng hoặc viêm thần kinh trong não chuột.

Ví dụ 4: Phân phối AAV2/1-miARN-Htt thể vân hiệu chỉnh các đặc điểm hành vi sai lệch và hóa học thần kinh ở chuột YAC128.

Tác động của việc làm giảm được trung gian AAV của các mức htt đột biến lên thiếu hụt phenotyp rất đặc trưng mà có mặt ở mô hình chuột YAC128 mắc HD cũng được đánh giá theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1. Chuột YAC128 được báo cáo thể hiện thiếu hụt phối hợp vận động (mà có thể được bộc lộ sử dụng thử nghiệm cần quay) và phenotyp suy nhược (sử dụng thử nghiệm bơi cưỡng bức) bắt đầu ở 3 tháng tuổi (Slow và cộng sự, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567; Van Raamsdonk và cộng sự, (2007) *Neurobiol Dis* 26:189-200).

Kết quả

Lúa chuột YAC128 ngang tuổi (2 tháng tuổi) và kiểu đại nhận dịch tiêm trong vân song song gồm AAV2/1-miARN-Htt hoặc vector AAV2/1-trống và sau đó được gây chết 3 tháng sau xử lý (**HÌNH 6A**). Như mong đợi, phân tích các phần não chứng minh biểu hiện eGFP qua toàn bộ thể vân và các vùng xung quanh, như được quan sát trước đây (**HÌNH 6B**). Phân tích Western blot dịch đồng chất não thể hiện các mức của cả protein Htt nội sinh của người và chuột giảm đáng kể trong vân của chuột YAC128 được tiêm AAV2/1-miARN-Htt và chuột kiểu đại (xấp xỉ 55% giảm, $p < 0,01$) khi so với đối chứng được xử lý AAV2/1-trống (**HÌNH 6C&D**). Phân tích PCR định lượng thời gian thực chỉ ra rằng cũng đạt được sự giảm bằng nhau về các mức mRNA.

Thử nghiệm cần quay của chuột YAC128 được xử lý AAV2/1-trống ở 2 tháng sau tiêm thể hiện thiếu hụt phối hợp vận động đáng kể khi so với các lúa kiểu đại được xử lý AAV2/1-trống hoặc AAV2/1-miARN-Htt (ANOVA, $p < 0,01$) (**HÌNH 6E**). Tuy nhiên, chuột YAC128 that mà được xử lý bằng AAV2/1-miARN-Htt thể hiện các mức năng lực mà không phân biệt với của chuột kiểu đại (ANOVA, Kiểm định sau Tukey; WT Htt với YAC128 Htt, $p = \text{NS}$; WT trống với YAC128 trống, $p < 0,05$). Vì vậy, việc hạ thấp một phần các mức htt đột biến là đủ

để hiệu chỉnh thiếu hụt vận động của chuột YAC128. Không có sự khác biệt đáng kể về năng lực cân quay giữa chuột kiểu đại nhận AAV2/1-miARN-Htt và chuột kiểu đại nhận AAV2/1-trống.

Báo cáo trước đây chỉ ra rằng chuột YAC128 (bắt đầu ở 3 tháng tuổi) thể hiện phenotyp suy giảm mà có thể được phát hiện sử dụng thử nghiệm bơi cưỡng bức (Pouladi và cộng sự, (2009) *Brain* 132:919-932). Các động vật dường như biểu hiện trạng thái suy giảm nếu chúng bất động trong khoảng thời gian kéo dài khi đặt vào thùng chứa nước. Sử dụng thử nghiệm tốc độ bơi cơ bản (trong đó thời gian đợi bơi đạt bề được đánh giá) tác giả sáng chế chứng minh rằng phenotyp suy giảm này trong thử nghiệm bơi cưỡng bức không liên quan đến khả năng bơi của chuột YAC128 và độc lập với thiếu hụt phối hợp vận động đã biết thấy ở mô hình này (Pouladi và cộng sự, (2009) *Brain* 132:919-932). Lứa chuột YAC128 hai tháng tuổi và WT được tiêm bằng AAV2/1-miARN-Htt- hoặc vector AAV2/1-trống và được thử 3 tháng sau đó trong thử nghiệm bơi cưỡng bức. Chuột YAC128 không được xử lý thể hiện khoảng thời gian tăng ở trạng thái bất động khi so với chuột YAC được xử lý AAV2/1-miARN-Htt hoặc động vật kiểu đại được xử lý AAV2/1-trống (HÌNH 6F; ANOVA $p<0,05$). Một lần nữa, không có khác biệt đáng kể về năng lực của chuột kiểu đại nhận AAV2/1-miARN-Htt hoặc AAV2/1-trống. Chuột YAC128 được tiêm bằng AAV2/1-miARN-Htt mất ít hơn đáng kể thời gian trong trạng thái bất động so với các đối chứng được xử lý AAV2/1-trống. Thật vậy, năng lực của chuột YAC128 được xử lý AAV2/1-miARN-Htt tương tự như năng lực của cùng lứa kiểu đại của chúng, đề xuất sự hiệu chỉnh gần như hoàn toàn của phenotyp sai lệch này (ANOVA, Kiểm định sau Tukey; YAC Htt với YAC trống, $p<0,05$) (HÌNH 6F).

Ví dụ 5: Xử lý sử dụng AAV2/1-miARN-Htt hiệu chỉnh một phần rối loạn phiên mã của thụ thể DARPP-32 và D1 ở chuột YAC128.

Rối loạn phiên mã của nhiều gen được làm giàu trong thể vân được thấy ở não HD (Richfiel và cộng sự, (1995) *Ann. Neurol.* 37:335-343; Augood và cộng sự, (1997) *Ann. Neurol.* 42:215-221; Sugars và cộng sự, (2004) *J. Biol. Chem.* 279:4988-4999; Desplats và cộng sự, (2006) *J. Neurochem.* 96:743-757). Sự rối loạn này cũng rõ ràng ở chuột YAC128, như được minh họa, cụ thể, bởi các mức vân thấp đáng kể của thụ thể dopamin DARPP-32 và D1 so với của các động vật kiểu đại (Pouladi và cộng sự., (2012) *Mol. Genet.* 21:2219-

2232). Để xác định xem việc tìm kiếm các mức Htt ở chuột YAC128 được hiệu chỉnh đặc điểm phiên mã thay đổi này, phân tích PCR định lượng thời gian thực được thực hiện trên mô vụn của chuột YAC128 mà được xử lý ở 2 tháng tuổi bằng AAV2/1-miARN-Htt và được phân tích 3 tháng sau đó theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1.

Kết quả

Phân tích chiết xuất não của chuột YAC 128 được xử lý AAV2/1-trống chỉ ra rằng các mức mRNA của thụ thể dopamin DARPP-32 và D1 (D1R) thấp hơn đáng kể khi so với các đối chứng kiểu đại cùng tuổi (ANOVA, Kiểm định sau Tukey; WT trống với YAC128 trống, $p<0,05$) (**HÌNH 7A&B**). Chuột YAC128 được cho dùng AAV2/1-miARN-Htt thể hiện mức DARPP-32 và D1R mRNA cao hơn chuột được xử lý bằng vector AAV2/1-trống; tuy nhiên, các mức này vẫn thấp hơn mức thấy ở đối chứng kiểu đại (ANOVA, Kiểm định sau Tukey; WT Trống đối với YAC Htt, $p=NS$). Do đó, việc giảm mức Htt được trung gian AAV2/1-miARN-Htt ở chuột YAC128 tạo ra hiệu chỉnh một phần đặc điểm phiên mã vụn sai lệch. Có thể đánh giá ở các thời điểm sau (nhiều hơn 5 tháng sau xử lý) có thể thấy hiệu chỉnh đầy đủ hơn của các đặc điểm sai lệch này.

Cùng nhau, các kết quả này chứng minh các phát hiện *in vitro* và *trong cơ thể* trước đây rằng AAV2/1-miARN-Htt có khả năng trung gian cho việc hạ thấp mức Htt duy trì. Quan trọng là, chứng minh rằng điều này làm giảm mức Htt vụn ở chuột YAC 128 tạo ra cải thiện đáng kể về chức năng vận động và hành vi cũng như hiệu chỉnh một phần rối loạn phiên mã đã xác định trong thể vụn.

Ví dụ 6: Phân phối thể vụn AAV2/1-miARN-Htt làm giảm tập hợp Htt trong não của chuột YAC128.

Việc xuất hiện tập hợp Htt và thể vùi trong CNS là dấu xác nhận bệnh học thần kinh của HD. Làm giảm các mức của tập hợp này trong chuột HD được liên hệ với cải tiến đáng chú ý về bệnh lý (Harper và cộng sự, (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5820-5825; Rodriguez-Lebron và cộng sự, (2005) *Mol. Ther.* 12:618-633). Mô hình chuột YAC128 thể hiện về báo cáo tích tụ đáng kể và lan rộng tập hợp Htt trong thể vụn ở 12 tháng tuổi (Slow và cộng sự, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567, Pouladi và cộng sự, (2012) *Hum. Mol.*

Genet. 21:2219-2232). Tác động của việc phân phối AAV2/1-miARN-Htt lên tập hợp Htt trong chuột YAC128 được đánh giá theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1.

Kết quả

Nhuộm màu hóa mô miễn dịch của các phần não của chuột YAC128 6, 9, và 24 tháng tuổi sử dụng kháng thể kháng Htt EM48 thể hiện bằng chứng của các tập hợp trong cả thể vân và vỏ não ngay từ 6 tháng tuổi tiến triển theo thời gian (**HÌNH 8A**). Mô mười hai tuần tuổi (các phần đông lạnh 16 micron) cũng được phân tích và thể hiện là có phạm vi tương đương của tập hợp như tập hợp 24 tháng tuổi; tuy nhiên, nhuộm màu nền không đặc hiệu trong phần đông lạnh cao hơn đáng kể về phần vibratome (dữ liệu không được thể hiện).

Để xác định xem việc làm giảm trung gian AAV của các mức htt đột biến thấp hơn phạm vi tích tụ của tập hợp Htt trong não của chuột YAC128 sau triệu chứng (7 tháng tuổi) và, đến lượt nó, hiệu chỉnh sự thiếu hụt vận động và hành vi, chuột được tiêm trong thể vân song song AAV2/1-miARN-Htt hoặc AAV2/1-GFP. Động vật được đưa vào thử trên cân quay ở 3 tháng sau tiêm (động vật 10 tháng tuổi) và được gây chết ở 5 tháng sau tiêm (khi chuột 12 tháng tuổi) (**HÌNH 8B**). Chuột YAC128 được xử lý AAV2/1-miARN-Htt trên cân quay thể hiện mức năng lực so sánh được với mức của lứa tuổi đại của chúng (**HÌNH 8C**; ANOVA, Kiểm định sau Tukey; $p=NS$). Tuy nhiên, các kết quả này không đạt thống kê đáng kể do số lượng ít chuột được sử dụng trong nghiên cứu ($N=4$ WT; $N=6$ YAC128). Nhuộm màu hóa mô miễn dịch của phần thể vân sử dụng kháng thể EM48 thể hiện sự có mặt của tổ hợp Htt ít hơn đáng kể ở chuột YAC128 được xử lý AAV2/1-miARN-Htt so với chuột YAC128 được xử lý AAV2/1-GFP (**HÌNH 8D**). Não của chuột YAC128 được xử lý AAV-miARN-Htt chủ yếu không phân biệt được với não của chuột kiểu đại.

Để xác nhận rằng việc làm giảm tập hợp quan sát được bằng AAV2/1-miARN-Htt không phải do mất noron hoặc tính độc hại thần kinh tiềm năng, nhuộm màu H&E cũng như nhuộm màu hóa mô miễn dịch đối với NeuN (chất đánh dấu noron), GFAP (chất đánh dấu hình sao), và Iba1 (chất đánh dấu tiểu thần kinh đệm) được thực hiện trên các phần não đối xứng dọc liên kề. So với đối chứng không tiêm AAV-2/1, động vật tiêm AAV2/1-miARN-Htt thể hiện cùng nhiều noron NeuN-dương trong thể vân bởi kính hiển vi huỳnh quang. Sử dụng kính hiển vi ánh sáng, việc nhuộm màu H&E của các phần não trán liên kề cũng xuất

hiện bình thường và tạo ra bằng chứng hỗ trợ của việc không có sự mất noron này; tuy nhiên, do lý thuyết âm thanh nổi không được thực hiện, các kết quả này không thể định lượng được. Ngoài ra, như thấy trong các nghiên cứu trước đây, việc tăng về nhuộm màu GFAP hoặc Iba-1 trong chuột được xử lý AAV2/1-miARN-Htt ở 5 tháng sau tiêm không được phát hiện.

Kết luận

Nghiên cứu hiện tại thể hiện rằng việc hạ thấp mức Htt đột biến là chiến lược chữa bệnh cho HD và chứng minh rằng làm giảm một phần htt đột biến trong thể vân tạo ra cải thiện hành vi, sinh hóa, và bệnh học thần kinh trong mô hình chuột chuyển gen chiều dài đầy đủ mắc HD, mô hình chuột YAC128. Nỗ lực trước đây ở ước lượng chiến lược chữa bệnh này được thực hiện trên mô hình chuột chứa các mảnh gen *HTT* đột biến, như chuột HD R6/1 và N171-82Q (Harper và cộng sự., (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5820-5825, Rodriguez-Lebron và cộng sự, (2005) *Mol. Ther.* 12:618-633, Machida và cộng sự, (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:190-197). Giảm một phần mức Htt đột biến tạo ra lợi ích sống sót khiêm tốn trong một số trong các mô hình trầm trọng hơn, như mô hình chuột mắc HD N171-82Q HD, nhưng không trong các mô hình khác (ví dụ, mô hình chuột R6/1) (Harper và cộng sự., (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5820-5825, Rodriguez-Lebron và cộng sự, (2005) *Mol. Ther.* 12:618-633, Machida và cộng sự., (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:190-197). Cải thiện vận động được lưu ý ở các nghiên cứu này sử dụng thử nghiệm cân quay và chiều dài bước chân; tuy nhiên, độ trầm trọng của các mô hình này loại trừ đánh giá dài hạn của thử nghiệm về sai lệch hành vi, bệnh học thần kinh, và sinh hóa.

Nghiên cứu hiện tại sử dụng mô hình chuột YAC128 (mô hình này sử dụng gen *HTT* đột biến của người chứa đoạn lặp 128 CAG), mà phát hiện bất thường vận động tiến triển và bệnh lý thần kinh phụ thuộc độ tuổi. So với các mô hình chuột HD khác, chuột YAC128 rất thích hợp để thử nghiệm tính hiệu quả chữa bệnh vì chúng tóm lại các đặc điểm gen lỗi và lâm sàng của bệnh ở người. Lịch sử tự nhiên của các thay đổi liên quan đến bệnh ở chuột YAC128 là đã xác định, và các động vật thể hiện về phenotyp các đặc điểm bệnh đồng nhất mà có tính biến động thấp giữa các động vật. Chuột YAC128 phát triển đặc điểm phiên mã vân thay đổi, đặc điểm mà không thấy ở các mô hình chuột tương tự, như chuột HD BAC (Pouladi và cộng sự, (2012) *Hum. Mol. Genet.* 21:2219-2232), và thể hiện thoái hóa thần kinh vân phụ thuộc độ tuổi. Như vậy, thử nghiệm can thiệp chữa bệnh và đánh giá đầu ra trong mô

hình này có thể có giá trị dự báo hơn đối với dịch mã lâm sàng (Slow và cộng sự, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567).

Sử dụng chuột YAC128, các nghiên cứu này chứng minh rằng biểu hiện được trung gian AAV2/1 của miARN nhắm đích Htt đột biến của người dẫn đến giảm đáng kể về các mức vận của mARN và protein Htt. Liên quan đến việc hạ thấp toàn bộ sự khó chịu này là cải thiện đáng kể chức năng như được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm cân quay và thử nghiệm bơi cưỡng bức ở 5 tháng sau xử lý cũng như giảm đáng kể tập hợp Htt trong thể vận. Đáng chú ý là mức giảm Htt quan sát được trong các nghiên cứu này chỉ xấp xỉ 40% đối chứng, chỉ ra rằng việc giảm một phần htt đột biến đủ để tạo ra lợi ích chữa bệnh đáng kể trong mô hình chuột này. Hơn nữa, 80% chuyển tính trạng của thể vận với vectơ AAV chỉ dẫn đến giảm Htt một phần. Hiện tượng tương tự được thấy trong tế bào HEK293 trong nuôi cấy trong đó xấp xỉ 90-95% hiệu quả chuyển nạp chỉ thu được 40-50% giảm tạo thành về mức Htt nội sinh (xem **HÌNH 2A-D**). Phát hiện thống nhất với nghiên cứu trước đây ở động vật gặm nhấm và động vật linh trưởng chỉ thể hiện giảm một phần mức Htt sử dụng các chiến lược so sánh được của việc làm câm trên cơ sở miARN (McBride và cộng sự, (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:5868-5873; Boudreau và cộng sự., (2009b) *Mol. Ther.* 17:1053-1063; McBride và cộng sự., (2011) *Mol. Ther.* 19:2152-2162; Grondin và cộng sự., (2012) *Brain* 135:1197-1209). Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, có nhiều giả thuyết tiềm năng về việc tại sao miARN chỉ tạo ra sự đánh bại đích một phần trong vùng được chuyển nạp. Định dạng thân-vòng miARN dùng để trung gian làm câm Htt cần xử lý bằng tế bào trước khi tạo ra các ARN can thiệp chức năng nhỏ. Do đó, yêu cầu này đối với xử lý tế bào có thể tạo ra giới hạn tự nhiên về phạm vi làm câm ARN được phổ biến bởi kẹp tóc trên cơ sở miARN. Báo cáo bởi Boudreau và cộng sự (Boudreau và cộng sự, (2009a) *Mol. Ther.* 17:169-175) mô tả tính an toàn cải thiện của cơ sở dựa trên miARN cho việc làm câm chữa bệnh ở não động vật có vú và nhấn mạnh đặc điểm độc tố cải thiện của các miARN so với cấu trúc kẹp tóc ngắn truyền thống. Việc cải thiện về tính an toàn này có thể là do sự tin cậy của miARN trên cơ chế xử lý tế bào nội sinh (Boudreau và cộng sự, (2009a) *Mol. Ther.* 17:169-175). Bất kể các giả thuyết đưa ra, vẫn chưa biết về cơ chế chính xác bên cạnh việc làm câm Htt dựa trên miARN trong não; tuy nhiên dữ liệu được thể hiện ở đây chứng minh rằng việc giảm Htt một phần có thể đạt được lợi ích chữa bệnh, ít nhất ở mô hình chuột mắc HD.

Do vai trò chức năng của Htt vẫn không rõ ràng, có sự quan tâm hiển nhiên liên quan đến việc triển khai chiến lược chữa bệnh mà tạo ra việc làm câm đặc hiệu không alen. Nghiên cứu được bộc lộ ở đây chỉ ra rằng việc giảm một phần Htt của chuột nội sinh trong CNS của chuột kiểu đại, cũng như chuột YAC128 mắc bệnh, trong khoảng thời gian lên đến 5 tháng là chịu tốt. Việc dùng AAV-miARN-Htt làm giảm Htt đột biến ở chuột kiểu đại và ở người xấp xỉ 40%, do đó cho phép bảo quản ít nhất 60 % mức Htt kiểu đại trong khi vẫn duy trì hiệu quả chữa bệnh của việc làm câm Htt độc đột biến. Không quan sát thấy độc tố rõ ràng hoặc hành vi sai lệch. Dữ liệu hiện tại thống nhất với các nghiên cứu trước đó thể hiện cùng thiếu độc tố sau khi làm câm Htt không đặc hiệu alen ở chuột mắc HD và chuột kiểu đại trong khoảng thời gian lên đến 9 tháng sau xử lý (Boudreau và cộng sự, (2009b) *Mol. Ther.* 17:1053-1063). Tính an toàn của kỹ chế một phần Htt kiểu đại cũng đã được báo cáo ở động vật linh trưởng không phải người (McBride và cộng sự, (2011) *Mol. Ther.* 19:2152-2162; Grondin và cộng sự, (2012) *Brain* 135:1197-1209), tạo ra thêm tin tưởng rằng giảm một phần mức Htt bình thường không thể dẫn đến hậu quả thiệt hại đáng kể. Nghiên cứu này còn chứng minh rằng giảm một phần (~40%) cả Htt đột biến và kiểu đại ở chuột YAC128 là chữa bệnh, như được chứng minh bởi năng lực của chúng ở nhiều thử nghiệm hành vi và không liên quan đến bất kỳ vấn đề phụ hiển nhiên. Báo cáo trước đây đề xuất vai trò cho Htt trong phát sinh phôi và phát sinh thần kinh sau sinh (Bhide và cộng sự, (1996) *J. Neurosci.* 16:5523-5535; Reiner và cộng sự, (2003) *Mol. Neurobiol.* 28:259-276; Cattaneo và cộng sự, (2005) *Nat. Rev. Neurosci.* 6:919-930). Tuy nhiên, đến nay một số nghiên cứu tiền lâm sàng thể hiện rằng việc làm giảm một phần mức Htt kiểu đại ở não trưởng thành, xuất hiện sự chịu tốt ở cả chuột và động vật linh trưởng không phải người (Boudreau và cộng sự, (2009b) *Mol. Ther.* 17:1053-1063; McBride và cộng sự, (2011) *Mol. Ther.* 19:2152-2162; Grondin và cộng sự, (2012) *Brain* 135:1197-1209).

Dấu xác nhận tiêu chuẩn đáng chú ý của bệnh lý HD ở cả mô hình chuột và bệnh nhân là người có mặt của tập hợp Htt đột biến-phản ứng miễn dịch (IR) (DiFiglia và cộng sự, (1997) *Science* 277:1990-1993; Scherzinger và cộng sự, (1997) *Cell* 90:549-558). Vai trò chính xác của tập hợp trong thác sự kiện sinh lý bệnh học ở HD tiếp tục là vấn đề tranh cãi (Lansbury và cộng sự, (2006) *Nature* 443:774-779) và đề xuất về mối quan hệ nhân quả giữa tập hợp Htt đột biến và bệnh vẫn còn tranh luận (Bates, (2003) *Lancet* 361:1642-1644; Arrasate và

cộng sự, (2004) *Nature* 431:805-810). Tuy nhiên, có sự nhất trí rằng việc hình thành tập hợp protein không tan tạo ra gánh nặng tăng đối với quá trình suy biến tế bào (Yamamoto và *cộng sự*, (2000) *Cell* 101:57-66). Các nghiên cứu bộc lộ ở đây chứng minh rằng chuột YAC128 thể hiện tập hợp vôn rộng rãi ngay từ 6 tháng tuổi (sớm hơn báo cáo trước đây) và việc tiêm AAV2/1-miARN-Htt ở 7 tháng tuổi (sau khi tập hợp đã tạo thành) làm giảm đáng kể số lượng tập hợp Htt dương EM48 trong thể vôn đến mức gần như kiểu đại. Các dữ liệu này đề xuất, không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, rằng xử lý AAV2/1-miARN-Htt có thể giảm bớt bề chứa sẵn có của Htt, làm giảm đáng kể gánh nặng của các tập hợp htt đột biến và do đó góp phần tiềm năng vào cải thiện chức năng chỉ ra trong mô hình chuột này.

Ngoài việc cơ bản loại bỏ các tập hợp Htt, xử lý AAV-miARN-Htt còn tạo ra lợi ích hành vi ở chuột YAC128. Chuột YAC128 bắt đầu biểu hiện thiếu hụt ở cần quay bắt đầu từ 3 tháng tuổi, và đến 7 tháng chúng thể hiện sự suy yếu trầm trọng (Slow và *cộng sự*, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567). Chuột YAC128 được xử lý bằng AAV2/1-miARN-Htt ở 7 tháng tuổi (khi sự phối hợp vận động có thể suy yếu đáng kể) thể hiện sự cải thiện ở thử nghiệm cần quay đề xuất đạt được sự đảo ngược thiếu hụt vận động đã thiết lập. Mặc dù giảm về tập hợp Htt đã được báo cáo trước đây (các mô hình đoạn N171 và R6/2) (Rodriguez-Lebron và *cộng sự*, (2005) *Mol. Ther.* 12:618-633; Machida và *cộng sự*., (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:190-197), nghiên cứu hiện tại thể hiện sự cải thiện các tập hợp và cải thiện hành vi đi kèm ở mô hình chuột chiều dài đầy đủ mắc HD. Sự cải thiện đáng kể ở thử nghiệm bơi cưỡng bức sau khi tiêm AAV-miARN-Htt vào thể vôn cũng quan sát thấy. Đây là báo cáo đầu tiên thể hiện cải thiện về phenotyp suy biến sau AAV-ARNi và quan trọng là các kết quả này đề xuất, không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, rằng việc giảm mức Htt trong thể vôn đủ để cải thiện phenotyp suy biến thể hiện ở mô hình YAC128. Cuối cùng, khi chuột YAC128 7 tháng tuổi được xử lý bằng AAV-miARN-Htt (thử nghiệm sau triệu chứng) việc giảm đáng kể về tập hợp Htt trong thể vôn và khả năng đảo ngược thiếu hụt phối hợp vận động được thể hiện bởi mô hình này đã quan sát được. Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, các dữ liệu này chỉ ra rằng xử lý sau triệu chứng bằng AAV2/1-miARN-Htt có thể làm giảm nhẹ gánh nặng mHtt trong các tế bào và tạo ra lợi ích chữa bệnh ngay cả sau khi tập hợp mHtt hình thành.

Sự kìm hãm Htt vẫn cũng tạo ra hiệu chỉnh khiêm tốn các mức mARN của thụ thể DARPP-32 và D1, 2 bản mã mà suy yếu dần dần theo độ tuổi ở chuột YAC128 và bệnh nhân HD là người. Htt đột biến đã biết là làm thất bại nhiều quy trình tế bào dẫn đến rối loạn thần kinh và rối loạn phiên mã (Cha, (2000) *Trends Neurosci.* 23:387-392).

Tóm lại, các nghiên cứu này thể hiện rằng ARNi được trung gian AAV cải thiện đáng kể bất thường hành vi liên quan đến HD ở mô hình chuột YAC128 mắc HD. Ngoài ra cũng thể hiện rằng miARN phân phối được trung gian AAV nhắm đích Htt có thể dẫn đến kìm hãm duy trì các mức Htt, hiệu chỉnh sai lệch tế bào và bệnh lý thần kinh, và cải thiện thiếu hụt vận động và hành vi ở mô hình chuột chuyển gen mắc HD mà không có độc tố rõ ràng.

ARNi cải tiến bằng cách thay đổi bất cặp bazơ shARN

Nghiên cứu hiện tại sử dụng vectơ AAV2/1 tái tổ hợp để mã hóa kẹp tóc ngắn đối với gen htt đánh dấu trong khung miARN (miR-155). Trình tự shARN được sử dụng được thay đổi từ trình tự mirR2.4 bộc lộ trước đây, mà nhắm đích exon 2 của bản mã htt của chuột và người (McBride và cộng sự, (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:5868-5873). Các biến đổi của ARN kẹp tóc ngắn đã được dùng để làm tăng tính ổn định và hoạt tính sinh học, giảm thiểu tác động không nhắm đích, và làm giảm đáp ứng miễn dịch bẩm sinh (Castanotto và cộng sự, (2009) *Nature* 457:426-433; Jackson và cộng sự, (2010) *Nature Rev. Drug Disc.* 9:57-67). Trình tự cải biến dùng trong nghiên cứu hiện tại gồm có trình tự sợi dẫn là miR2.4 (**HÌNH 9A**); tuy nhiên, cấu trúc được thiết kế có nucleotit adenin (A) bổ sung ở đầu 3' của trình tự hạt, không có nucleotit thymine (T) tương ứng trong sợi dẫn (**HÌNH 9B**). Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, mẫu nhiệt động đề xuất rằng bổ sung của trình tự lõi trong sợi không dẫn đến đối diện trình tự hạt trên sợi dẫn có thể cải thiện các khía cạnh của hiệu quả ARNi. Theo đó, tác giả sáng chế cũng phát triển sự xúc tiến mà có thể được sử dụng để tạo ra liệu pháp chữa bệnh axit nucleic biến dạng để điều trị nhiều rối loạn.

Ví dụ 7. Làm giảm câm gen không nhắm đích

ARN can thiệp (ARNi) đề xuất nghiên cứu để điều trị nhiều bệnh ở người. Tuy nhiên, độ an toàn của liệu pháp chữa bệnh trên cơ sở ARNi có thể bởi khả năng của ARN ức chế nhỏ (các siARN) liên kết với các mARN không mong muốn và làm giảm biểu hiện của chúng, tác động được biết là câm gen không nhắm đích. Không nhắm đích thường xảy ra khi vùng

hạt (nucleotit 2–8 của ARN nhỏ) bắt cặp với các trình tự trong các 3'-UTR của các mARN không mong muốn và trực tiếp ngăn cản và làm mất ổn định dịch mã của các bản mã đó. Đến nay, hầu hết các trình tự ARNi chữa bệnh được chọn chủ yếu vì hiệu quả làm câm gen, và sau đó được đánh giá về độ an toàn. Ở đây, trong thiết kế các siARN để điều trị bệnh Huntington (HD), rối loạn thoái hóa hệ thần kinh gen trội, hai trình tự mới với tiềm năng không nhắm đích tối thiểu (tức là, các trình tự với việc thiếu bổ sung hạt trong tất cả các 3'-UTR người và khi nào đã biết) được tạo ra mà thể hiện khả năng làm câm ở não chuột với đặc điểm không nhắm đích *in silico* thấp.

Bảng 1. Trình tự miARN

miARN ID	Trình tự miARN (đối nghĩa, 5'→3')	#siSP OTR không nhắm đích (người)	Top seq để tách dòng (5'→3') Thân vòng mà gồm có trình tự miARN thực, bao gồm phần nhô vị trí giới hạn (không gạch chân)
Thiết kế gốc			
170XA	UAGACAAUGAUU CACACGGU (SEQ ID NO:1)	6001	TGCTGTAGACAATGATTCACACGGT GTTTT GGCCACTGACTGAC ACCGTGTGTCATTGTC TAA (SEQ ID NO:20)
Biến đổi để không nhắm đích ít:			
170XAL1	U C GACAAUGAUU CACACGGU (SEQ ID NO:15)	786	TGCTGT C GACAATGATTCACACGGT GTTTT GGCCACTGACTGAC ACCGTGTGTCATTGTC GAA (SEQ ID NO:21)

170 XA L2	UAGAC GA UGAUU CACACGGU (SEQ ID NO:17)	1223	TGCTGTAGAC GATGATTCACACGGTGTTTT GGCCACTGACTGAC ACCGTGTGTCAT CGTC TAA (SEQ ID NO:21)
-----------------	--	------	--

Được thể hiện trên Bảng 1 là trình tự miARN PS170XA gốc và hai phiên bản không nhắm đích ít cải biến của trình tự này: 170XAL1 và 170XAL2. The hai phiên bản không nhắm đích ít của PS170XA được thiết kế bằng cách thế bazơ trong heptame từ bazơ 2-8 để tạo ra mô típ CpG. (Boudreau và cộng sự, 2012). ‘A’ ở các vị trí 2 được đổi thành C trong 170XAL1 (5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3') (SEQ ID NO:15), và ‘A’ ở vị trí 6 được đổi thành ‘G’ trong 170XAL2 (5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3') (SEQ ID NO:17). Việc thế này tạo ra điểm không nhắm đích thấp hơn đáng kể bằng cách sử dụng thuật toán SiSPOTR, thuật toán thiết kế siARN tập trung đặc trưng mà xác định trình tự ứng viên với khả năng không nhắm đích tối thiểu và khả năng làm câm tiềm năng (Boudreau và cộng sự, *Axit nucleics Res.* 2013 Jan; 41(1) e9. Điểm SiSPOTR giảm có thể dự báo trình tự mới có số không nhắm đích ở người tiềm năng thấp so với trình tự 170XA gốc.

Trình tự miARN PS170XA gốc là 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1). Trình tự sau, bao gồm sợi dẫn, vòng trong mir-155 cải biến (chuột), và sợi đi kèm, được tách dòng vào vectơ biểu hiện: 5'TAGACAATGATTCACACGGTGT**TTTTGGCCACTGACTGAC**ACCGTGTGTCATTG TCTAA-3' (SEQ ID NO:19). ‘A’ bổ sung là ở đầu 3'. Sợi dẫn và sợi kèm theo là đậm, và bazơ 11 và 12 của sợi dẫn không bổ sung ngược trong sợi kèm theo, tạo ra vòng trong nhỏ trong cấu trúc kép được xử lý, trưởng thành. ‘A’ ở các vị trí 2 được đổi thành C trong 170XAL1, và ‘A’ ở vị trí 6 được đổi thành ‘G’ ở 170XAL2, nếu không, 170XAL1 và 170XAL2 có cùng cấu trúc như PS170XA gốc. Các cấu trúc được thể hiện ở **HÌNH 10**.

Khả năng của AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 và 170XAL2 để trung gian Htt làm giảm in vitro các tế bào thận phôi (HEK293) ở người được thử. Plasmid biểu hiện AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 và 170XAL2 cũng như plasmid đối chứng chứa trình tự miARN không mã hóa (CTL3) được chuyển nhiễm tế bào HEK293 (8 mẫu lặp mỗi xử lý). Các tế bào được

chuyển nhiễm sử dụng chất phản ứng chuyển nhiễm Eugene và được thu hoạch 48 giờ sau. Tổng ARN được phân lập sử dụng bộ kit TaqMan® Cells-to-CT™ (Ambion). Các mức ARN được đo bằng RT-PCR thời gian thực định lượng (được thực hiện và phân tích trên Thiết bị dò trình tự ABI Prism 7500 (Applied Biosystems)). Các mức biểu hiện được chuẩn hóa đến PPIA của người (peptidylprolyl isomerase). Các mức Htt mARN của người được giảm sau khi chuyển nhiễm bằng cả plasmid 170XAL2 và 170XAL2 so với CTL3 và đối chứng không được xử lý, tuy nhiên việc làm giảm này không đạt đến thống kê đáng kể (HÌNH 11).

Khả năng của AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 và 170XAL2 để làm câm biểu hiện Htt trong thể vân của chuột YAC128 được đánh giá. Chuột YAC128 trưởng thành nhận tiêm trong thể vân cả hai AAV2/1-miARN-Htt 170XA (2E10 vgs/vị trí), AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 (2E10 vgs/ vị trí), hoặc AAV2/1-miARN-Htt 170XAL2 (3E10 vgs/ vị trí). AAV2/1-miARN-Htt 170XA gốc dùng làm đối chứng dương trong khi nhóm không được xử lý khác (không tiêm) dùng làm đối chứng âm. Một tháng sau khi tiêm, các con vật được gây chết và được đổ lên PBS. Não được gom để phân tích mô học và sinh hóa. Đối với phân tích sinh hóa vùng vân của một bán cầu được vi cắt và làm đông nhanh trong nitơ lỏng. Các mức vân của Htt mARN và protein người và chuột đột biến được đánh giá bằng kỹ thuật QPCR và Western blot tương ứng. mARN Htt người đột biến và Htt chuột đột biến giảm đáng kể ở chuột được tiêm AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 và AAV2/1-miARN-Htt 170XAL2 ở khi so với các con vật đối chứng không được xử lý (**HÌNH 12A và 12B**). PPIA dùng làm gen đối chứng chuẩn hóa cho tất cả các thử nghiệm QPCR. Protein Htt người và chuột đột biến giảm đáng kể ở tất cả chuột được tiêm AAV2/1-miARN-Htt khi so với các con vật đối chứng không được xử lý và mức độ làm giảm tương đương (xấp xỉ 50%, $p < 0,05$) được lưu ý trên tất cả các xử lý (**FIGS 12C và 12D**).

Các mức GFAP và Iba1 mARN trong thể vân bằng QPCR để xác định xem các gen đánh dấu viêm này được điều chỉnh lên sau khi tiêm vector AAV-miARN-Htt không được đánh giá. GFAP là gen đánh dấu của mô tế bào hình sao và Iba1 dùng làm chất đánh dấu cho việc hoạt hóa tiểu thần kinh đệm. Thấy rằng việc tiêm trong thể vân của AAV2/1-miARN-Htt 170XA tạo ra tăng đáng kể về mức mARN GFAP (**HÌNH 13A**) và Iba1 mARN (**HÌNH 13B**) trong thể vân 1 tháng tiêm. Không thấy tăng về GFAP hoặc Iba1 sau khi tiêm AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 hoặc AAV2/1-miARN-Htt 170XAL2 và các mức GFAP và Iba1

mARN tương đương với đối chứng không được xử lý. PPIA của người dùng làm gen đối chứng chuẩn hóa. Các giá trị đưa ra là $\pm$ SEM trung bình. *Khác biệt đáng kể từ chuột đối chứng không được xử lý, $p < 0,05$; ANOVA sau đó Thử nghiệm kiểm định sau của Tukey.

Nhuộm màu hóa mô miễn dịch GFAP và Iba1 của phần mô vên từ chuột YAC128 được xử lý bằng AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 hoặc AAV2/1-miARN-Htt 170XAL2 1 tháng sau khi tiêm cho thấy rằng các mức protein GFAP và Iba1 không tăng trong thể vên sau khi tiêm (HÌNH 14). Kính hiển vi huỳnh quang được sử dụng để đánh giá mức độ nhuộm miễn dịch GFAP và Iba1 trong não. Việc tiêm trong thể vên của AAV2/1-miARN-Htt 170XA tạo ra tăng hoạt tính miễn dịch GFAP và Iba-1 như được thấy bởi kính hiển vi huỳnh quang, tuy nhiên không thấy tăng bất về nhuộm miễn dịch GFAP hoặc Iba1 sau khi tiêm AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 hoặc AAV2/1-miARN-Htt 170XAL2 trong đó mức nhuộm là tương đương với não đối chứng không được xử lý. Khung tỷ lệ = 50 μ M.

CÁC TRÌNH TỰ

Tất cả các trình tự polypeptit được thể hiện là đầu N đến đầu C- trừ khi có chỉ định khác đi. Tất cả các trình tự axit nucleic được thể hiện là 5' đến 3' trừ khi có chỉ định khác đi.

sợi đối nghĩa miARN htt

UAGACAAUGAUUCACACGGU (SEQ ID NO:1)

bổ sung sợi kèm theo miARN

ACCGUGUGUCAUUGUCUAA (SEQ ID NO:2)

Trình tự đích có nghĩa

ACCGUGUGAAUCAUUGUCUAA (SEQ ID NO:3)

trình tự ADN sợi đối nghĩa miARN htt

TAGACAATGATTCACACGGT (SEQ ID NO:4)

bổ sung sợi kèm theo miARN

ACCGTGTGTCATTGTCTAA (SEQ ID NO:5)

Trình tự đích có nghĩa

ACCGTGTGAATCATTGTCUTAA (SEQ ID NO:6)

trình tự ARN 3A170

UGCUGUAGACAAUGAUUCACACGGUGUUUUGGCCACUGACUGACACCGUGUCAUUGUCUAA
CAGG (SEQ ID NO:7)

trình tự ADN 3A170

TGCTGTAGACAATGATTACACGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCGTGTCTATTGTCTAA
CAGG (SEQ ID NO:8)

Đoạn mồi xuôi Htt mARN của người

Ctccgtccggtagacatgct (SEQ ID NO:9)

Đoạn mồi ngược Htt mARN của người

Ggaaatcagaaccctcaaatgg (SEQ ID NO:10)

Đoạn dò Htt mARN của người

Tgagcactgttcaactgtgtgtatcgga (SEQ ID NO:11)

ITR AAV biến thể cho vectơ scAAV

CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCC
CGGGCTTTGCCC

GGGCG (SEQ ID NO:12).

Trình tự ADN bộ gen vectơ của AAV

ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggctcgccc
gacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtggc
caactccatcactaggggttcctggaggggtggagtcgtgacaattcgcccttgggcctag
gcaattggatcccggaccgtcgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattac
ggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaattggc
ccgcctgggtgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccca
tagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatattacggtaaactgc
ccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgac

ggtaaatggcccgccctggcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggc
 agtacatctacgtattagtcacgcctattaccatgggtcgaggtgagccccacgttctgctt
 cactctccccatctccccccccctccccaccccccaattttgatatttattttttaatta
 ttttgtagcagcgatgggggcgggggggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcggg
 gcgaggggcggggcggggcgaggcgagaggtgcggcggcagccaatcagagcgggcgcgct
 ccgaaagtttccttttatggcgaggcgggcgggcgggcgggccctataaaaagcgaagcgcg
 cggcgggcgggagtcgctgcgcgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccgcgcctcgc
 gccgcccgcgggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggcgggacggccc
 ttctcctccgggctgtaattagcgcttggtttaatgacggcttgtttcttttctgtggctg
 cgtgaaagccttgaggggctccgggaggggccctttgtgcgggggggagcggtcgggggggtg
 cgtgcgtgtgtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggctccgcgctgcccggcggctgtga
 gcgctgcgggcgcgggcgggggccttgtagcgtccgcagtgtagcgcgaggggagcgcgggcc
 gggggcggtgccccgcggtgcggggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcgggggtg
 tgtgcgtgggggggtgagcaggggggtgtggggcgcgctcggctcgggctgcaacccccctgca
 cccccctccccgagttgctgagcacggcccggttcgggtgcgggggctccgtacggggcggt
 ggcgcggggctcgccgtgccgggcggggggtggcgggcaggtgggggtgccgggcggggcgg
 ggccgcctcgggcccggggagggctcgggggaggggcgcgggcgggcccccgagcgccggcgg
 ctgtcgaggcgcgggcgagccgcagccattgccttttatggtaatcgtgcgagagggcgcgag
 ggacttcctttgtcccaaactctgtgcggagccgaaatctgggagggcgccgcgcacccccct
 ctagcgggcgcgggggaagcggtgcggcgccggcaggaaggaaatgggcggggagggcct
 tcgtgcgtcgccgcgcccgtccccctctccctctccagcctcggggctgtccgcggggg
 gacggctgccttcgggggggacggggcagggcggggttcggcttctggcggtgtgaccggcg
 gctctagagcctctgctaaccatgttcatgccttcttcttttctacagctcctgggcaa
 cgtgctgggttattgtgctgtctcatcattttggcaaagaattcttcgaaagatctgctagc
 ttaattaacccggtcgccaccatgggtgagcaagggcgaggagctgttcaccgggggtgggtgc
 ccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaaccggccacaagttcagcggtgtccggcgaggg
 cgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctg
 cccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcggtgcagtgccttcagccgct
 accccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaaggctacgtcca
 ggagcgacccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagaccgcgcccaggtgaagttc
 gagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggca

acatcctggggcacaagctggaggtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccga
 caagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagc
 gtgcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgc
 ccgacaaccactacctgagcaccagtcggccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgga
 tcacatgggtcctgctggagttcgtgaccgcccggggatcactctcggcatggacgagctg
 taccctggaggcttgctgaaggctgtatgctgttagacaatgattcacacgggtgttttggc
 cactgactgacaccgtgtgtcattgtctaacaggacacaaggcctgttactagcactcaca
 tggaaacaaatggccatgcatctagagggccctattctatagtgtcacctaaatgctagagc
 tcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttggttgccccctcccc
 gtgccttccttgaccctggaagggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaa
 ttgcatcgcatgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacag
 caagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggagctagagtcgaccggaccg
 gtggaagtcctcttcctcgggtgtccttgacttcaaagggtctctcccatttgctggagag
 aggggaagggtgggcatcaccaggggtgagtgagggttgggaagagtgtagcagaataagaa
 accatgagtccccctccctgagaagccctgagcccccttgacgacacacatccctcgaggct
 cagcttcatcatctgtaaaagggtgctgaaactgaccatccaagctgccgaaaaagattgtg
 tggggataattcaaaactagaggaagatgcagaatttctacatcgtggcgatgtcaggcta
 agagatgccatcgtgggtgtgcatttttattggaatcatatgtttatttgagggtgtcttg
 gatattacaaataaaaatgttggagcatcaggcatatttggtaccttctgtctaaggctccc
 tgcccccttgtttaattggcagctcagttattcatccaggggcaaacattctgcttactattcc
 tgagagctttcctcatcctctagattggcaggggaaatgcagatgcctgagcagcctcccc
 tctgccataccaacagagcttcaccatcgaggcatgcagagtgagacaggggacctcagggac
 ccctgatcccagcttttctcattggacagaaggaggagactggggctggagagggacctggg
 cccccactaaggccacagcagagccaggacttttagctgtgctgactgcagcctggcttgcc
 tccactgccctcctttgcctcaagagcaaggagcctcagagtggaggaagcagccccctgg
 ccttgccctcccacctccccctcccctatgctgttttctgggacagtgggagctggcttaga
 atgccctggggccccccaggacctggcatttttaaccctcagggggcaggaaggcagcctga
 gatacagaagagtccatcacctgctgtatgccacacaccatccccacagttacgtactagt
 tcgaagccacgcgtccgaagggcgaattgtagataagtagcatggcgggttaatcattaac
 tacaaggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactg

aggccgggacgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggaggcctcagtgagcga
gcgagcgcgagagagggagtgccaa

(SEQ ID NO:13)

trình tự ADN khung miARN

ctggaggcttgctgaaggctgtatgctgttagacaatgattcacacgggtgttttggccact
gactgacaccgtgtgtcattgtctaacaggacacaaggcctgttactagcactcacatgga
acaaatggcc(SEQ ID NO:14)

170XAL1 dẫn (đối nghĩa)

UCGACAAUGAUUCACACGGU (SEQ ID NO:15)

170XAL1 không dẫn

ACCGUGUGUCAUUGUCGAA (SEQ ID NO:16).

170XAL2 dẫn (đối nghĩa)

UAGACGAUGAUUCACACGGU (SEQ ID NO:17)

170XAL1 không dẫn

ACCGUGUGUCAUCGUCUAA (SEQ ID NO:18)

170XA

TAGACAATGATTACACGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCGTGTCATTGTCTAA
(SEQ ID NO:19)

Tham khảo chéo đến đơn liên quan

Đơn này xin hưởng quyền ưu tiên theo Đơn tạm thời của Mỹ số 62/114,578, nộp ngày 10/02/ 2015, nội dung của nó được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ cho mọi mục đích.

Nộp danh mục trình tự trên tệp văn bản ASCII

Nội dung của tài liệu được nộp trên tệp văn bản ASCII được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn: dạng đọc được bằng máy tính (CRF) của Danh mục trình tự (tên tệp: 159792010140SEQLIST.txt, ngày đăng ký 04/02/2016, kích thước: 11 KB).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. ARNi bao gồm sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó
 - a) sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép;
 - b) sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn có ít nhất 19 bazơ, trong đó vùng dẫn bao gồm vùng hạt bao gồm các bazơ 1-N của vùng dẫn từ đầu 5' đến đầu 3', trong đó $N=7$ hoặc $N=8$; và
 - c) sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn có ít nhất 19 bazơ, trong đó vùng không dẫn bao gồm trình tự lồi đối diện với bazơ 1 của vùng dẫn trong cấu trúc kép.
2. ARNi theo điểm 1, trong đó $N=7$ và phân lồi đối diện bazơ của vùng dẫn.
3. ARNi theo điểm 1, trong đó $N=8$ và phân lồi đối diện bazơ của vùng dẫn.
4. ARNi theo điểm 1, trong đó phân lồi bao gồm 1 đến 10 nucleotit.
5. ARNi theo điểm 1, trong đó ARNi bao gồm phân lồi thứ hai, trong đó phân lồi thứ hai nằm trong vùng dẫn của sợi thứ nhất và ở vị trí 3' với vùng hạt.
6. ARNi theo điểm 1, trong đó cấu trúc kép có chiều dài nằm trong khoảng từ 19 đến 25 hoặc từ 19 đến 23 cặp bazơ.
7. ARNi theo điểm 1, trong đó sợi thứ nhất và/hoặc thứ hai còn bao gồm vùng nhô ra 3', vùng nhô ra 5', hoặc cả vùng nhô ra 3' và 5'.
8. ARNi theo điểm 1, trong đó sợi thứ nhất và sợi thứ hai được liên kết với nhau bởi liên kết ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng lặp.
9. ARNi theo điểm 8, trong đó liên kết ARN bao gồm từ 4 đến 50 nucleotit.
10. ARNi theo điểm 8, trong đó cấu trúc vòng lặp bao gồm 4 đến 20 nucleotit.

11. ARNi theo điểm 8, trong đó ARNi bao gồm sợi thứ hai đầu 5' đến 3', liên kết ARN, và sợi thứ nhất; hoặc trong đó ARNi này bao gồm sợi thứ nhất đầu 5' đến 3', liên kết ARN, và sợi thứ hai.
12. ARNi theo điểm 1, trong đó trình tự này được cải thiện để làm giảm cảm gen không nhắm đích.
13. ARNi theo điểm 1, trong đó trình tự này bao gồm một hoặc nhiều mô típ CpG.
14. ARNi theo điểm 1, trong đó trình tự này bao gồm một hoặc nhiều mô típ CpG trong vùng hạt.
15. ARNi theo điểm 1, trong đó ARNi là ARN ức chế nhỏ (siARN), microARN (miARN), hoặc ARN kẹp tóc nhỏ (shARN).
16. ARNi theo điểm 1, trong đó ARNi nhắm đích ARN mã hóa polypeptit liên quan đến rối loạn.
17. ARNi theo điểm 16, trong đó rối loạn là rối loạn CNS, bệnh chuyển hóa tiêu thể (LSD), bệnh Huntington, chứng động kinh, bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, đột quỵ, bệnh thoái hóa hạch nền - vỏ não (CBD), thoái hóa vỏ não hạch đáy (CBGD), bệnh sa sút trí tuệ trán-thái dương (FTD), bệnh teo đa hệ thống (MSA), liệt trên nhân tiến triển (PSP) hoặc ung thư não.
18. ARNi theo điểm 17, trong đó polypeptit là huntingtin.
19. ARNi theo điểm 18, trong đó vùng dẫn bao gồm
(a) trình tự 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) và vùng không dẫn bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2);

(b) trình tự 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) và vùng không dẫn bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16);

(c) trình tự 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) và vùng không dẫn bao gồm trình tự 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18).

20. Phương pháp làm giảm độc tính của ARNi bao gồm việc đưa phần lõi vào vùng không dẫn của ARNi để tạo ra ARNi theo điểm 1.

21. Cấu trúc biểu hiện bao gồm axit nucleic mã hóa ARNi theo điểm 1.

22. Cấu trúc biểu hiện theo điểm 21, trong đó axit nucleic này mã hóa ARNi bao gồm khung miARN.

23. Cấu trúc biểu hiện theo điểm 21, trong đó axit nucleic này mã hóa ARNi liên kết hoạt động với promoter.

24. Vector bao gồm cấu trúc biểu hiện theo điểm 21.

25. Vector theo điểm 24, trong đó vector này là vector rAAV.

26. Vector rAAV theo điểm 25, trong đó vector này còn bao gồm đoạn nhồi axit nucleic.

27. Vector rAAV theo điểm 26, trong đó đoạn nhồi axit nucleic là ở giữa promoter và axit nucleic mã hóa ARNi.

28. Tế bào bao gồm vector theo điểm 24.

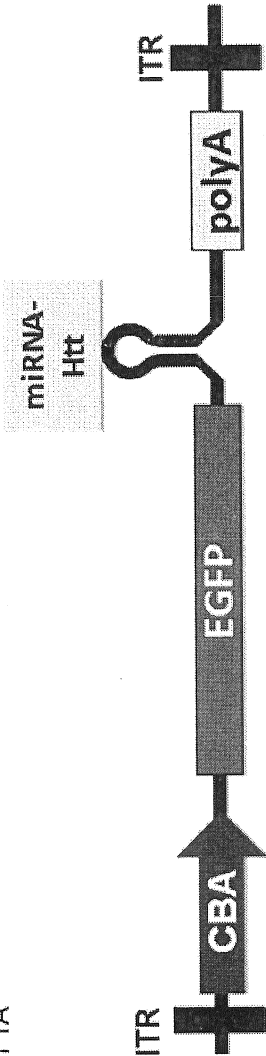
29. Hạt virus bao gồm vector theo điểm 24, trong đó hạt virus này là hạt AAV bọc vector rAAV, hạt adenovirus bọc vector adenovirus tái tổ hợp, hạt lentivirus bọc vector lentivirus tái tổ hợp hoặc hạt HSV bọc vector HSV tái tổ hợp.

30. Hạt AAV tái tổ hợp bao gồm vector rAAV theo điểm 25.

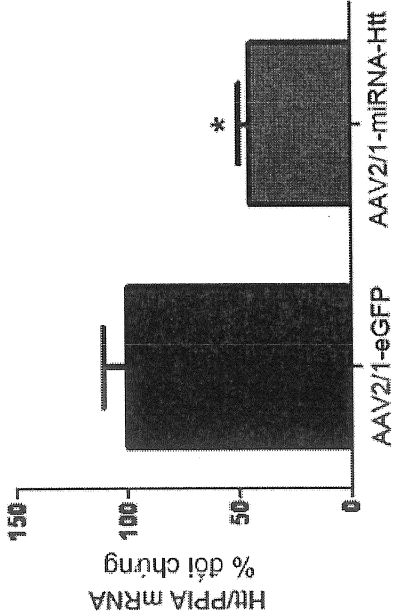
31. Bộ kit để tạo ra ARN can thiệp ở động vật có vú bao gồm ARNi theo điểm 1.

32. Bộ kit để tạo ra ARN can thiệp ở động vật có vú mắc bệnh Huntingon bao gồm ARNi theo điểm 1.

HÌNH 1A

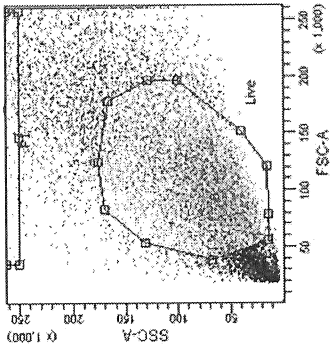


HÌNH 1B

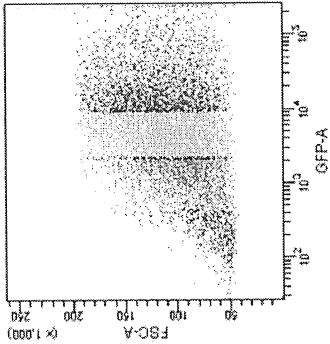


HÌNH 1A & 1B

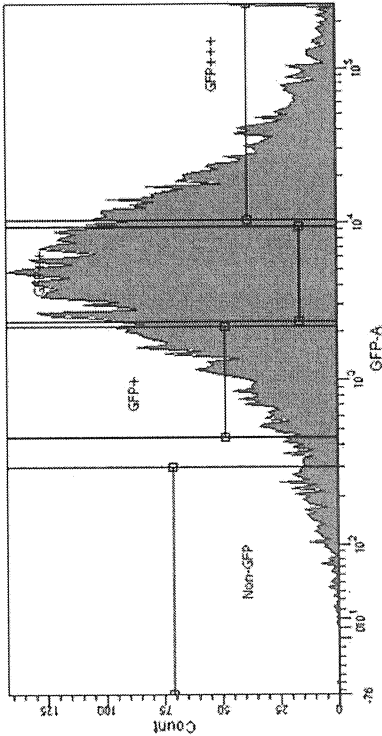
HÌNH 2A



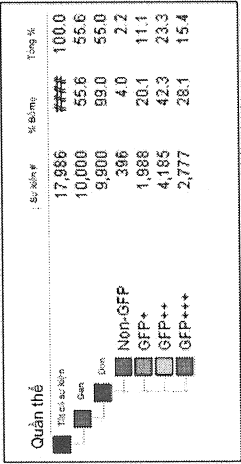
HÌNH 2B



HÌNH 2C

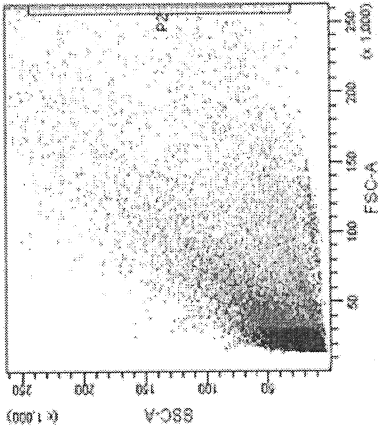


HÌNH 2D

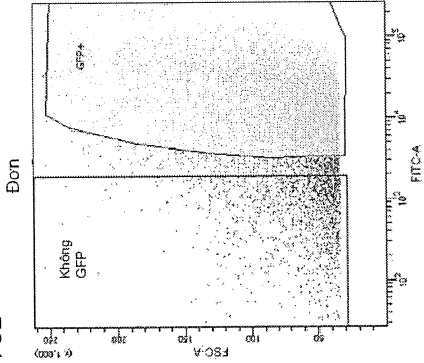


HÌNH 2A-D

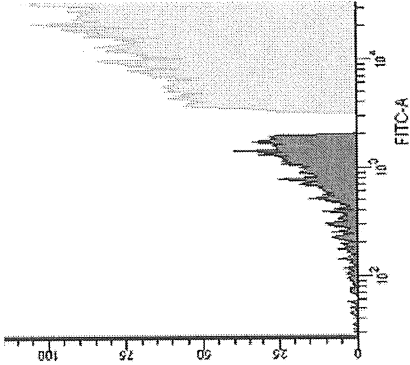
HÌNH 3A



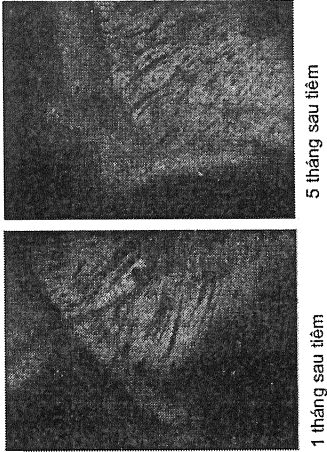
HÌNH 3B



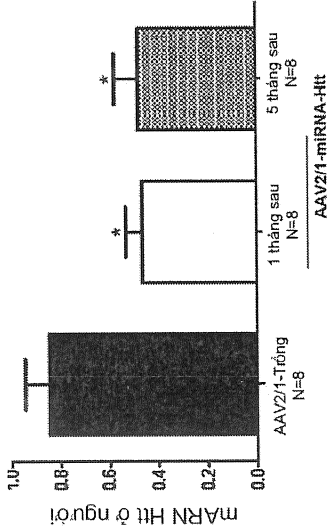
HÌNH 3C



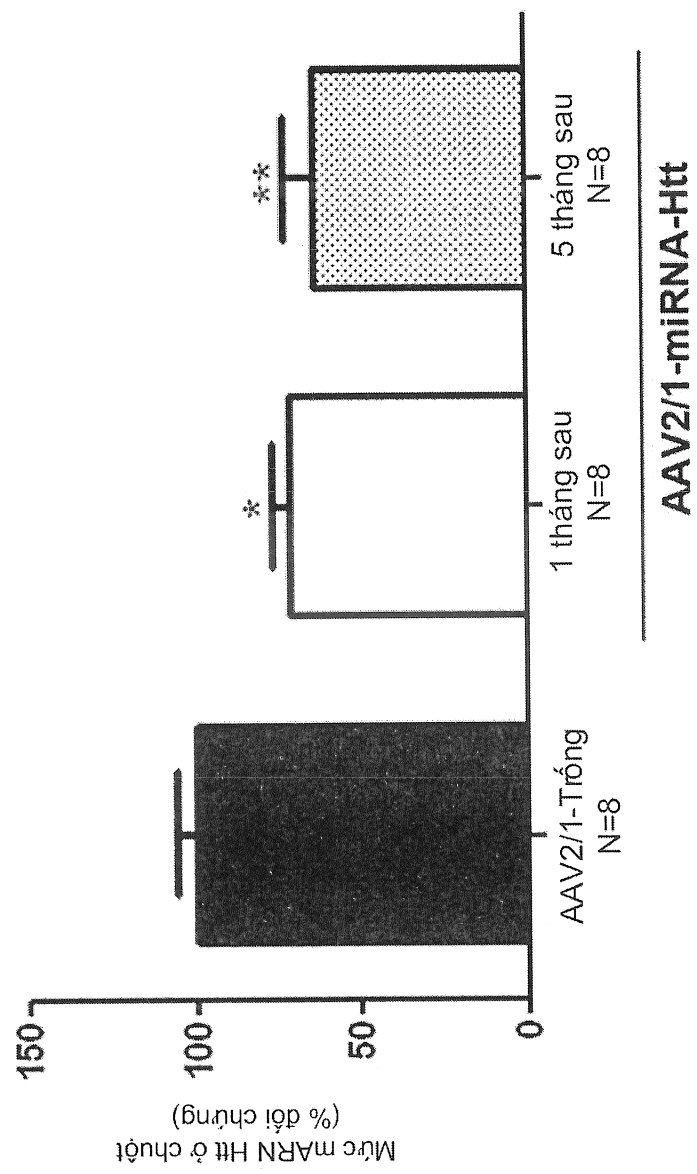
HÌNH 3D



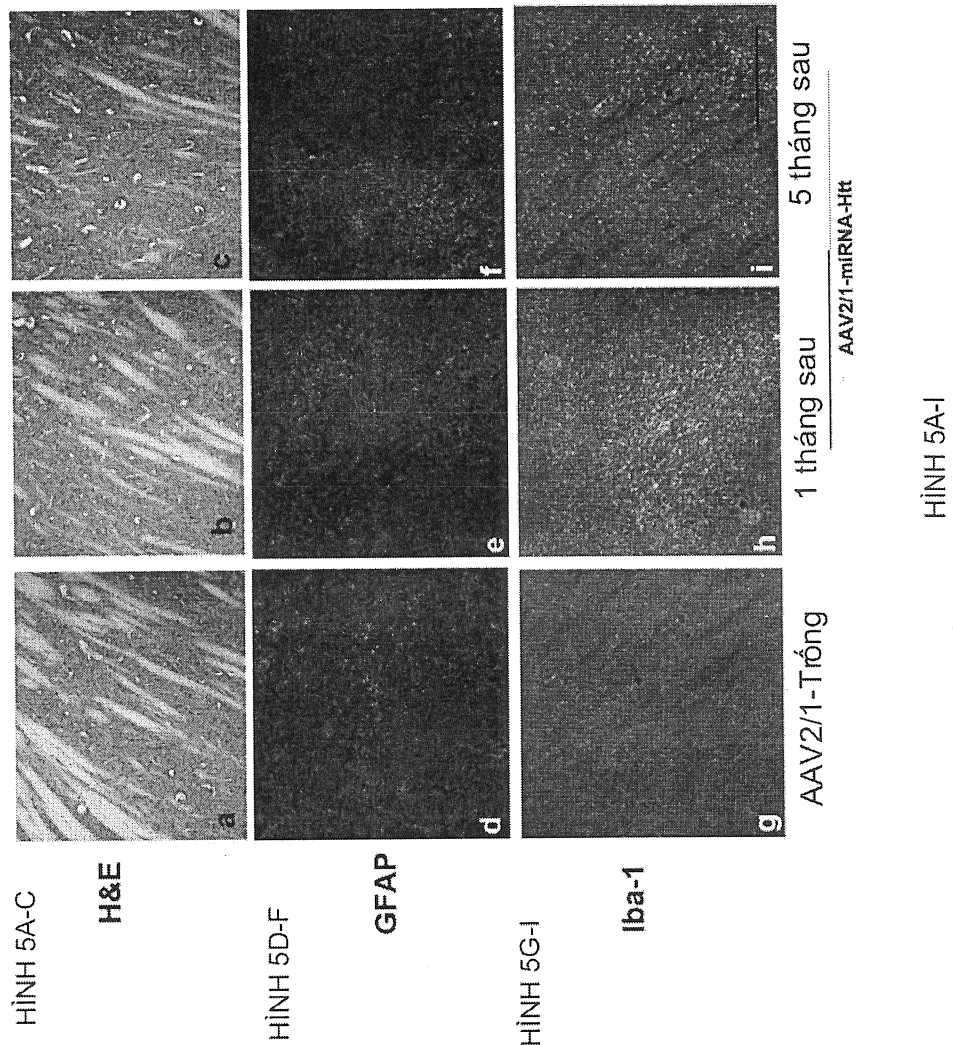
HÌNH 3E



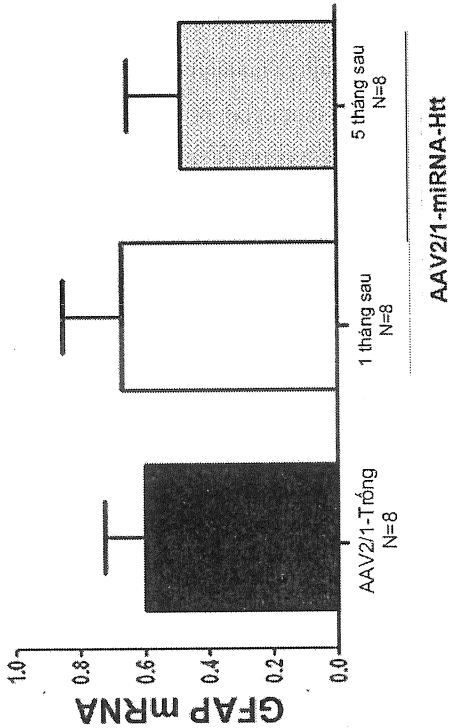
HÌNH 3A-E



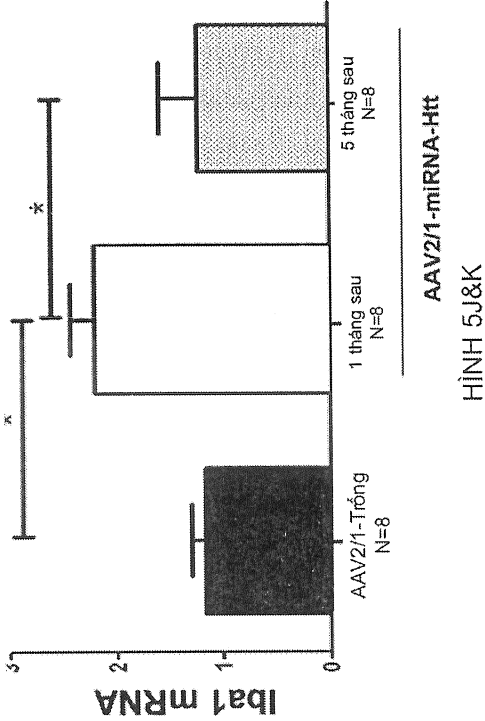
HÌNH 4



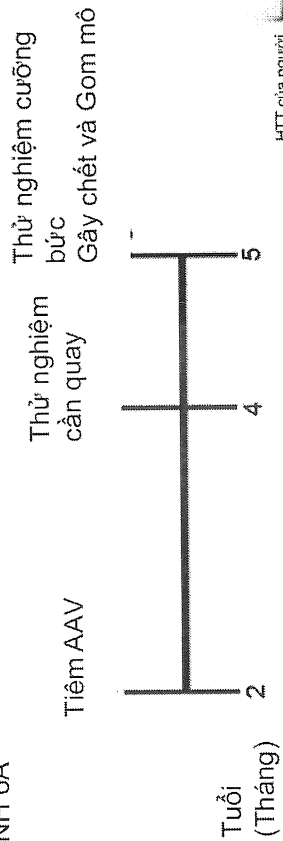
HÌNH 5J



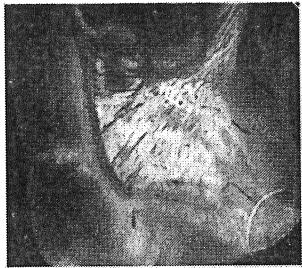
HÌNH 5K



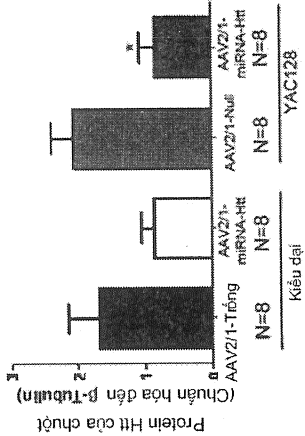
HÌNH 6A



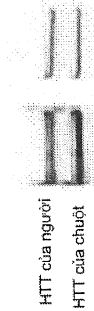
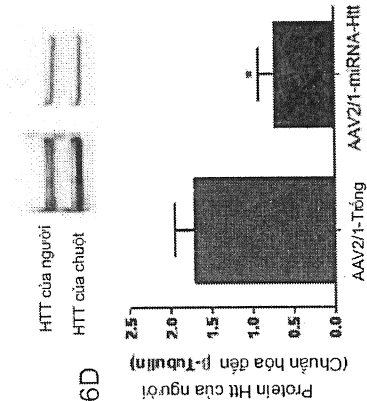
HÌNH 6B



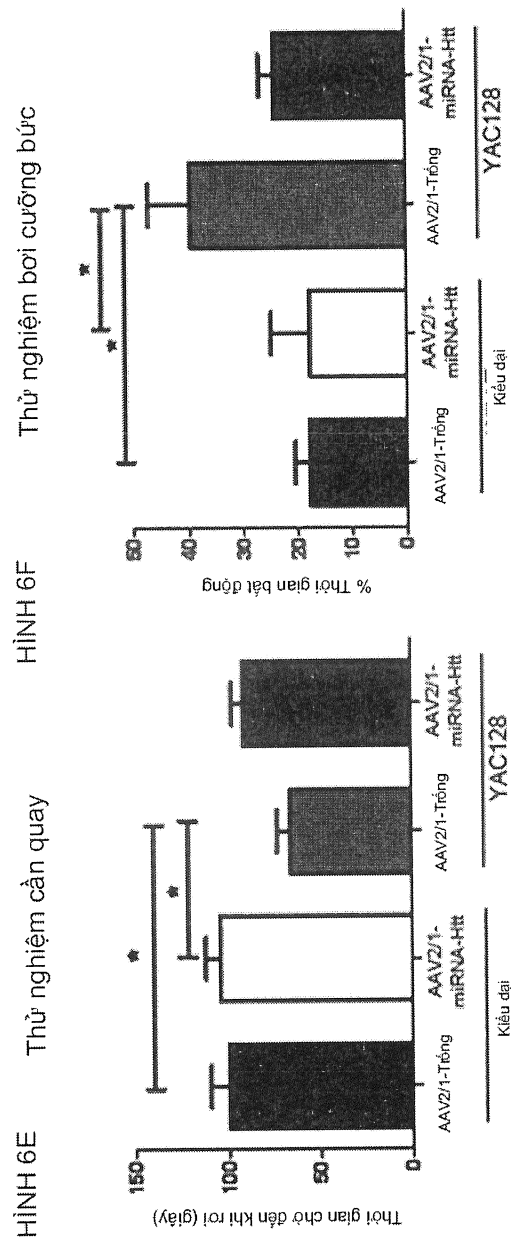
HÌNH 6C



HÌNH 6D

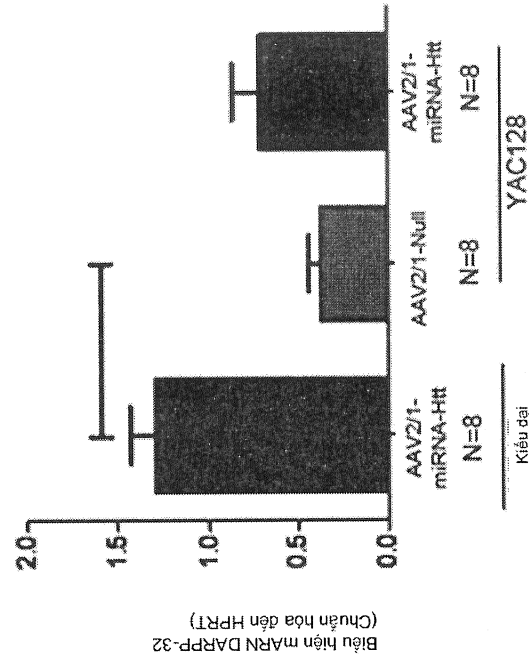


HÌNH 6A-D

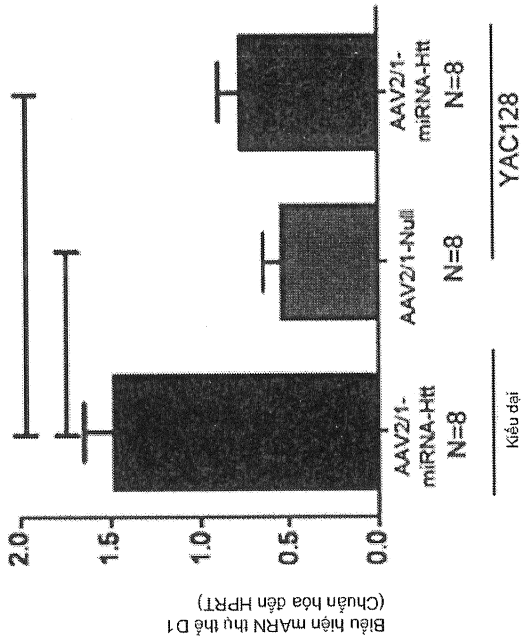


HÌNH 6E&F

HÌNH 7A

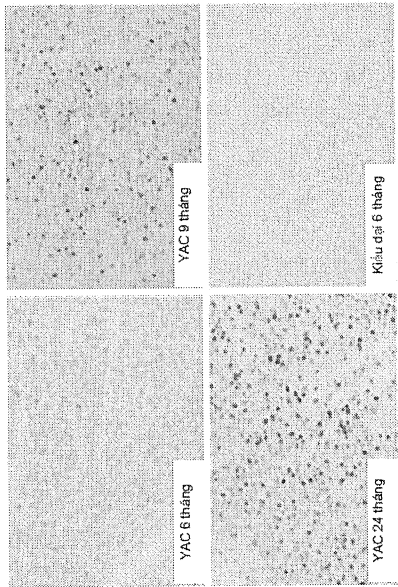


HÌNH 7B

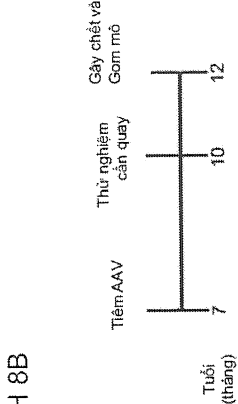


HÌNH 7A&B

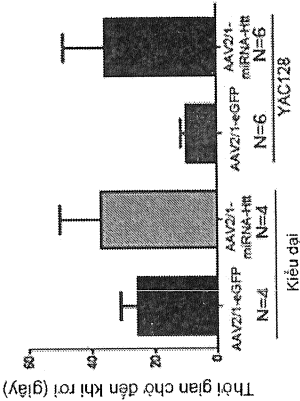
HÌNH 8A



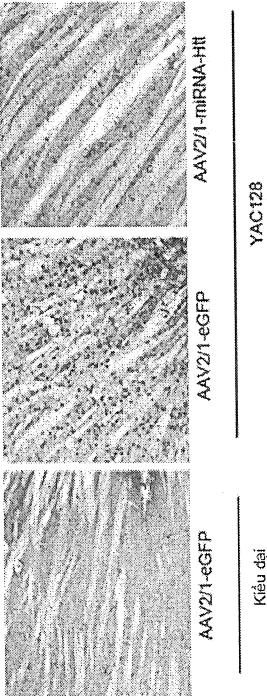
HÌNH 8B



HÌNH 8C

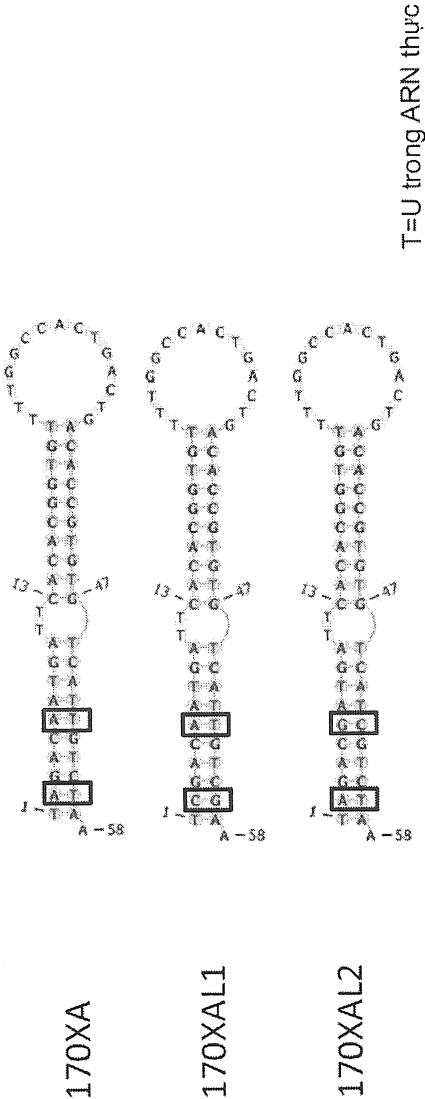


HÌNH 8D

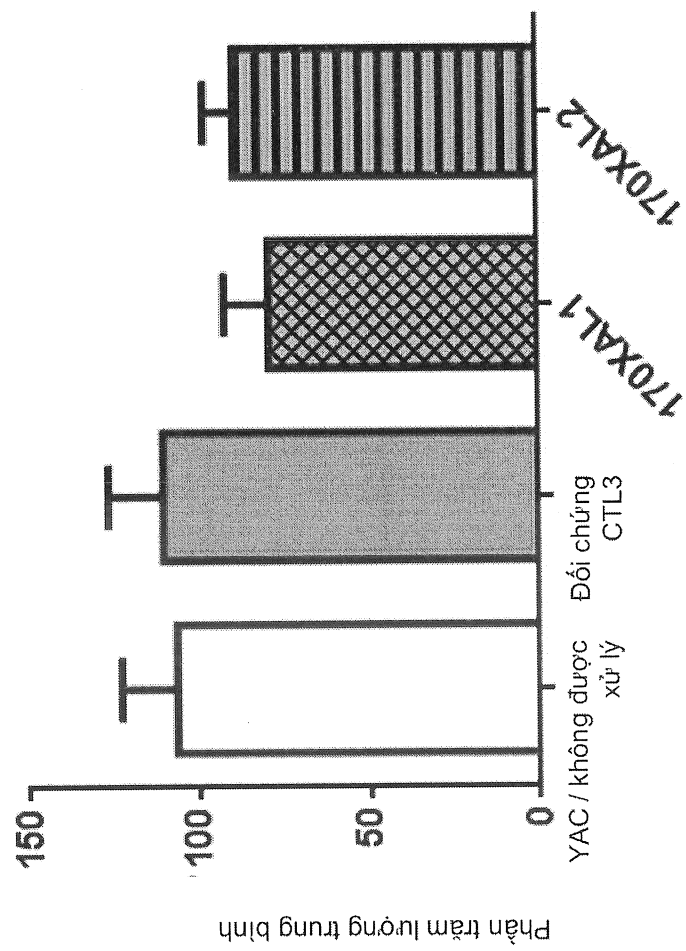


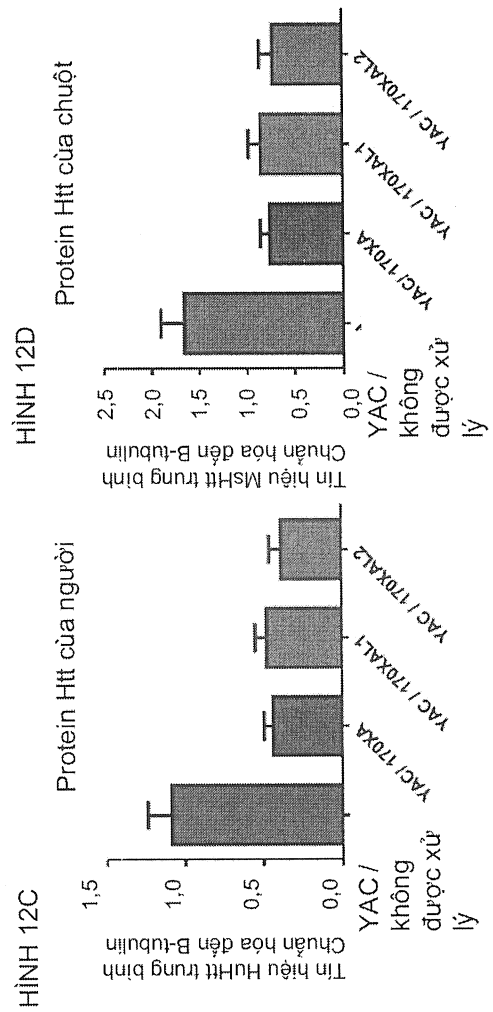
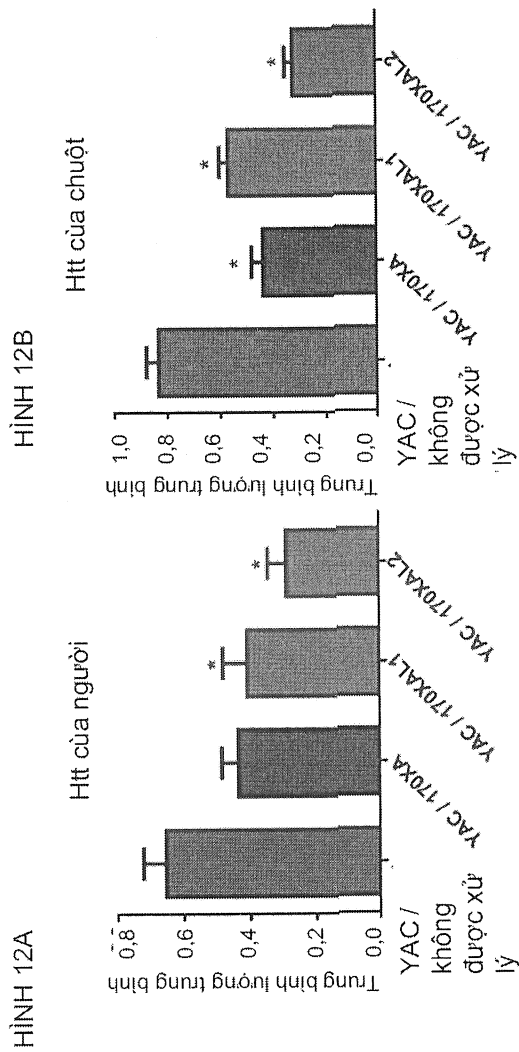
HÌNH 8A-D

HÌNH 10



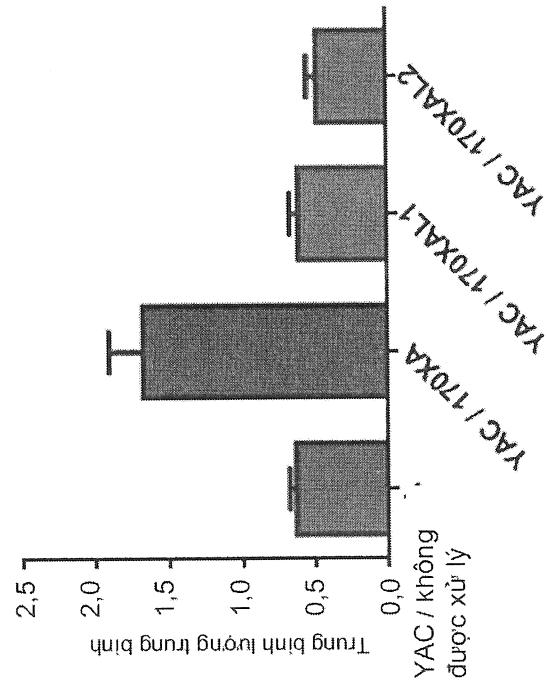
HÌNH 11





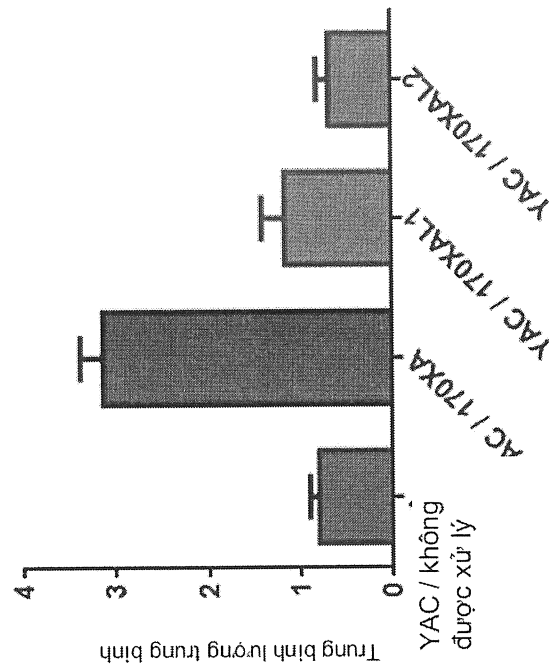
HÌNH 13B

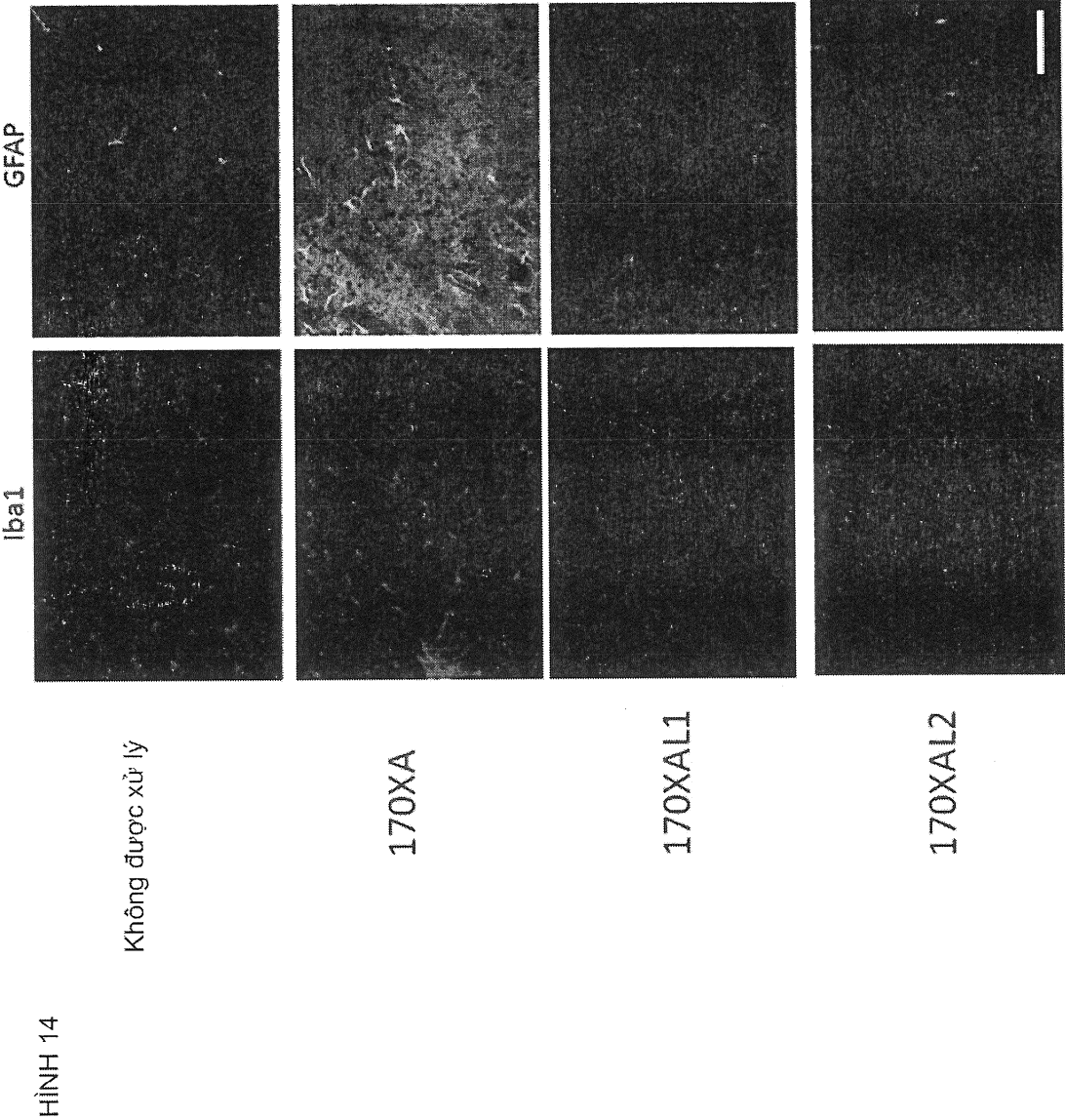
Iba1



HÌNH 13A

GFAP





DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> STANEK, Lisa M.
 PALERMO, Adam
 RICHARDS, Brenda
 SARDI, Sergio Pablo
 O'RIORDAN, Catherine
 SONG, Antonius

<120> PHẦN TỬ ARNi, PHƯƠNG PHÁP LÀM GIẢM ĐỘC TÍNH CỦA ARNi,
 CẤU TRÚC BIỂU HIỆN, VECTO, TẾ BÀO, HẠT VIRUT,
 VÀ BỘ KIT CHỨA PHẦN TỬ NÀY

<130> 159792010140

<140> Không được chỉ định
 <141> Đồng thời ở đây

<150> US 62/114,578
 <151> 2015-02-10

<160> 26

<170> FastSEQfor Windows Phiên bản 4.0

<210> 1
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 1
 uagacaauga uucacacggu

20

<210> 2
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2
 accguguguc auugucuaa

19

<210> 3
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3
accgugugaa ucauugucua a 21

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4
tagacaatga ttcacacggt 20

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

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 5
accgtgtgtc attgtctaa 19

<210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6
accgtgtgaa tcattgtcut aa 22

<210> 7
<211> 65
<212> ARN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7
ugcuguagac aaugauucac acgguguuuu ggccacugac ugacaccgug ucauugucua 60
acagg 65

<210> 8
<211> 65
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8

tgctgtagac aatgattcac acggtgtttt gycactgac agacaccgtg tcattgtcta 60
acagg 65

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 9

ctccgtccgg tagacatgct 20

<210> 10

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

ggaaatcaga accctcaa at gg 22

<210> 11

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 11

tgagcactgt tcaactgtgt gtatcggga 29

<210> 12

<211> 78

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

cactccctct ctgcgcgtc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccacgc 60
ccgggtttg cccgggcg 78

<210> 13

<211> 4297
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13

```

ttggccactc cctctctgcg cgtctgctcg ctactgagg cggggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccc ggcgccctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg 120
gccaaactcca tcaactagggg ttcttgagg ggtggagtcg tgacaattcg cccttggggc 180
taggcaattg gatcccgga cgtcgacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa 240
ttacgggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa 300
atggcccgcg tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg 360
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tattttacgg 420
aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg 480
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc 540
ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgtattac catggtcgag gtgagcccca 600
cgtttctgctt cactctcccc atctccccc cctccccacc cccaattttg tattttattta 660
ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cggggggggg gggggggcgc gcgccaggcg 720
gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcgag aggtgcggcg gcagccaatc 780
agagcgggcg gctccgaaag ttctctttta tggcgaggcg gcggcgggcg cgcccctata 840
aaaagcgaa cgcgcggcg gcgggagtc ctgcgcgctg ccttcgcccc gtgccccgct 900
cgcgcggcg ctcgcgcgc cgcggcggc tctgactgac cgcgttact ccacaggtga 960
gcggcgggga cggcccttct cctcggggt gtaattagcg cttggtttaa tgacggcttg 1020
ttctctttct gtggctgctg gaaagccttg aggggctccg ggagggccct ttgtgcgggg 1080
ggagcgggctc ggggggtgcg tgcgtgtgtg tgtgcgtggg gagcgccgag tgcggctccg 1140
cgctgccccg cggctgtgag cgctgcgggc gcggcgcggg gctttgtgag ctccgcagtg 1200
tgcgcgaggg gagcgcgcc gggggcggtg ccccgcggtg cggggggggc tgcgagggga 1260
acaaaagctg cgtgcggggt gtgtgcgtgg ggggggtgag aggggggtgt ggcgcgtcgg 1320
tcgggctgca accccccctg cccccccct cccgagttgc tgagcacggc ccggcttcgg 1380
gtgcggggct ccgtacgggg cgtggcgcg ggctcgccgt gccggggcgg ggtggcggc 1440
aggtgggggt gccgggcgg gcggggcggc ctcgggcccg ggagggctcg ggggaggggc 1500
gcggcgggcc ccggagcgcc ggcggtgtc gagcgcggc gagccgcagc cattgccttt 1560
tatggtaatc gtgcgagagg gcgcagggac ttctttgtc ccaaattctgt gcggagccga 1620
aatctgggag gcgcgcggc accccctcta gcgggcgcgg gcggaagcgg tcgggcgcg 1680
gcaggaagga aatgggcgg gagggccttc gtgcgtcgcc gcgcgcgct ccccttctcc 1740
ctctccagcc tcggggctgt ccgcgggggg acgctgcct tcggggggga cggggcaggg 1800
cgggggttcg cttctggcgt gtgaccggcg gctctagagc ctctgctaac catgttcag 1860
ccttcttctt ttctctacag ctctgggca acgtgctggt tattgtgctg tctcatcatt 1920
ttggcaaaga attcttcgaa agatctgcta gcttaattaa cccggtcgcc accatggtga 1980
gcaagggcga ggagctgttc accggggtgg tgccatcct ggtcgagctg gacggcgagc 2040
taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgagg cgatgccacc tacggcaagc 2100
tgaccctgaa gttcatctgc accaccggca agctgcccgt gccctggccc accctcgtga 2160
ccaccctgac ctacggcgtg cagtgcctca gccgtaccc cgaccacatg aagcagcacg 2220
acttcttcaa gtccgcatg cccgaaggct acgtccagga gcgcaccatc ttcttcaagg 2280
acgacggcaa ctacaagacc cgcgccgag tgaagttcga gggcgacacc ctggtgaacc 2340
gcacgagct gaaggcctc gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg 2400
agtacaacta caacagccac aacgtctata tcatggcgga caagcagaag aacggcatca 2460
aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc gccgaccact 2520
accagcagaa ccccccatc ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga 2580
gcacccagtc cgccctgagc aaagacccca acgagaagcg cgatcacatg gtccctgctg 2640
agtctgtgac cgccgcggg atcactctcg gcattggacg gctgtacctt ggaggcttgc 2700
tgaaggctgt atgctgttag acaatgattc acacgggtgt ttggccactg actgacaccg 2760

```

```

tgtgtcattg tctaacagga cacaaggcct gttactagca ctcacatgga acaaattggcc 2820
atgcatctag agggccctat tctatagtgt cacctaaatg ctagagctcg ctgatcagcc 2880
tcgactgtgc cttctagtgt ccagccatct gttgtttgcc cctccccctg gccttccttg 2940
accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcctcccat 3000
tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtgggggtg ggcaggacag caagggggag 3060
gattgggaag acaatagcag gcattgtggg gagctagagt cgaccggacc ggtggaagtc 3120
ctcttcctcg gtgtccttga cttcaaaggg tctctcccat ttgcctggag agaggggaag 3180
gtgggcatca ccaggggtga gtgaagggtt ggaagagtgt agcagaataa gaaacctga 3240
gtccccctcc tgagaagccc tgagccccct tgacgacaca catccctcga ggctcagctt 3300
catcatctgt aaaagggtgt gaaactgacc atccaagctg ccgaaaaaga ttgtgtgggg 3360
ataattcaaa actagaggaa gatgcagaat ttctacatcg tggcgatgtc aggctaagag 3420
atgcatcgtt ggctgtgcat ttttatttga atcatatgtt tatttgaggg tgtcttggat 3480
attacaaata aaatgttggg gcattcaggc tatttggtac cttctgtcta aggcctccctg 3540
ccccttggtt attggcagct cagttattca tccagggcaa acattctgct tactattcct 3600
gagagctttc ctcctcctct agattggcag gggaaatgca gatgcctgag cagcctcccc 3660
tctgccatac caacagagct tcaccatcga ggcattgcga gtggacaggg gcctcagggg 3720
cccctgatcc cagctttctc attggacaga aggaggagac tggggctgga gagggaacctg 3780
ggcccccaat aagccacag cagagccagg actttagctg tgctgactgc agcctggctt 3840
gcctccactg cctcctttt cctcaagagc aagggagcct cagagtggag gaagcagccc 3900
ctggccttgc ctcacacctc cctcccccta tgctgttttc ctgggacagt gggagctggc 3960
ttagaatgcc ctggggcccc caggacctg gcattttaac cctcagggg caggaaggca 4020
gcctgagata cagaagagtc catcacctgc tgtatgccac acaccatccc cacagttacg 4080
tactagtctg aagccacgag tccgaagggc gaattgtaga taagttagcat ggcggggtta 4140
tcattaaact caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct 4200
cgctcaactg ggcggggcga ccaaaggctg ccgagcggcc gggccttgcc cgggcggcct 4260
cagtgcagca gcgagcgcg agagagggag tggecaa 4297

```

<210> 14

<211> 132

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14

```

ctggaggctt gctgaaggct gtatgctgtt agacaatgat tcacacgggtg ttttggccac 60
tgactgacac cgtgtgtcat tgtctaacag gacacaaggc ctgttactag cactcacatg 120
gaacaaatgg cc 132

```

<210> 15

<211> 20

<212> ARN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15

ucgacaauga uucacacggu

20

<210> 16

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16

accguguguc auugucgaa

19

<210> 17

<211> 20

<212> ARN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 17

uagacgauga uucacacggu

20

<210> 18

<211> 19

<212> ARN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 18

accguguguc aucgucuaa

19

<210> 19

<211> 58

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 19

tagacaatga ttcacacggt gttttggcca ctgactgaca ccgtgtgtca ttgtctaa 58

<210> 20

<211> 63

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 20

tgctgtagac aatgattcac acggtgtttt ggccactgac tgacaccgtg tgtcattgtc 60
taa 63

<210> 21

<211> 63
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 21
 tgctgtcgac aatgattcac acggtgtttt ggccactgac tgacaccgtg tgtcattgtc 60
 gaa 63

<210> 22
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 22
 tgctgtagac gatgattcac acggtgtttt ggccactgac tgacaccgtg tgtcattgtc 60
 taa 63

<210> 23
 <211> 66
 <212> ARN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 23
 ugcuguagac aaugauucac acgguguuuu ggccacugac ugacaccgug ugucauuguc 60
 uacagg 66

<210> 24
 <211> 67
 <212> ARN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 24
 ugcuguagac aaugauucac acgguguuuu ggccacugac ugacaccgug ugucauuguc 60
 uaacagg 67

<210> 25
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 25
tcgacaatga ttcacacggt gttttggcca ctgactgaca ccgtgtgtca ttgtcgaa 58

<210> 26
<211> 58
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 26
tagacgatga ttcacacggt gttttggcca ctgactgaca ccgtgtgtca tcgtctaa 58