



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

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

(11)



1-0039477

(51)¹⁹ C12N 15/113; C12N 15/864; C12N
15/861; C12N 15/63; C12N 15/86

(13) B

(21) 1-2019-05185

(22) 02/03/2018

(86) PCT/US2018/020795 02/03/2018

(87) WO 2018/161053 07/09/2018

(30) 62/466,138 02/03/2017 US

(45) 25/04/2024 433

(43) 25/12/2019 381A

(73) MEIRAGTX, UK II Limited (GB)

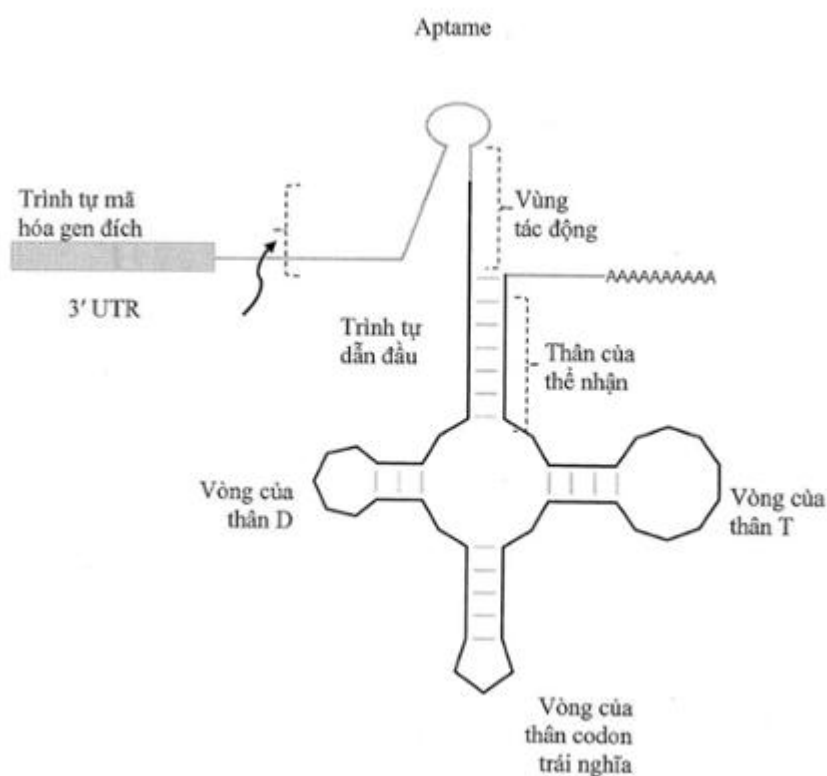
92 Britannia Walk, London, N1 7NQ, United Kingdom

(72) Xuecui GUO (CA).

(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) CATXET POLYNUCLEOTIT ĐỂ ĐIỀU HÒA SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÍCH,
PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU HÒA SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÍCH VÀ VECTƠ
CHỨA GEN ĐÍCH

(57) Sáng chế đề xuất catxet polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện của gen đích nhờ phân cắt bằng ribonucleaza điều biến bằng aptame gen đích ARN và các phương pháp sử dụng catxet polynucleotit này để điều biến sự biểu hiện gen đáp lại sự có mặt hoặc sự không có mặt của phối tử mà liên kết với aptame này. Catxet polynucleotit chứa trình tự của cơ chất ribonucleaza (ví dụ, cơ chất RNaza P) và công tắc ribo chứa vùng tác động và aptame sao cho khi aptame này liên kết với phối tử thì xảy ra sự biểu hiện của gen đích. Sáng chế còn đề xuất vectơ chứa gen đích mà chứa catxet polynucleotit nêu trên.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất các cấu trúc polynucleotit để điều biến sự biểu hiện của gen nhờ phân cắt ARN bằng ribonucleaza điều biến bằng aptame và các phương pháp sử dụng các cấu trúc này để điều biến sự biểu hiện gen đáp lại sự có mặt hoặc sự không có mặt của phối tử mà liên kết với aptame này. Cấu trúc polynucleotit chứa trình tự của cơ chất ribonucleaza và công tắc ribo chứa vùng tác động và aptame sao cho khi aptame này liên kết với phối tử thì xảy ra sự biểu hiện của gen đích.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ribonucleaza P (“RNaza P”) là phức ribonucleoprotein và thực hiện chức năng như endoribonucleaza mà loại bỏ các trình tự dẫn đầu 5' ra khỏi các tARN tiền chất để tạo ra các tARN thành thực bằng cách xúc tác quá trình thủy phân liên kết phosphodiester cụ thể. RNaza P được tìm thấy ở các loài thuộc tất cả các giới và được tạo ra bởi một cấu trúc siêu phân tử ARN và một protein (của vi khuẩn) hoặc nhiều protein (của Archaea và Eukarya). Các nghiên cứu về việc nhận diện cơ chất RNaza P đã cho thấy rằng enzym nhận diện cấu trúc không là trình tự nucleotit sơ cấp của các cơ chất, và có thể phân cắt cơ chất mô hình mà chứa cấu trúc tương đương với thân của thể nhận, thân T, trình tự dẫn 3' và trình tự dẫn đầu 5' của tiền chất tARN.

Việc phân cắt ARN thông tin đích bằng RNaza P được hoàn thành bằng cách biểu hiện trình tự hướng dẫn ngoài (external guide sequence - EGS), mà là trình tự được thiết kế để tạo ra phức lai với trình tự đích ARN thông tin mà giống tiền chất tARN. EGS liên kết với đích ARN thông tin của nó thông qua các tương tác ghép cặp bazơ và hướng dẫn việc phân cắt đích ARN thông tin bằng RNaza P. Việc sử dụng trình tự EGS để hướng đích việc phân cắt bằng RNaza P yêu cầu sự biểu hiện của trình tự EGS ngoại sinh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, sáng chế đề xuất các giải pháp để khắc phục các vấn đề kỹ thuật nêu trên trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất catxet polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện của gen đích chứa trình tự cơ chất của RNaza P được liên kết với công tắc ribo, trong đó công tắc ribo này chứa vùng tác động và aptame, trong đó vùng tác động chứa trình tự hỗ trợ cho một phần của trình tự cơ chất của RNaza P. Theo một phương án, aptame liên kết với phối tử phân tử nhỏ.

Theo các phương án của sáng chế, vùng tác động chứa trình tự có khả năng tạo nên cấu trúc thân sao khi phối tử liên kết aptame, trong đó thân của vùng tác động gồm 7 đến 12 cặp bazơ. Theo các phương án của sáng chế, thân của vùng tác động gồm 7, 8, 9, 10, 11, hoặc 12 cặp bazơ.

Theo một phương án, trình tự cơ chất của RNaza P chứa trình tự mã hóa tiền chất tARN hoặc trình tự tương đồng. Theo các phương án khác, trình tự đích của RNaza P chứa trình tự mã hóa tARN, ARN nhỏ ở tế bào chất liên kết với MALAT1 (mascARN), cấu trúc kiểu tARN MEN beta, cấu trúc kiểu tARN của virus, cơ chất mô hình của RNaza P, và các trình tự tương đồng mà có thể khơi mào quá trình phân cắt RNaza P.

Theo một phương án, trình tự aptame của catxet polynucleotit nằm ở phía 5' so với trình tự cơ chất của RNaza P và vùng tác động chứa trình tự hỗ trợ cho trình tự dẫn đầu của cơ chất RNaza P. Theo một phương án, trình tự aptame nằm ở phía 5' so với trình tự cơ chất của RNaza P và vùng tác động chứa toàn bộ hoặc một phần của trình tự dẫn đầu và toàn bộ hoặc một phần của trình tự thân của thể nhận 5' của trình tự cơ chất của RNaza P. Theo một phương án khác nữa, thân của thể nhận của cơ chất RNaza P và vùng tác động công tắc ribo được tách bởi 0, 1, 2, 3, hoặc 4 nucleotit. Theo các phương án khác, thân của vùng tác động bao gồm, ngoài trình tự dẫn đầu (và hỗ trợ của nó), một hoặc nhiều nucleotit của thân của thể nhận của cơ chất RNaza P, và trình tự hỗ trợ cho một hoặc nhiều nucleotit của thân của thể nhận.

Theo một phương án, trình tự aptame của catxet polynucleotit nằm ở phía 3' so với trình tự cơ chất của RNaza P và vùng tác động chứa trình tự hỗ trợ cho toàn bộ hoặc một phần của thân của thể nhận 3' của trình tự cơ chất của RNaza P. Theo một phương án khác nữa, trình tự của vùng tác động hỗ trợ cho thân của thể nhận 3' của cơ chất RNaza P gồm 1 đến 7 nucleotit. Nói cách khác, thân vùng tác động bao gồm 1 đến 7

nucleotit của thân của thể nhận và bao gồm trình tự mà hỗ trợ cho 1 đến 7 nucleotit này của thân của thể nhận.

Theo một phương án, công tắc ribo nằm ở phía 3' của cơ chất RNaza P sao cho thân vùng tác động và thân của thể nhận của cơ chất RNaza P không chồng chập. Theo các phương án, vùng tác động và thân của thể nhận của cơ chất RNaza P là ngay liền kề (tức là không chồng chập). Theo các phương án khác, vùng tác động và thân của thể nhận của cơ chất RNaza P được tách bởi 1, 2, 3, 4, 5 hoặc nhiều nucleotit.

Theo một phương án, trình tự của công tắc ribo nằm trong vòng thân của trình tự cơ chất của RNaza P. Theo một phương án, trình tự của công tắc ribo nằm trong vòng thân D của trình tự cơ chất của RNaza P. Theo một phương án, trình tự của công tắc ribo nằm trong vòng thân T của trình tự cơ chất của RNaza P. Theo một phương án, trình tự của công tắc ribo nằm trong vòng dễ biến đổi của trình tự cơ chất của RNaza P. Theo một phương án, trình tự của công tắc ribo nằm trong vòng thân của codon đối nghĩa của trình tự cơ chất của RNaza P.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều biến sự biểu hiện của gen đích bao gồm các bước: (a) cài xen catxet polynucleotit theo sáng chế vào vùng chưa được dịch mã (UTR) của gen đích; (b) đưa gen đích chứa catxet polynucleotit vào tế bào, và (c) cho tế bào tiếp cận với phối tử mà liên kết một cách đặc hiệu với aptame với lượng hữu hiệu để tăng mức độ biểu hiện của gen đích. Theo một phương án, phối tử là phân tử nhỏ.

Theo một phương án, catxet polynucleotit được cài xen vào vùng 5' chưa được dịch mã của gen đích. Theo một phương án, catxet polynucleotit được cài xen vào vùng 3' chưa được dịch mã của gen đích. Theo một phương án, catxet polynucleotit được cài xen vào intron của gen đích.

Theo một phương án, hai hoặc nhiều catxet polynucleotit được cài xen vào gen đích. Theo một phương án, hai hoặc nhiều catxet polynucleotit bao gồm các aptame khác nhau mà liên kết một cách đặc hiệu với các phối tử phân tử nhỏ phối tử khác nhau. Theo một phương án, hai hoặc nhiều catxet polynucleotit bao gồm cùng một aptame. Theo một phương án, hai hoặc nhiều catxet polynucleotit là ở vùng 5' chưa được dịch mã của gen đích, vùng 3' chưa được dịch mã, hoặc cả hai vùng này.

Theo một khía cạnh, catxet polynucleotit theo sáng chế được sử dụng kết hợp với các cơ chế khác để điều hòa sự biểu hiện của gen đích. Theo một phương án, catxet polynucleotit theo sáng chế được sử dụng kết hợp với catxet điều hòa gen mà điều biến sự biểu hiện của gen đích bằng cách điều hòa gián tiếp qua aptame cách ghép nối khác như được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO2016/126747 (PCT/US2016/016234), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Theo các phương án khác, catxet polynucleotit theo sáng chế được sử dụng kết hợp với catxet điều hòa gen mà điều biến sự biểu hiện của gen đích bằng cách điều hòa gián tiếp qua aptame các ribozym tự phân cắt như được bộc lộ trong PCT/US2017/016303, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Theo các phương án khác, catxet polynucleotit theo sáng chế được sử dụng kết hợp với catxet điều hòa gen mà điều biến sự biểu hiện của gen đích bằng cách điều biến gián tiếp qua aptame sự polyadenyl hóa như được bộc lộ trong PCT/US2017/016279, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Theo các phương án khác, catxet polynucleotit theo sáng chế được sử dụng kết hợp với catxet điều hòa gen mà điều biến sự biểu hiện của gen đích nhờ khả năng tiếp cận với các tín hiệu polyadenyl hóa gián tiếp qua aptame như được bộc lộ trong PCT/US2018/019056, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án, gen đích chứa catxet polynucleotit được tích hợp vào vector để biểu hiện gen đích. Theo một phương án, vector là vector virus. Theo một phương án, vector virus được chọn từ nhóm bao gồm vector adenovirus, vector virus kết hợp adeno, và vector lentivirus.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vector chứa gen đích mà chứa catxet polynucleotit theo sáng chế. Theo một phương án, vector là vector virus. Theo một phương án, vector virus được chọn từ nhóm bao gồm vector adenovirus, vector virus kết hợp adeno, và vector lentivirus.

Theo một phương án, gen đích chứa catxet polynucleotit được kết hợp vào cấu trúc biểu hiện hoặc vector thỏa hiệp gen khởi đầu không đặc hiệu với mô. Theo các phương án khác, gen khởi đầu là đặc hiệu với mô.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1a. Sơ đồ của một phương án, trong đó catxet polynucleotit được cài xen vào vùng 3' chưa được dịch mã (UTR) của gen đích. Theo một phương án này, trình tự tác động

của công tắc ribo bao gồm trình tự hỗ trợ cho trình tự dẫn đầu. Khi không phối tử nào có mặt, trình tự tác động không tạo nên thân mà bao gồm trình tự dẫn đầu. Trình tự dẫn đầu là dễ tiếp cận đối với RNaza P và ARN được phân cắt dẫn đến sự thoái biến và phòng tránh (hoặc làm giảm) sự biểu hiện của gen đích.

Hình 1b. Sơ đồ của catxet polynucleotit từ Hình 1a với phối tử (♦) liên kết với aptame. Khi phối tử có mặt, trình tự tác động tạo nên thân mà bao gồm trình tự dẫn đầu của cơ chất RNaza. Trình tự dẫn đầu không còn dễ truy cập được, và sự phân cắt ARN bằng RNaza P bị ức chế, khiến tăng mức độ biểu hiện của gen đích.

Hình 2a. Phân tích vết thăm Bắc đối với mascARN. Trình tự mã hóa mascARN được cài xen vào 3' UTR của gen đích (GFP) dẫn đến sự phân cắt ARN thông tin và mức độ biểu hiện protein giảm. Các tế bào HeLa được chuyển nhiễm với các cấu trúc đã được chỉ định được gom 24 giờ hoặc 48 giờ sau khi chuyển nhiễm để chiết ARN. Mẫu đã được đánh dấu bằng DIG nhận diện cả hai mascARN của người và của chuột. Đường 1 và 4 thể hiện mascARN nội sinh người, và các đường 2 và 5 thể hiện mức độ biểu hiện mascARN tăng được tạo ra bởi mascARN của chuột nhất đã được cài xen vào 3' UTR của gen thông báo GFP.

Hình 2b. Cài xen mascARN vào 5' UTR hoặc 3' UTR làm giảm mức độ biểu hiện GFP. Các tế bào HeLa được chuyển nhiễm với các cấu trúc đã được chỉ định và được phân tích đếm tế bào theo dòng chảy 48 giờ sau khi chuyển nhiễm. Tỷ lệ phần trăm (%) quần thể dương tính với GFP, cũng như cường độ phát quang trung bình (MFI), được thể hiện trên đồ thị. Các tế bào được chuyển nhiễm với các cấu trúc với mascARN ở 3' UTR (GFP-masc), 5' UTR (masc-GFP), hoặc ở cả hai 5' UTR và 3' UTR (masc-GFP-masc) làm giảm cả hai tỷ lệ phần trăm của các tế bào dương tính với GFP và MFI, so với các tế bào với cấu trúc CMV-GFP đối chứng.

Hình 2c. Cài xen mascARN vào 3' UTR làm giảm mức biểu hiện của gen đích của luxiferaza. mascARN của chuột (SEQ ID NO: 17) hoặc mascARN của chuột đột biến (SEQ ID NO: 18, trong bản mô tả này còn được gọi là masc-mlp) được cài xen vào 3' UTR của gen luxiferaza. Cấu trúc bậc hai kiểu tARN đã được dự đoán của mascARN của chuột nhất được thể hiện ở mảng phía trên, với đột biến ở vòng móc T từ UUC sang AAG đã chỉ định. Mảng phía dưới thể hiện kết quả của thử nghiệm luxiferaza. Cài xen

mascARN vào 3' UTR khiến giảm 81% mức độ biểu hiện luxiferaza (Luci-masc), trong khi các tế bào với cấu trúc chứa các đột biến ở vòng móc T của mascARN (Luci-masc-mlp) chỉ thể hiện mức giảm 20% về mức độ biểu hiện luxiferaza.

Hình 3a. Sơ đồ của bản sao của ARN thông tin từ catxet polynucleotit MG1 (SEQ ID NO: 1).

Hình 3b. Sơ đồ của bản sao của ARN thông tin từ catxet polynucleotit GM1 (SEQ ID NO: 2).

Hình 3c. Điều hòa sự biểu hiện gen thông qua việc phân cắt ARN thông tin bằng RNaza P gián tiếp nhờ aptame. Kết quả của thử nghiệm luxiferaza được thể hiện. Các tế bào HEK 293 được chuyển nhiễm với cấu trúc đối chứng luxiferaza đã được chỉ định, Con8, hoặc các cấu trúc chứa cả trình tự mascARN và trình tự aptame guanin (MG1, GM1, GM2 (SEQ ID NO: 3) và GM3 (SEQ ID NO: 4)). Các tế bào đã chuyển nhiễm được xử lý bằng dung môi đối chứng là DMSO hoặc phối tử aptame là guanosin. Khi không có xử lý bằng guanosin, các tế bào được chuyển nhiễm với cấu trúc MG1, GM1 hoặc GM2 thể hiện mức biểu hiện luxiferaza khi được so sánh với các tế bào đã được chuyển nhiễm với cấu trúc đối chứng. Các tế bào đã được xử lý bằng guanosin có MG1, GM1 hoặc GM2, nhưng không có GM3, làm tăng mức độ biểu hiện luxiferaza. Hoạt tính của luxiferaza được thể hiện ở dạng trung bình $\pm$ S.D. (n=3), và số lần cảm ứng được thể hiện ở dạng thương số của hoạt tính của luxiferaza thu được khi có guanosin chia cho trị số thu được khi không có guanosin.

Hình 4a. Thay đổi về trình tự tại chỗ nằm trước (5') của thân aptame này tác động đến hoạt tính của công tắc ribo ở các cấu trúc GM. Hoạt tính của luxiferaza được đo ở các tế bào HEK 293 đã được chuyển nhiễm với các cấu trúc đã chỉ định và được xử lý bằng hoặc không bằng guanosin. GM4 (SEQ ID NO: 5) có thay đổi 3 nucleotit so với GM1, trong đó ba nucleotit 5' của thân aptame này được thay đổi để làm giảm tiềm năng ghép cặp bazơ bổ sung bằng các nucleotit này.

Hình 4b. Khoảng cách giữa aptame và cơ chất của RNaza P tác động đến hoạt tính của công tắc ribo ở các cấu trúc GM. Vị trí của aptame/vùng tác động này ở các cấu trúc GM được chuyển dịch về phía trước (5') với các số gia một nucleotit so với mascARN cho phép 0 đến 3 nucleotit (lần lượt các cấu trúc GM5 đến GM8 (SEQ ID NO: 7 đến

10),) của trình tự dẫn đầu mà không là một phần của thân vùng (aptame) tác động. Hoạt tính của luxiferaza, được thể hiện ở dạng trung bình $\pm$ S.D., được đo từ các tế bào HEK 293 đã được chuyển nhiễm với các cấu trúc đã được chỉ định và được xử lý bằng hoặc không bằng guanin và ($n=3$). Số lần cảm ứng được thể hiện ở dạng thương số của hoạt tính của luxiferaza thu được khi có guanin chia cho trị số thu được khi không có guanin. Cấu trúc GM5, khi không có khoảng trống giữa hai cấu trúc này, phân cắt gián tiếp nhờ RNaza P một cách hiệu quả hơn như được thể hiện bằng mức độ biểu hiện luxiferaza gốc thấp hơn so với cấu trúc GM4.

Hình 4c. Tác động của chiều dài của vùng tác động công tắc ribo mà là hỗ trợ cho thân của thể nhận của cơ chất RNaza ở các cấu trúc MG. Các cấu trúc MG1 đến MG4 được tạo ra có thân vùng tác động lần lượt gồm 6 đến 3 nucleotit, mà là hỗ trợ cho thân của thể nhận của mascARN (mỗi cấu trúc với thân của vùng tác động gồm tổng cộng 8bp). MG3 (SEQ ID NO: 12) và MG4 (SEQ ID NO: 13) phân cắt bằng RNaza P hiệu quả hơn chút so với MG1, và cảm ứng luxiferaza hiệu quả hơn sau khi được xử lý bằng guanin.

Hình 5. Sự phân cắt bằng RNaza P được điều biến bằng aptame xpt-guanin gián tiếp thông qua tARN^{Arg} của người làm cơ chất của RNaza P. Hoạt tính của luxiferaza được đo từ các tế bào HEK 293 đã được chuyển nhiễm với cấu trúc đối chứng Con8, GM1 (chứa mascARN) hoặc GArg (SEQ ID NO: 14) (chứa tARN^{Arg} của người). Các tế bào đã chuyển nhiễm được xử lý bằng hoặc không bằng guanin và hoạt tính của luxiferaza được đo và được thể hiện ở dạng trung bình $\pm$ S.D. ($n=3$). Số lần cảm ứng được thể hiện ở dạng thương số của hoạt tính của luxiferaza thu được khi có guanin chia cho trị số thu được khi không có guanin.

Các hình 6a và 6b. Các công tắc ribo với aptame theophylin hoặc aptame adenin điều biến sự phân cắt ARN thông tin gián tiếp nhờ mascARN-RNaza P. Hoạt tính của luxiferaza được đo từ các tế bào HEK 293 đã được chuyển nhiễm với cấu trúc đối chứng Con8, cấu trúc TheoM (SEQ ID NO: 16), chứa aptame theophylin và mascARN (hình 6a), hoặc cấu trúc YM (SEQ ID NO: 15) chứa aptame ydhl-A adenin và mascARN (hình 6b). Các tế bào đã chuyển nhiễm được xử lý bằng hoặc không bằng 3mM theophylin hoặc 1mM adenin, và hoạt tính của luxiferaza được đo và được thể hiện ở

dạng trung bình $\pm$ S.D. ($n=3$). Số lần cảm ứng được thể hiện ở dạng thương số của hoạt tính của luxiferaza thu được khi có phối tử aptame chia cho trị số thu được khi không có aptame phối tử.

Các hình 7a và 7b. Sử dụng kết hợp công tắc ribo dựa trên cơ chất của RNaza P với công tắc ribo thứ hai để điều hòa nghiêm ngặt hơn mức độ biểu hiện của gen đích. Hoạt tính của luxiferaza được đo từ các tế bào HEK 293 đã được chuyển nhiễm với cấu trúc G15 hoặc GM1-G15 (hình 7a), hoặc cấu trúc G17 hoặc GM1-G17 (hình 7b). Các tế bào đã chuyển nhiễm được xử lý bằng hoặc không bằng 500 μ M guanin, và hoạt tính của luxiferaza được đo và được thể hiện ở dạng trung bình $\pm$ S.D. ($n=3$). Số lần cảm ứng được thể hiện ở dạng thương số của hoạt tính của luxiferaza thu được khi có guanin chia cho trị số thu được khi không có guanin.

Hình 7c. Sử dụng kết hợp công tắc ribo dựa trên cơ chất của RNaza P với công tắc ribo thứ hai để điều hòa nghiêm ngặt hơn sự biểu hiện của gen đích Epo. Sự biểu hiện của protein Epo của chuột được đo bằng cách áp dụng ELISA từ dịch nổi gom được từ các tế bào HEK 293 đã được chuyển nhiễm với cấu trúc G17_2IR3 hoặc cấu trúc GM1-G17_2IR3. Nồng độ của Epo được thể hiện ở dạng trung bình $\pm$ S.D. ($n=3$), và số lần cảm ứng được thể hiện ở dạng thương số của nồng độ của Epo thu được khi có guanin chia cho nồng độ của Epo thu được khi không có guanin.

Hình 8. Các trình tự của các cấu trúc được bộc lộ trong bản mô tả này. Đầu tận cùng 3' của trình tự mã hóa gen đích (ví dụ, của con đom đóm luxiferaza) được thể hiện bằng chữ in hoa; mascARN hoặc trình tự tARN^{Arg} được thể hiện bằng các chữ cái nhỏ in nghiêng và được tạo bóng màu xám; trình tự của aptame được gạch chân bằng đường sóng. Các trình tự mà tạo nên thân vùng tác động được gạch chân hai lần.

Mô tả chi tiết sáng chế

Đơn yêu cầu đăng ký sáng chế này yêu cầu hưởng quyền ưu tiên của đơn tạm thời Mỹ số 62/466,138, nộp ngày tháng 3 năm 2, 2016, mà được kết hợp hoàn toàn vào đây. Đơn yêu cầu đăng ký sáng chế này viện dẫn đến Danh mục Trình tự nêu ở các SEQ ID NO được liệt kê dưới đây, mà chúng được cung cấp ở dạng tài liệu điện tử và được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn.

Việc điều hòa sự biểu hiện của gen đích (ví dụ, gen chuyển có tính chất chữa trị bệnh) là hữu dụng hoặc cần thiết trong nhiều tình huống. Trong phạm vi sự biểu hiện có tác dụng điều trị bệnh của gen, các kỹ thuật mà cho phép điều hòa sự biểu hiện của các gen chuyển có tiềm năng nâng cao mức an toàn bằng cách điều hòa mức độ biểu hiện và thời điểm của nó. Hệ đã được điều hòa để kiểm soát sự biểu hiện của protein có vai trò thực tế và, trong một vài trường hợp, vai trò quan trọng đối với các ứng dụng điều trị an toàn và hữu hiệu. Sáng chế đề xuất các catxet polynucleotit để điều biến sự biểu hiện của gen đích nhờ phân cắt ARN của gen đích bằng ribonucleaza gián tiếp nhờ aptame và các phương pháp sử dụng các catxet polynucleotit để điều biến sự biểu hiện của gen đích đáp lại sự có mặt hoặc sự không có mặt của phối tử mà liên kết với aptame này. Ví dụ, việc phân cắt ARN thông tin làm hai nửa bằng cách thủy phân các liên kết giữa các nucleotit khiến mất chóp ở đầu tận cùng 5' hoặc đuôi poly A ở đầu tận cùng 3', dẫn đến sự thoái biến của ARN thông tin thông qua chu trình exosom ARN. Do đó, sáng chế đề xuất catxet điều hòa gen mà có thể được sử dụng để điều hòa sự biểu hiện của gen đích bằng cách cấp phối tử aptame. Các phương pháp này là hữu ích, ví dụ, để nghiên cứu sự biểu hiện của gen đích ở tế bào, mô, và các sinh vật, hoặc để điều hòa mức độ biểu hiện của protein có hoạt tính trị liệu.

Thuật ngữ catxet điều hòa gen polynucleotit được dùng để chỉ cấu trúc ADN tái tổ hợp mà khi được kết hợp vào ADN của gen đích, đem lại khả năng điều hòa sự biểu hiện của gen đích bằng cách phân cắt ARN thu được nhờ ribonucleaza gián tiếp qua aptame/phối tử. Như được dùng trong bản mô tả này, cấu trúc hoặc catxet polynucleotit là axit nucleic (ví dụ, ADN hoặc ARN) chứa các yếu tố thu được từ các nguồn khác nhau (ví dụ, các sinh vật khác nhau, các gen khác nhau từ cùng một sinh vật, và các nguồn tương tự). Catxet polynucleotit chứa công tắc ribo và trình tự cơ chất của ribonucleaza. Công tắc ribo trong phạm vi của sáng chế chứa vùng cảm giác (ví dụ, aptame) và vùng tác động mà cùng chịu trách nhiệm về việc cảm nhận sự có mặt của phối tử mà liên kết vùng cảm giác và làm thay đổi sự phân cắt của trình tự cơ chất của ribonucleaza bằng ribonucleaza. Theo một phương án, mức độ biểu hiện của gen đích tăng khi phối tử aptame có mặt và giảm khi phối tử này không có mặt.

Cơ chất của ribonucleaza

Trình tự của cơ chất của ribonucleaza mà được liên kết với công tắc ribo có thể là cơ chất bất kỳ của ribonucleaza mà hướng đích ribonucleaza nhằm phân cắt ARN đích khi được cài xen vào gen đích làm một phần của catxet điều hòa gen polynucleotit. Theo một phương án, cơ chất của ribonucleaza là trình tự cơ chất của RNaza P như tiền chất tARN hoặc trình tự tương đồng. Theo các phương án khác, trình tự cơ chất của RNaza P chứa trình tự mã hóa mascARN; cấu trúc kiểu tARN MEN beta (*xem: Sunwoo et al. Genome Research* 2009, 19:347-359; Wilusz *et al., Genes Dev.* 2012, 26(21):2392-407, cả hai đều được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), cấu trúc kiểu tARN của virus, cơ chất mô hình của RNaza P, và các trình tự tương đồng mà có thể khởi mào quá trình phân cắt RNaza P. Yuan và Altman, trong một bài báo đã được công bố trong *The EMBO Journal* (vol. 14, pp. 159-168, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), mô tả các trình tự mô hình của cơ chất của RNaza P bao gồm, ví dụ, tiền tARN tyrosin với vòng móc D hoặc vòng codon đối nghĩa bị xóa bỏ (ví dụ, xem các hình 1 đến 4, Bảng 1, và phần văn bản của Yuan và Altman kèm theo).

Công tắc ribo

Thuật ngữ “công tắc ribo” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ phân đoạn có tính điều hòa của polynucleotit của ARN, hoặc trình tự ADN mã hóa phân đoạn có tính điều hòa của polynucleotit của ARN. Công tắc ribo trong phạm vi của sáng chế chứa vùng cảm giác (ví dụ, aptame) và vùng tác động mà cùng chịu trách nhiệm về việc cảm nhận sự có mặt của phối tử (ví dụ, phân tử nhỏ) và điều biến sự phù hợp của trình tự cơ chất của ribonucleaza để phân cắt bởi ribonucleaza. Theo một phương án, ribonucleaza là RNaza P. Theo một phương án, công tắc ribo là tái tổ hợp, sử dụng các polynucleotit từ hai hoặc nhiều nguồn. Thuật ngữ “tổng hợp” được dùng trong bản mô tả này trong phạm vi công tắc ribo để chỉ công tắc ribo mà không có trong tự nhiên. Theo một phương án, vùng cảm giác và vùng tác động được kết hợp nhờ nhóm liên kết polynucleotit. Theo một phương án, nhóm liên kết polynucleotit tạo nên thân ARN (tức là vùng của polynucleotit của ARN mà là sợi đôi).

Phần aptame của công tắc ribo có thể nằm ở đầu tận cùng 5', đầu tận cùng 3', và/hoặc trong vòng thân của cơ chất RNaza P. Khi aptame được liên kết với đầu tận cùng 5' của trình tự cơ chất của RNaza P, thì vùng tác động của công tắc ribo có thể bao

gồm trình tự mà là hỗ trợ cho toàn bộ hoặc một phần của trình tự dẫn đầu của cơ chất của RNaza P (ví dụ, xem các hình 1a, 1b và 3b). Trong cấu hình này (tức là công tắc ribo ở đầu tận cùng 5' của nền), vùng tác động của công tắc ribo có thể còn bao gồm trình tự mà là hỗ trợ cho toàn bộ hoặc một phần của trình tự thân của thể nhận ở đầu tận cùng 5' của cơ chất RNaza P (ví dụ, như ở các cấu trúc GM1 và GM2).

Khi phần aptame của công tắc ribo nằm tại đầu tận cùng 3' của cơ chất RNaza P (như ở các cấu trúc MG1 đến 4) vùng tác động chứa trình tự mà là hỗ trợ cho toàn bộ hoặc một phần của trình tự thân của thể nhận ở đầu tận cùng 3' của cơ chất RNaza P. Theo các phương án khác, phần aptame của công tắc ribo nằm ở vòng thân của trình tự cơ chất của RNaza P. Theo một số phương án, phần aptame của công tắc ribo trình tự nằm ở vòng thân D, vòng thân T, vòng thân codon đối nghĩa, hoặc vòng biến đổi của trình tự cơ chất của RNaza P. Khi công tắc ribo nằm ở vòng thân D, vùng tác động có thể bao gồm toàn bộ hoặc một phần của thân D. Tương tự, khi aptame nằm ở vòng thân T, vòng thân codon đối nghĩa, hoặc vòng biến đổi vùng tác động có thể bao gồm toàn bộ hoặc một phần lần lượt của thân T, thân codon đối nghĩa, hoặc thân của vòng biến đổi.

Vùng tác động

Vùng tác động của công tắc ribo chứa trình tự ARN mà đáp lại liên kết phối tử vùng cảm giác (ví dụ, aptame), làm thay đổi mức độ miễn cảm của cơ chất của ribonucleaza đối với sự phân cắt bằng ribonucleaza. Theo một phương án, vùng tác động chứa toàn bộ hoặc một phần của trình tự dẫn đầu của trình tự cơ chất của RNaza P. Theo một phương án này, thân vùng tác động chứa một vài hoặc tất cả trình tự dẫn đầu và trình tự mà là hỗ trợ cho một vài hoặc tất cả trình tự dẫn đầu. Khi aptame này liên kết với phối tử của nó, thì vùng tác động tạo nên thân mà bao gồm trình tự dẫn đầu nhờ đó ngăn cản sự phân cắt ARN đích bởi RNaza P (ví dụ, xem hình 1b). Trong các điều kiện nhất định (ví dụ, khi aptame không được liên kết với phối tử của nó), vùng tác động ở trong bối cảnh mà cho tiếp cận đến trình tự dẫn đầu dẫn đến sự phân cắt bởi RNaza P (ví dụ, xem hình 1a và Hình 3b). Theo các phương án khác, thân của vùng tác động bao gồm, ngoài trình tự dẫn đầu (và hỗ trợ của nó), một hoặc nhiều nucleotit của thân của thể nhận của cơ chất RNaza P, và trình tự hỗ trợ cho một hoặc nhiều nucleotit

của thân của thể nhận (như ở các cấu trúc GM1 và GM2). Theo một trong số các phương án khác, có 1 hoặc nhiều nucleotit của trình tự dẫn đầu 3' của cơ chất RNaza P mà không là một phần của thân vùng tác động (ví dụ, xem các cấu trúc GM6, GM7 và GM8). Nói cách khác, theo các phương án này, trình tự tạo nên thân của vùng tác động và trình tự tạo nên thân của thể nhận của cơ chất RNaza P không chồng lấn và có thể được tách bởi 0, 1, 2, 3, hoặc 4 nucleotit.

Theo một số phương án, vùng tác động chứa một phần hoặc toàn bộ thân của thể nhận của trình tự cơ chất của RNaza P (ví dụ, xem hình 3a). Theo một phương án này, thân của vùng tác động chứa một phần hoặc toàn bộ trình tự thân của thể nhận và trình tự mà là bổ trợ cho một phần hoặc toàn bộ trình tự thân của thể nhận. Khi aptame này liên kết với phối tử của nó, thì vùng tác động tạo nên thân mà bao gồm trình tự thân của thể nhận bằng cách đó phá vỡ cấu trúc thân của thể nhận và ngăn cản sự phân cắt ARN đích bởi RNaza P. Trong các điều kiện nhất định (ví dụ, khi aptame không được liên kết với phối tử của nó), vùng tác động ở bối cảnh mà cho phép cấu trúc thân của thể nhận dẫn đến sự phân cắt bởi RNaza P. Theo các phương án của sáng chế, thân của vùng tác động chứa 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 nucleotit của thân của thể nhận của cơ chất RNaza P và trình tự bổ trợ. Theo các phương án khác, vùng tác động chứa toàn bộ hoặc một phần của thân của vòng thân D, vòng thân T, vòng biến đổi, hoặc vòng thân codon đối nghĩa.

Một phần của vùng tác động mà có khả năng tạo nên thân sau khi phối tử liên kết với aptame nên có đủ chiều dài (và hàm lượng GC) để về cơ bản ngăn cản sự phân cắt cơ chất bởi ribonucleaza sau khi phối tử liên kết với aptame, trong khi cũng cho phép cơ chất của ribonucleaza được phân cắt bởi ribonucleaza khi phối tử không có mặt với lượng đủ. Theo các phương án của sáng chế, phần thân của vùng tác động chứa trình tự thân ngoài trình tự cơ chất của ribonucleaza và trình tự bổ trợ của nó. Theo một số phương án, trình tự thân bổ sung này chứa trình tự từ thân aptame. Chiều dài và trình tự của thân của vùng tác động có thể được cải biến bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết để xác định các thân mà cho phép biểu hiện gen đích ở mức nền chấp nhận được khi không phối tử nào có mặt và biểu hiện gen đích ở mức chấp nhận được khi phối tử có mặt. Nếu thân vùng tác động, ví dụ, là quá dài thì nó có thể giấu sự tiếp cận đến trình

tự dẫn đầu, hoặc nói cách khác ngăn cản cơ chất bị phân cắt bởi ribonucleaza khi có hoặc không có phối tử. Nếu thân là quá ngắn, thì nó không thể tạo nên thân ổn định có khả năng càng hóa trình tự dẫn đầu (hoặc nói cách khác không thể làm thay đổi cấu hình của cơ chất) trong trường hợp đó ARN đích sẽ bị phân cắt khi có hoặc không có phối tử. Theo một phương án, tổng chiều dài của thân vùng tác động nằm trong khoảng từ 7 cặp bazơ đến 20 cặp bazơ. Theo một số phương án, chiều dài của thân nằm trong khoảng từ 8 cặp bazơ đến 11 cặp bazơ. Theo một số phương án, chiều dài của thân là 8 cặp bazơ đến 11 cặp bazơ. Ngoài chiều dài của thân, hàm lượng cặp bazơ GC của thân cũng có thể được thay đổi để cải biến mức độ ổn định của thân.

Aptame/Phối tử

Theo một phương án, vùng cảm giác chứa aptame. Thuật ngữ “aptame” được dùng trong bản mô tả này để chỉ polynucleotit của ARN mà liên kết một cách đặc hiệu với phối tử. Thuật ngữ “phối tử” được dùng để chỉ phân tử mà được liên kết một cách đặc hiệu bởi aptame. Theo một phương án, phối tử là phân tử nhỏ, tức là phân tử có phân tử lượng thấp (thấp hơn khoảng 1.000 dalton) bao gồm, ví dụ, lipid, monosacarit, thể mang thông tin thứ hai, đồng tác nhân, ion kim loại, sản phẩm tự nhiên và chất chuyển hóa khác, axit nucleic, cũng như hầu hết các thuốc điều trị bệnh. Theo một phương án, phối tử là polynucleotit gồm 2 hoặc nhiều bazơ nucleotit.

Theo một phương án, phối tử được chọn từ nhóm bao gồm 8-azaguanin, adenosin 5'-monophosphat monohydrat, amphoterixin B, avermectin B1, azathioprin, clomadinon axetat, mercaptopurin, moricizin hydroclorua, N6-metyladenosin, nadit, progesteron, promazin hydroclorua, pyrvinium pamoat, sulfaguanidin, testosteron propionat, thioguanosin, tyloxapol và vorinostat.

Các phối tử aptame còn có thể là các thành phần nội sinh của tế bào mà tăng ở mức độ đáng kể trong các điều kiện sinh lý/bệnh lý cụ thể, như biến nạp gây ung thư – chúng có thể bao gồm các phân tử mang thông tin thứ hai như GTP hoặc GDP, canxi; các axit béo, hoặc các axit béo mà không được chuyển hóa một cách thích hợp như 13-HODE ở ung thư vú (Flaherty, JT *et al.*, *Plos One*, Vol. 8, e63076, 2013, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn); các axit amin hoặc các chất chuyển hóa của axit amin; các chất chuyển hóa trong chu trình đường phân mà thường có nồng độ cao hơn trong các

tế bào ung thư hoặc trong các tế bào bình thường ở các bệnh chuyển hóa; và các phân tử liên quan đến ung thư như Ras hoặc protein Ras đột biến, EGFR đột biến ở ung thư phổi, indolamin-2,3-đioxygenaza (IDO) ở nhiều loại ung thư. Các phối tử nội sinh bao gồm các chất chuyển hóa progesteron ở ung thư vú như đã bộc lộ bởi JP Wiebe (*Endocrine-Related Cancer* (2006) 13:717–738, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các phối tử nội sinh còn bao gồm các chất chuyển hóa với nồng độ cao hơn thu được từ các đột biến ở các enzym chuyển hóa then chốt ở ung thư thận như lactat, glutathion, kynurenin như đã bộc lộ bởi Minton, DR và Nanus, DM (*Nature Reviews, Urology*, Vol. 12, 2005, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Các aptame có các vùng liên kết mà có khả năng tạo phức với phân tử đích dự tính (tức là phối tử). Tính đặc hiệu của liên kết có thể được xác định theo hằng số phân ly tương đối (K_d) của aptame này đối với phối tử của nó như được so với hằng số phân ly của aptame này đối với các phân tử không liên quan. Do đó, phối tử là phân tử mà liên kết với aptame với ái lực cao hơn so với liên kết với nguyên liệu không liên quan. Nói chung, K_d cho aptame liên quan đến phối tử của nó sẽ thấp hơn ít nhất là khoảng 10 lần K_d đối với aptame với các phân tử không liên quan. Theo các phương án khác, K_d sẽ thấp hơn ít nhất là khoảng 20 lần, thấp hơn ít nhất là khoảng 50 lần, thấp hơn ít nhất là khoảng 100 lần, và thấp hơn ít nhất là khoảng 200 lần. Aptame sẽ thường có chiều dài nằm trong khoảng từ 15 đến 200 nucleotit. Thông thường hơn, aptame sẽ thường có chiều dài nằm trong khoảng từ 30 đến 100 nucleotit.

Các aptame mà có thể được kết hợp vào làm một phần của công tắc ribo có thể là aptame có trong tự nhiên, hoặc các cải biến của chúng, hoặc các aptame mà được thiết kế de novo và/hoặc được sàng lọc thông qua quá trình tiến hóa hệ thống của các phối tử bằng cách làm giàu theo số mũ (SELEX) hoặc các phương pháp sàng lọc khác. Các ví dụ về các aptame mà liên kết với các phối tử phân tử nhỏ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, theophylin, dopamin, sulforodamin B, xelobioza, kanamycin A, lividomycin, tobramycin, neomycin B, viomycin, cloramphenicol, streptomycin, các xytokin, các phân tử bề mặt của tế bào, và các chất chuyển hóa. Ví dụ, xem tổng quan về các aptame mà nhận diện các phân tử nhỏ: Famulok, *Science* 9:324-9 (1999) và

McKeague, M. & DeRosa, M.C. *J. Nuc. Aci.* 2012 (cả hai tài liệu này đều được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Theo một phương án khác, aptame là polynucleotit hỗ trợ.

Phương pháp xác định aptame/phối tử

Theo một phương án, aptame được thiết kế để liên kết với phối tử phân tử nhỏ cụ thể. Các phương pháp thiết kế và chọn lọc các aptame mà liên kết với các phối tử cụ thể được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO/2018/025085, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các phương pháp khác để sàng lọc các aptame bao gồm, ví dụ, SELEX. Các phương pháp thiết kế các aptame mà liên kết một cách chọn lọc với phân tử nhỏ bằng cách áp dụng SELEX được bộc lộ, ví dụ, trong các patent Mỹ số 5,475,096, 5,270,163, và Abdullah Ozer, *et al. Nuc. Aci.* 2014, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các cải biến của quy trình SELEX được bộc lộ trong các patent Mỹ số 5,580,737 và 5,567,588, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các kỹ thuật chọn lọc để xác định các aptame thường bao gồm việc chuẩn bị vốn lớn gồm các phân tử ADN hoặc ARN có chiều dài mong muốn mà chứa vùng mà được ngẫu nhiên hóa hoặc được gây đột biến. Ví dụ, vốn oligonucleotit nhằm lựa chọn aptame có thể chứa vùng gồm 20 đến 100 nucleotit đã được ngẫu nhiên hóa được bọc sườn bởi các vùng của trình tự xác định mà dài khoảng 15 đến 25 nucleotit và hữu ích để liên kết các đoạn mồi PCR. Vốn oligonucleotit được khuếch đại bằng cách áp dụng các kỹ thuật PCR chuẩn, hoặc các cách khác mà cho phép khuếch đại các trình tự axit nucleic đã chọn. Vốn ADN có thể được phiên mã *in vitro* để tạo ra vốn bản sao của ARN khi aptame ARN được mong đợi. Tiếp theo, vốn gồm các oligonucleotit của ARN hoặc ADN được đưa đến bước chọn lọc trên cơ sở khả năng của chúng liên kết đặc hiệu với phối tử mong muốn. Các kỹ thuật chọn lọc bao gồm, ví dụ, sắc ký ái lực, mặc dù quy trình bất kỳ mà cho phép chọn lọc các axit nucleic trên cơ sở khả năng của chúng liên kết đặc hiệu với phân tử khác có thể được áp dụng. Các kỹ thuật chọn lọc để xác định các aptame mà liên kết với các phân tử nhỏ và có chức năng trong tế bào có thể bao gồm các phương pháp sàng lọc trên cơ sở tế bào. Trong trường hợp sắc ký ái lực, các oligonucleotit được cho tiếp xúc với phối tử đích mà đã được cố định trên nền trong cột hoặc trên các hạt có từ tính. Tốt hơn, nếu các oligonucleotit được chọn cho liên kết với phối tử khi có nồng độ muối, nhiệt độ, và các tình trạng khác mà bắt chước các điều

kiện sinh lý thông thường. Các oligonucleotit thuộc vốn mà liên kết với phối tử được giữ lại trên cột hoặc hạt, và các trình tự không liên kết bị rửa đi. Tiếp đó, các oligonucleotit mà liên kết với phối tử được khuếch đại (sau phiên mã ngược nếu các bản sao của ARN được sử dụng) theo phương pháp PCR (thường là sau khi rửa giải). Quy trình chọn lọc được lặp lại trên các trình tự đã được chọn tổng cộng khoảng ba đến mười vòng lặp lại quy trình chọn lọc. Tiếp đó, các oligonucleotit thu được được khuếch đại, được tách dòng, và được giải trình tự bằng cách áp dụng các quy trình chuẩn để xác định các trình tự của các oligonucleotit mà có khả năng liên kết với phối tử đích. Sau khi trình tự aptame đã được xác định, aptame có thể được tối ưu tiếp bằng cách thực hiện các vòng chọn lọc bổ sung bắt đầu từ vốn oligonucleotit chứa trình tự aptame đã được gây đột biến.

Sàng lọc aptame *in vivo* có thể được áp dụng sau một hoặc nhiều vòng chọn lọc *in vitro* (ví dụ, SELEX). Ví dụ, König, J. *et al.* (RNA. 2007, 13(4):614–622, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) mô tả các tổ hợp SELEX và hệ nắm men lai ba lần để chọn lọc aptame *in vivo*.

Gen đích

Catxet điều hòa gen theo sáng chế là nền tảng mà có thể được sử dụng để điều hòa sự biểu hiện của gen đích bất kỳ mà có thể được biểu hiện ở tế bào, mô hoặc sinh vật đích. Thuật ngữ “gen đích” được dùng để chỉ polynucleotit mà được đưa vào tế bào và có khả năng được phiên mã thành ARN và được dịch mã và/hoặc được biểu hiện trong các điều kiện thích hợp. Theo cách khác, gen đích là nội sinh đối với tế bào đích và catxet điều hòa gen theo sáng chế được đặt vào gen đích (ví dụ vào 5' hoặc 3' UTR của gen đích nội sinh). Một ví dụ về gen đích là polynucleotit mã hóa polypeptit điều trị bệnh. Theo một phương án khác, gen đích mã hóa ARN như ARN cỡ micro, ARN ribosom, ARN nhỏ hoặc dài không mã hóa, ARN kẹp tóc ngắn (ARN hình cặp tóc nhỏ) và ARN điều hòa bất kỳ khác. Theo một phương án, gen đích là ngoại sinh đối với tế bào, trong đó cấu trúc ADN tái tổ hợp được phiên mã. Theo một phương án khác, gen đích là nội sinh đối với tế bào, trong đó cấu trúc ADN tái tổ hợp được phiên mã.

Gen đích theo sáng chế có thể là gen mã hóa protein, hoặc trình tự mã hóa ARN mã hóa phi protein. Ví dụ, gen đích có thể là gen mã hóa protein cấu trúc, enzym, protein

phát tín hiệu tế bào, protein ở ty thể, protein ngón tay kẽm, hormon, protein vận chuyển, yếu tố sinh trưởng, xytokin, protein nội bào, protein ngoại bào, protein liên màng, protein ở bào chất, protein của nhân, phân tử thụ thể, protein liên kết với ARN, protein liên kết với ADN, yếu tố phiên mã, bộ máy dịch mã, protein kênh, protein vận động, phân tử bám dính tế bào, protein ở ty thể, enzym chuyển hóa, kinaza, phosphataza, các yếu tố trao đổi, protein chaperon, và các tác nhân điều biến của bất kỳ trong số này. Theo các phương án, gen đích mã hóa erythropoietin (Epo), hormon sinh trưởng của người (hGH), nucleaza tác động kiểu chất hoạt hóa phiên mã (TALEN), insulin của người, protein 9 kết hợp CRISPR (cas9), hoặc globulin miễn dịch (hoặc phần của chúng), kể cả, ví dụ, kháng thể điều trị bệnh.

Cấu trúc biểu hiện

Sáng chế dự tính sử dụng vector tái tổ hợp để đưa vào các tế bào đích polynucleotit mã hóa gen đích và chứa catxet điều hòa gen được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo nhiều phương án, cấu trúc ADN tái tổ hợp của sáng chế bao gồm các yếu tố ADN bổ sung bao gồm các phân đoạn ADN mà cho phép sao chép ADN trong tế bào chủ và biểu hiện gen đích ở tế bào đó ở mức độ thích hợp. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu được rằng các trình tự kiểm soát biểu hiện (gen khởi đầu, gen tăng cường, và loại tương tự) được chọn dựa trên khả năng của chúng trong việc thúc đẩy sự biểu hiện của gen đích ở tế bào đích. “Vector” có nghĩa là plasmit tái tổ hợp, nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (YAC), nhiễm sắc thể mini, vòng mini của ADN hoặc virus (kể cả các trình tự có nguồn gốc từ virus) mà chứa polynucleotit cần được phân phối vào tế bào chủ, dù là *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, vector tái tổ hợp là vector virus hoặc kết hợp nhiều vector virus.

Các vector virus để biểu hiện gen đích gián tiếp nhờ aptame ở tế bào đích, mô, hoặc sinh vật là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm các vector adenovirus (AV), các vector virus kết hợp adeno (AAV), vector retrovirus và các vector lentivirus, và các vector Herpes simplex typ 1 (HSV1).

Các vector adenovirus bao gồm, ví dụ, các vector trên cơ sở adenovirus của người typ 2 và adenovirus của người typ 5 mà khiến cho quá trình sao chép bị lỗi thông qua các xóa bỏ ở các vùng E1 và E3. Catxet phiên mã có thể được cài xen vào vùng E1, tạo

ra vector tái tổ hợp E1/E3-xóa bỏ AV. Các vector adenovirut còn bao gồm các vector adenovirut có khả năng cao phụ thuộc vào gen trợ giúp (còn được gọi là các vector có khả năng cao, “không có khả năng” hoặc “vô dụng”), mà không chứa các trình tự mã hóa virut. Các vector này, chứa các yếu tố hoạt động cis cần thiết cho việc sao chép và bao gói ADN của virut, chủ yếu là các trình tự lặp lại đầu tận cùng đã nghịch chuyển (ITR) và tín hiệu bao gói (Ψ). Các hệ gen của vector AV phụ thuộc gen trợ giúp này có tiềm năng mang từ vài trăm cặp bazơ đến khoảng 36kb của ADN lạ.

Các vector virut kết hợp adeno tái tổ hợp “rAAV” bao gồm vector bất kỳ thu được từ typ huyết thanh bất kỳ của virut kết hợp adeno bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-7 và AAV-8, AAV-9, AAV-10, và các loại tương tự. Các vector rAAV có thể có một hoặc nhiều gen AAV loại thường đã bị xóa bỏ hoàn toàn hoặc một phần, tốt hơn là gen Rep và/hoặc gen Cap, nhưng vẫn giữ lại các trình tự ITR bọc sườn có tính chức năng. Các trình tự ITR có tính chức năng được giữ lại để giải cứu, sao chép, bao gói và có tiềm năng gắn vào nhiễm sắc thể hệ gen AAV. Các ITR không nhất thiết là các trình tự nucleotit loại thường, và có thể được thay đổi (ví dụ, bằng cách cài xen, xóa bỏ hoặc thế các nucleotit) chừng nào mà các trình tự này cho phép giải cứu, sao chép và bao gói mang tính chức năng.

Theo cách khác, các hệ khác như các vector lentivirut có thể được dùng trong các phương án của sáng chế. Các hệ trên cơ sở lentivirut có thể biến năng các tế bào không phân chia cũng như các tế bào đang phân chia khiến chúng hữu ích cho các ứng dụng hướng đích, ví dụ, các tế bào không phân chia của hệ thần kinh trung ương (CNS). Các vector lentivirut thu được từ virut gây suy giảm miễn dịch ở người và, giống như virut đó, hợp nhất vào hệ gen của vật chủ đem lại tiềm năng biểu hiện gen dài hạn.

Các polynucleotit, kể cả các plasmid, các YAC, các nhiễm sắc thể mini và các vòng mini, mang gen đích chứa catxet điều hòa gen cũng có thể được đưa vào tế bào hoặc sinh vật bằng các hệ vector không là virut bằng cách sử dụng, ví dụ, lipit cation, các polyme, hoặc cả hai làm chất mang. Các hệ polyme poly-L-lysin (PLL) và polyme polyetylenimin (PEI) đã tiếp hợp cũng có thể được sử dụng để phân phối vector này đến các tế bào. Các phương pháp khác để phân phối vector đến các tế bào bao gồm nạp thủy động lực và kỹ thuật đục lỗ bằng xung điện và sử dụng siêu âm, cả hai để nuôi cấy tế

bào và đối với các sinh vật. Xem tổng quan về các hệ phân phối virus và không virus để phân phối gen trong tài liệu của Nayerossadat, N. và các đồng tác giả (*Adv Biomed Res.* 2012; 1:27) được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các phương pháp điều biến sự biểu hiện của gen đích

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều biến sự biểu hiện của gen đích (ví dụ, gen có tác dụng điều trị bệnh), bằng cách (a) cài xen catxet điều hòa gen theo sáng chế vào gen đích; (b) đưa gen đích chứa catxet điều hòa gen vào tế bào; và (c) cho tế bào tiếp cận với phối tử mà liên kết với aptame này. Theo một phương án, phối tử là phân tử nhỏ. Theo cách khác, sự biểu hiện của gen đích ở các tế bào đích mang lại tính chất mong muốn cho tế bào nơi mà nó được đưa vào, hoặc nói cách khác dẫn đến kết quả điều trị bệnh mong muốn. Các tế bào đích là các tế bào nhân chuẩn, ví dụ, các tế bào của động vật có vú. Theo các phương án, các tế bào đích là các tế bào của người từ mô đích, bao gồm, ví dụ, mô mỡ, hệ thần kinh trung ương (central nervous system - CNS), cơ, tim, mắt, gan, và các mô tương tự.

Theo phương án được ưu tiên, một hoặc nhiều catxet điều hòa gen được cài xen vào vùng 5' và/hoặc vùng 3' chưa được dịch mã của gen đích. Theo một phương án, một catxet điều hòa gen được cài xen vào gen đích. Theo các phương án khác 2, 3, 4, hoặc nhiều catxet điều hòa gen được cài xen vào gen đích. Theo một phương án, hai catxet điều hòa gen được cài xen vào gen đích. Khi nhiều catxet điều hòa gen được cài xen vào một gen đích, thì mỗi catxet có thể chứa cùng một aptame sao cho một phối tử có thể được dùng để điều biến sự phân cắt nhiều catxet này bằng ribonucleaza và bằng cách đó điều biến sự biểu hiện của gen đích. Theo các phương án khác, nhiều catxet điều hòa gen được cài xen vào một gen đích, mỗi catxet có thể chứa aptame khác nhau sao cho sự tiếp xúc với nhiều phối tử phân tử nhỏ khác nhau điều biến sự biểu hiện của gen đích. Theo các phương án khác, nhiều catxet điều hòa gen được cài xen vào gen đích, mỗi catxet chứa các trình tự khác nhau của cơ chất của ribonucleaza. Điều này là hữu ích trong việc làm giảm mức độ tái tổ hợp và cải thiện mức dễ kết hợp vào các vector virus.

Catxet polynucleotit theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với các cơ chế khác để điều hòa sự biểu hiện của gen đích. Theo một phương án, catxet polynucleotit

theo sáng chế được sử dụng kết hợp với catxet điều hòa gen mà điều biến sự biểu hiện của gen đích bằng cách điều hòa gián tiếp qua aptame cách ghép nối khác như được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO2016/126747, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Sáng chế cũng có thể được kết hợp với các cấu trúc polynucleotit và các phương pháp đã được bộc lộ trong PCT/US2017/016303 và PCT/US1207/016279, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Phương pháp điều trị và các dược phẩm

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều chỉnh nồng độ của protein có hoạt tính trị liệu được phân phối theo liệu pháp gen. Theo phương án này, “gen đích” có thể mã hóa protein có tác dụng điều trị bệnh. “Gen đích” có thể mã hóa protein mà là nội sinh hoặc ngoại sinh đối với tế bào.

Trình tự gen có tác dụng điều trị bệnh chứa catxet điều hòa với công tắc ribo được dẫn bởi aptame được phân phối đến các tế bào đích *in vitro* hoặc *ex vivo*, ví dụ, bằng vectơ. Tính đặc hiệu đối với tế bào của “gen đích” có thể được kiểm soát bởi gen khởi đầu hoặc các yếu tố khác ở vectơ này. Việc phân phối cấu trúc vectơ chứa gen đích và catxet polynucleotit, và việc chuyển nhiễm của các mô đích tạo ra chuyển nhiễm ổn định gen đích đã được điều hòa, là bước thứ nhất trong quá trình tạo ra protein có tác dụng điều trị bệnh.

Tuy nhiên, do sự có mặt của catxet điều hòa trong trình tự gen đích, nên gen đích không được biểu hiện ở mức độ đáng kể, tức là nó ở “trạng thái nghỉ” khi không có phối tử đặc hiệu mà liên kết với aptame chứa trong catxet điều hòa công tắc ribo. Chỉ khi phối tử đặc hiệu với aptame được dùng (hoặc nói cách khác có mặt với lượng đủ) thì đích sự biểu hiện gen activated.

Sự phân phối cấu trúc vectơ chứa gen đích và sự phân phối phối tử hoạt hóa thường được tách biệt về mặt thời gian. Sự phân phối phối tử hoạt hóa sẽ kiểm soát khi nào gen đích được biểu hiện, cũng như mức độ biểu hiện protein. Phối tử có thể được phân phối theo nhiều đường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đường miệng, tiêm bắp (IM), đường tĩnh mạch (IV), trong mắt, hoặc qua đường khu trú.

Thời điểm phân phối phôi tử sẽ phụ thuộc vào yêu cầu hoạt hóa gen đích. Ví dụ, nếu protein có tác dụng điều trị bệnh được mã hóa bởi gen đích được yêu cầu liên tục, phôi tử phân tử nhỏ có thể được phân phối qua đường miệng hằng ngày, hoặc nhiều lần một ngày, để đảm bảo hoạt hóa liên tục gen đích, và bằng cách đó biểu hiện liên tục protein có tác dụng điều trị bệnh. Nếu gen đích có tác dụng hoạt động kéo dài, phôi tử cảm ứng có thể được dùng liều kém thường xuyên hơn.

Sáng chế cho phép sự biểu hiện của gen chuyển có tính chất chữa trị bệnh được kiểm soát theo thời gian, theo cách được xác định bằng cách dùng liều lượng theo thời gian phôi tử đặc hiệu với aptame trong công tắc ribo của catxet điều hòa polynucleotit. Mức biểu hiện gen chuyển có tính chất chữa trị bệnh chỉ tăng khi dùng phôi tử, làm tăng mức an toàn của việc điều trị theo liệu pháp gen bằng cách cho phép gen đích tắt khi không có phôi tử.

Các aptame khác nhau có thể được dùng để cho phép các phôi tử khác nhau hoạt hóa các gen đích. Theo một số phương án của sáng chế, mỗi gen có tác dụng điều trị bệnh chứa catxet điều hòa sẽ có aptame đặc hiệu trong catxet mà sẽ được hoạt hóa bởi phôi tử nhỏ đặc hiệu. Điều đó có nghĩa là mỗi gen có tác dụng điều trị bệnh có thể chỉ được hoạt hóa bằng phôi tử đặc hiệu với aptame được chứa trong nó. Theo các phương án này, mỗi phôi tử sẽ chỉ hoạt hóa một gen có tác dụng điều trị bệnh. Điều này cho phép khả năng là vài “gen đích” khác nhau có thể được phân phối đến một cá thể và mỗi gen sẽ được hoạt hóa khi phân phối phôi tử đặc hiệu đối với aptame chứa trong catxet điều hòa trú ở từng gen đích.

Sáng chế cho phép protein có tác dụng điều trị bệnh mà gen của nó có thể được phân phối đến cơ thể (như erythropoietin (EPO) hoặc kháng thể điều trị) được sản sinh ra bởi cơ thể khi phôi tử hoạt hóa được phân phối. Phương pháp phân phối protein có tác dụng điều trị bệnh này có thể thay thế việc sản xuất các protein có tác dụng điều trị bệnh như vậy ngoài cơ thể mà tiếp đó được tiêm hoặc được truyền, ví dụ, các kháng thể được dùng ở ung thư hoặc để phong bế bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn dịch. Cơ thể chứa gen đích đã được điều hòa trở thành xưởng sản xuất sinh học, mà được bật khi phôi tử đặc hiệu với gen được dùng.

Mức độ dùng liều lượng và các định thời gian dùng liều lượng protein có hoạt tính trị liệu có thể là quan trọng đối với hiệu quả điều trị bệnh. Ví dụ, ở sự phân phối AVASTIN (kháng thể kháng VEGF) đối với ung thư. Sáng chế nâng cao mức độ dễ dàng dùng liều lượng đáp lại việc theo dõi nồng độ và tác dụng của protein điều trị bệnh.

Theo một phương án, gen đích có thể mã hóa nucleaza mà có thể hướng đích và sửa chữa trình tự ADN cụ thể. Các nucleaza này bao gồm Cas9, ngón tay kềm chứa nucleaza, hoặc TALEN. Trong trường hợp của các nucleaza này, protein của nucleaza có thể chỉ được cần đến trong một khoảng thời gian ngắn mà là đủ để hiệu chỉnh gen nội sinh đích của nó. Tuy nhiên, nếu gen nucleaza chưa điều hòa được phân phối đến cơ thể, thì protein này có thể có mặt trong suốt phần đời còn lại của tế bào. Trong trường hợp của nucleaza, có nguy cơ gia tăng về việc đích lạ hiệu chỉnh nucleaza dài hơn. Việc điều hòa sự biểu hiện của các protein này có ưu điểm đáng kể về tính an toàn. Trong trường hợp này, vectơ chứa gen nucleaza chứa catxet điều hòa có thể được phân phối đến các tế bào thích hợp ở cơ thể. Gen nucleaza ở trạng thái “tắt” khi không có phối tử đặc hiệu với catxet, nên nucleaza không được sản sinh. Chỉ khi phối tử hoạt hóa được dùng, thì nucleaza được sản sinh. Sau quãng thời gian đủ để cho phép sửa chữa đủ, phối tử được rút ra và không được dùng lại. Vì vậy, gen nucleaza tiếp đó ở trạng thái “tắt” và nucleaza không được sản sinh thêm và quá trình sửa chữa dùng lại. Cách này có thể được sử dụng để chỉnh sửa các tình trạng di truyền, kể cả nhiều bệnh võng mạc di truyền như LCA10 gây ra bởi các đột biến ở CEP290 và bệnh Stargardts do các đột biến ở ABCA4 gây ra.

Việc dùng gen đích đã được điều hòa mã hóa protein có tác dụng điều trị bệnh mà chỉ được hoạt hóa khi dùng phối tử đặc hiệu có thể được áp dụng để điều hòa gen có tác dụng trị liệu nhằm điều trị nhiều loại bệnh khác nhau, ví dụ, ung thư bằng các kháng thể trị liệu, các rối loạn miễn dịch bằng các protein hoặc các kháng thể điều biến miễn dịch, các bệnh chuyển hóa, các bệnh hiếm như PNH bằng các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể kháng-C5 làm gen đã được điều hòa, hoặc sự tạo mạch ở mắt bằng các kháng thể trị liệu, và AMD khô bằng các protein điều biến miễn dịch.

Sự đa dạng về gen đích đặc hiệu cho phép điều trị nhiều loại bệnh và tình trạng cụ thể, là thích hợp để dùng theo sáng chế. Ví dụ, insulin hoặc chất tương tự insulin (tốt

hơn là insulin của người hoặc chất tương tự insulin của người) có thể được dùng làm gen đích để điều trị bệnh đái tháo đường typ I, bệnh đái tháo đường typ II, hoặc hội chứng chuyển hóa; hormon sinh trưởng của người có thể được dùng làm gen đích để điều trị trẻ em mắc các rối loạn về sinh trưởng hoặc người lớn thiếu hormon sinh trưởng; erythropoietin (tốt hơn là erythropoietin của người) có thể được dùng làm gen đích để điều trị bệnh thiếu máu do bệnh mạn tính ở thận, bệnh thiếu máu do chứng loạn sản tủy, hoặc bệnh thiếu máu do hóa trị ung thư.

Sáng chế có thể là đặc biệt thích hợp để điều trị bệnh các bệnh do các lỗi gen đơn gây ra như chứng xơ hóa nang, bệnh ưa chảy máu, chứng loạn dưỡng cơ, bệnh thiếu máu vùng biển, hoặc bệnh thiếu máu tế bào hồng huyết cầu hình lưỡi liềm. Do đó, β -, γ -, δ -, hoặc ζ -globin của người có thể được dùng làm gen đích để điều trị bệnh thiếu máu vùng biển β hoặc bệnh thiếu máu tế bào hồng huyết cầu hình lưỡi liềm; yếu tố VIII hoặc yếu tố IX của người có thể được dùng làm gen đích để điều trị bệnh ưa chảy máu A hoặc bệnh ưa chảy máu B.

Các phối tử được dùng theo sáng chế thường được kết hợp với một hoặc nhiều chất mang được dùng để tạo ra các dược phẩm thích hợp để dùng cho bệnh nhân. Các chất mang được dùng bao gồm các dung môi, các chất kết dính, các chất pha loãng, các chất gây rã, các chất làm trơn, môi trường phân tán, lớp bao, tác nhân kháng khuẩn và diệt nấm, tác nhân đẳng trương và tác nhân trì hoãn sự hấp thụ, và các loại tương tự, thường được dùng trong lĩnh vực dược. Các dược phẩm có thể ở dạng viên nén, viên tròn, viên nang, viên đẹt, và loại tương tự, và được sản xuất để là tương thích với đường dùng dự kiến của chúng. Các ví dụ về đường dùng bao gồm ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, qua đường tĩnh mạch, trong da, trong mũi, dưới da, qua đường miệng, xông, qua da (cục bộ), qua màng nhầy, và qua đường trực tràng.

Các dược phẩm chứa các phối tử được dùng cho bệnh nhân theo phác đồ cấp liều lượng sao cho lượng phối tử đủ để điều hòa gen đích như mong muốn được phân phối đến bệnh nhân. Khi phối tử là phân tử nhỏ và dạng liều là viên nén, viên nang, hoặc loại tương tự, thì tốt hơn là dược phẩm này chứa từ 0,1mg đến 10g phối tử; từ 0,5mg đến 5g phối tử; từ 1mg đến 1g phối tử; từ 2mg đến 750mg phối tử; từ 5mg đến 500mg phối tử; hoặc từ 10mg đến 250mg phối tử.

Các dược phẩm có thể được cấp liều lượng mỗi ngày một lần hoặc mỗi ngày nhiều lần (ví dụ, 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều lần hằng ngày). Theo cách khác, các dược phẩm có thể được cấp liều lượng thưa hơn mỗi ngày một lần, ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, hoặc 14 ngày một lần, hoặc mỗi tháng một lần hoặc vài tháng một lần. Theo một số phương án của sáng chế, các dược phẩm có thể được dùng cho bệnh nhân chỉ một số ít lần, ví dụ, một lần, hai lần, ba lần, v.v..

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh nhân có nhu cầu mức tăng biểu hiện protein có hoạt tính trị liệu được mã hóa bởi gen đích, phương pháp bao gồm việc dùng cho bệnh nhân dược phẩm chứa phối tử đối với aptame, khi bệnh nhân đã từng được dùng ADN tái tổ hợp chứa gen đích, khi gen đích chứa catxet điều hòa gen theo sáng chế, trong đó công tắc ribo (chứa aptame) điều biến sự phân cắt cơ chất của RNaza P bằng RNaza P đáp lại phối tử aptame.

Vật phẩm và kit

Sáng chế còn đề xuất kit hoặc vật phẩm để dùng trong các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo cách khác, các kit này chứa các dược phẩm theo sáng chế (ví dụ, đối với các dược phẩm để phân phối của vectơ chứa gen đích chứa catxet điều hòa gen) trong bao gói thích hợp. Bao gói thích hợp cho các dược phẩm (như các chế phẩm để tiêm vào mắt) được bộc lộ trong bản mô tả này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm, ví dụ, các lọ (như lọ kín), bình, ống thuốc tiêm, chai lọ, hũ, bao gói linh hoạt (ví dụ, túi Mylar hoặc túi nhựa kín), và các loại tương tự. Các vật phẩm này còn có thể được tiệt trùng và/hoặc làm kín.

Sáng chế còn đề xuất các kit chứa các dược phẩm theo sáng chế và có thể còn bao gồm hướng dẫn về các phương pháp sử dụng dược phẩm này, như các ứng dụng được bộc lộ trong bản mô tả này. Các kit được bộc lộ trong bản mô tả này có thể còn bao gồm các nguyên liệu mong muốn khác dưới góc độ thương mại và góc độ của người tiêu dùng, bao gồm các dung dịch đệm khác, chất pha loãng, bộ lọc, kim, bơm tiêm, và gói cài xen với hướng dẫn về cách thực hiện việc dùng thuốc, bao gồm ví dụ, any các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này. Ví dụ, theo một số phương án, kit chứa rAAV để biểu hiện của gen đích chứa catxet điều hòa gen theo sáng chế, chất mang dược dụng thích hợp cho tiêm, và một hoặc nhiều: Dung dịch đệm, chất pha loãng, bộ

lọc, kim, bơm tiêm, và gói cài xen có hướng dẫn thực hiện tiêm. Theo một số phương án, kit là thích hợp để tiêm nội nhãn, tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch và các loại tương tự.

Các thuật ngữ “tính tương đồng” và “tương đồng” được dùng trong bản mô tả này để chỉ mức đồng nhất tính theo phần trăm giữa hai trình tự polynucleotit hoặc giữa hai trình tự polypeptit. Sự tương ứng giữa một trình tự so với trình tự khác có thể được xác định theo các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, tính tương đồng có thể được xác định bằng cách so sánh trực tiếp hai phân tử polypeptit bằng cách căn chỉnh thông tin của trình tự và áp dụng các chương trình máy tính dễ mua được. Hai polynucleotit hoặc hai trình tự polypeptit là “hầu như tương đồng” với nhau nếu sau khi đã được căn chỉnh một cách tối ưu bằng các cài xen hoặc xóa bỏ thích hợp, ít nhất là khoảng 80%, ít nhất là khoảng 85%, ít nhất là khoảng 90%, và ít nhất là khoảng 95% nucleotit hoặc axit amin, lần lượt, khớp dọc theo chiều dài đã được xác định của phân tử, như được xác định bằng cách áp dụng các phương pháp nêu trên.

“Mức độ đồng nhất về trình tự tính theo phần trăm” liên quan đến trình tự polypeptit hoặc axit nucleic tham chiếu được định nghĩa là tỷ lệ phần trăm của các gốc axit amin hoặc các nucleotit ở trình tự ứng viên mà là giống hệt các gốc axit amin hoặc các nucleotit ở trình tự polypeptit hoặc axit nucleic tham chiếu, sau khi căn chỉnh các trình tự và đưa các khoảng cách, nếu cần, vào để đạt được mức độ đồng nhất tối đa về trình tự tính theo phần trăm. Việc căn chỉnh nhằm mục đích xác định mức độ đồng nhất về trình tự axit amin hoặc axit nucleic tính theo phần trăm có thể đạt được theo các cách mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính có sẵn cho công chúng sử dụng các chương trình bao gồm phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR).

Các thuật ngữ “polynucleotit” hoặc “axit nucleic” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ dạng polyme của nucleotit có chiều dài bất kỳ, là ribonucleotit hoặc deoxyribonucleotit. Do đó, thuật ngữ này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ADN hoặc ARN sợi đơn, sợi đôi hoặc đa sợi, ADN hệ gen, ADN bổ trợ, các thể lai ADN-ARN, hoặc polyme chứa các bazơ purin và pyrimidin, hoặc các bazơ nucleotit tự nhiên, đã được cải biến về mặt hóa học hoặc sinh hóa, không tự nhiên, hoặc đã được tạo dẫn xuất khác.

Các thuật ngữ “dị tương đồng” hoặc “ngoại sinh” có nghĩa là thu được từ thực thể khác biệt về kiểu di truyền so với phần còn lại của thực thể mà nó được so sánh hoặc được đưa vào hoặc được kết hợp vào. Ví dụ, polynucleotit được đưa theo các kỹ thuật xử lý di truyền vào loại tế bào khác là polynucleotit dị tương đồng (và, khi được biểu hiện, có thể mã hóa polypeptit khác loại). Tương tự, trình tự của tế bào (ví dụ, gen hoặc phần của chúng) mà được kết hợp vào vector virus là trình tự nucleotit dị tương đồng liên quan đến vector.

Được hiểu và kỳ vọng rằng các thay đổi ở các nguyên lý theo sáng chế đã được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được tạo ra bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và dự định rằng các cải biến này nằm trong phạm vi của sáng chế. Các ví dụ dưới đây minh họa chi tiết thêm sáng chế, nhưng không nên được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế theo bất kỳ cách nào. Tất cả các tài liệu đã được viện dẫn đến trong bản mô tả này được đưa hoàn toàn vào đây bằng cách viện dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Cài xen cấu trúc kiểu tARN (mascRNA) vào 3' UTR hoặc 5' UTR gây phân cắt ARN thông tin và mức độ biểu hiện protein giảm.

Quy trình thử nghiệm:

Các cấu trúc plasmit: các phân đoạn ADN chứa trình tự mascARN của chuột và các vị trí cắt giới hạn ở mỗi đầu tận cùng được tổng hợp (IDT), và được tiêu và được tách dòng vào trục plasmit Con 8 mà chứa CMV gen tăng cường/gen khởi đầu và trình tự polyadenyl hóa beta-globin của người. Tất cả các cấu trúc được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN (do Genewiz cung cấp).

Phân tích thâm Bắc: các oligonucleotit đã được cải biến bằng axit nucleic bị khóa (locked nucleic acid - LNA) chứa trình tự tggaaccaggagtcca (SEQ ID NO: 19) mà phát hiện cả hai ARN ở tế bào chất liên kết với MALAT1 của người và của chuột nhỏ, được thiết kế và được tổng hợp bằng Exiqon, và gắn nhãn đánh dấu bằng Digoxigenin bằng cách sử dụng kit tạo đuôi oligonucleotit DIG (do Roche cung cấp). Phân tích vết thâm Bắc không có hoạt tính phóng xạ được thực hiện theo quy trình đã được công bố

(Kim, S. W. *et al.* *A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs. Nucleic Acids Res.* 38, e98 (2010)).

Phân tích đếm tế bào theo dòng chảy: $1,5 \times 10^5$ tế bào HeLa được cấy lên đĩa trong đĩa loại 24 lỗ vào ngày trước khi chuyển nhiễm. Các tế bào được chuyển nhiễm với 0,2µg ADN plasmid bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Bốn mươi tám giờ sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được trypsin hóa và tế bào huyền phù được đưa đi phân tích đo đếm tế bào theo dòng chảy để xác định cường độ của huỳnh quang GFP bằng cách sử dụng máy Guava EasyCyte 8HT. Dữ liệu thu được được phân tích bằng cách áp dụng GuavaSoft2.2.2.

Thử nghiệm luxiferaza của con đom đóm đối với các tế bào nuôi cấy: $3,5 \times 10^4$ tế bào HEK 293 được cấy vào đĩa đáy bằng loại 96 lỗ vào ngày trước khi chuyển nhiễm. ADN plasmid (500ng) được bổ sung vào ống nghiệm hoặc đĩa đáy chữ U loại 96 lỗ. Một cách riêng rẽ, chất phản ứng TransIT-293 (do Mirus cung cấp; 1,4µl) được bổ sung vào 50µl môi trường opti-mem I (do Life Technologies cung cấp) và được để yên trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng (“RT”). Sau đó, 50µl chất phản ứng chuyển nhiễm đã được pha loãng được bổ sung vào ADN, được trộn, và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 phút. Cuối cùng, 7µl dung dịch này được bổ sung vào lỗ chứa tế bào trong đĩa loại 96 lỗ. 4 giờ sau khi chuyển nhiễm, môi trường chứa dung dịch chuyển nhiễm được thay thế bằng môi trường mới. 24 giờ sau khi thay môi trường, các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ, và được cân bằng đến nhiệt độ trong phòng trong thời gian vài phút trên bàn thí nghiệm, sau đó được hút ra. Dung dịch đệm tiêu glo (do Promega cung cấp, 100µl, ở nhiệt độ trong phòng) được bổ sung vào, và các đĩa này được để lại ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian ít nhất là 5 phút. Sau đó, dung lượng của lỗ được trộn bởi 50µl nghiền tán nhỏ, và 20µl từ từng mẫu được trộn với 20µl chất phản ứng glo nhẹ (do Promega cung cấp) mà đã được pha loãng đến 10% trong dung dịch đệm tiêu glo. 96 lỗ được để cách nhau trên đĩa trắng đục loại 384 lỗ. Sau 5 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, mức độ phát quang được đo bằng cách sử dụng máy Tecan với thời gian đọc 500 phần nghìn giây. Hoạt tính của luxiferaza được thể hiện theo trung bình của đơn vị ánh sáng tùy ý (ALU) $\pm$ S.D.

Kết quả:

RNaza P nhận diện tiền tARN (pre-tARN) hoặc các phân tử kiểu tARN với cấu trúc bậc ba và xúc tác phản ứng thủy phân để phân cắt ra các trình tự dẫn đầu ở pre-tARN (Kirsebom, L. A. *RNase P RNA mediated cleavage: substrate recognition and catalysis. Biochimie* 89, 1183–1194 (2007)). Để thử nghiệm xem liệu việc cài xen cơ chất của RNaza P vào ARN thông tin có gây ra sự phân cắt ARN thông tin và giảm mức độ biểu hiện protein hay không, trình tự mascARN của chuột nhắt được đưa vào 3' UTR của gen thông báo GFP. mascARN (MALAT1-associated small cytoplasmic RNA) là cấu trúc kiểu tARN, và được sản sinh từ ARN dài không mã hóa MALAT1 nhờ phân cắt bằng RNaza P để tạo ra đầu tận cùng 5' và phân cắt tiếp bởi RNaza Z để tạo ra đầu tận cùng 3' của mascARN (Wilusz, J. E., *et al.*, *3' end processing a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA. Cell* 135, 919–932 (2008)). Chính cấu trúc kiểu tARN này, cùng với trình tự dẫn đầu không liên quan gồm 12 nucleotit, là đủ để tuyển RNaza P nhằm tạo ra mascARN.

Sự phân cắt GFP bằng mascARN vào 3' UTR được theo dõi nhờ vết thấm Bắc bằng cách sử dụng mẫu dò mà có thể phát hiện cả hai mascARN của người và của chuột. mascARN 61nt tạo ra được từ các tế bào mà được chuyển nhiễm với GFP-mascRNA (có nghĩa) được xác định nhờ vết thấm Bắc. mascARN 61nt không được phát hiện ở các tế bào được chuyển nhiễm với GFP-mascRNA (đổi nghĩa) mà có trình tự mascARN theo định hướng ngược (hình 2a).

Ở mức độ protein, các tế bào được chuyển nhiễm với cấu trúc GFP-mascRNA thể hiện không chỉ tỷ lệ phần trăm thấp hơn của quần thể dương tính với GFP, mà cả cường độ phát quang trung bình (MFI) thấp hơn trong quá trình biểu hiện GFP, so với các tế bào với cấu trúc đối chứng GFP (hình 2b, đồ thị thứ nhất và đồ thị thứ hai). mascARN cũng được cài xen vào 5' UTR, cũng như ở cả 5' UTR và 3' UTR, của cấu trúc gen thông báo GFP. Mức độ biểu hiện GFP bị giảm ở các tế bào đã được chuyển nhiễm với mascARN đã được cài xen vào 5' UTR của GFP so với các tế bào được chuyển nhiễm với cấu trúc đối chứng GFP (hình 2b, đồ thị thứ 3). Khi mascARN được cài xen vào cả hai vùng 5' UTR và 3' UTR của cấu trúc thông báo GFP, thì mức độ biểu hiện GFP còn bị giảm hơn nữa (hình 2b, đồ thị thứ 4).

Trình tự MascRNA cũng được cài xen vào 3' UTR của cấu trúc luxiferaza của con đom đóm. Đối chứng âm tính (Luci-masc-mlp) được tạo ra bằng cách làm đột biến ba nucleotit ở vòng móc T của mascARN (từ UUC đến AAG) (xem Hình 2c, mảng bên trái). Ba nucleotit này được bảo toàn ở mức độ cao ở vòng móc T của tARN các cấu trúc và là cần thiết để phân cắt hiệu quả bởi RNaza P (Yuan, Y. & Altman, S. *Substrate recognition by human RNase P: identification small, model substrates for the enzyme. EMBO J.* 14, 159–168 (1995), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Như được thể hiện trên hình 2c (mảng bên phải), việc cài xen mascARN trình tự ở vùng 3' UTR (Luci-masc) làm giảm mức độ biểu hiện của luxiferaza 81% so với cấu trúc luxiferaza mà không có mascARN (Luci), biểu thị rằng việc cài xen của mascARN vào 3' UTR gây ra sự phân cắt ARN thông tin và khiến mức độ biểu hiện protein giảm. Tuy nhiên, các tế bào với cấu trúc luxiferaza mà có mascARN chứa ba đột biến ở vòng móc T (Luci-mascRNA-mlp) chỉ thể hiện mức giảm 20% ở mức độ biểu hiện luxiferaza so với đối chứng Luci, biểu thị rằng các đột biến ở vòng móc T của mascARN làm suy giảm sự phân cắt gián tiếp nhờ RNaza P.

Các kết quả này thể hiện rằng việc cài xen cấu trúc kiểu tARN, mascARN, ở 3' UTR hoặc 5' UTR đều dẫn đến phân cắt ARN thông tin đích gián tiếp nhờ RNaza P và giảm tiếp về mức độ biểu hiện protein.

Ví dụ 2. Sử dụng aptame xpt-guanin để điều hòa sự biểu hiện của gen đích thông qua việc điều biến sự phân cắt ARN thông tin gián tiếp nhờ mascARN-RNaza P

Các quy trình thử nghiệm:

Các cấu trúc plasmid: các phân đoạn oligonucleotit chứa các trình tự mascARN và aptame guanin (Mandal, M, *et al.*, Cell 113, 577–586 (2003), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) được tổng hợp (IDT) và được tách dòng vào cấu trúc biểu hiện luxiferaza (Luci) (Con8) ở vùng 3' UTR bằng cách sử dụng các vị trí cắt giới hạn tương thích BamHI và XhoI. Tất cả các cấu trúc này được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN (do Genewiz cung cấp).

Thử nghiệm luxiferaza của con đom đóm đối với các tế bào nuôi cấy: các tế bào được chuyển nhiễm như được bộc lộ trong Ví dụ 1. Bốn giờ sau khi chuyển nhiễm, môi trường chứa dung dịch chuyển nhiễm được thay thế bằng môi trường chứa 0,5% DMSO

làm dung môi đối chứng hoặc 500 μ M guanosin (do Sigma cung cấp) làm aptame phối tử. Hai mươi hai đến hai mươi tư giờ sau khi xử lý, thử nghiệm luxiferaza được thực hiện như được bộc lộ trong Ví dụ 1.

Kết quả:

Để điều hòa sự phân cắt ARN thông tin gián tiếp nhờ RNaza P, và nhờ đó điều hòa sự biểu hiện của gen đích, trình tự aptame được liên kết với trình tự mascARN được cài xen vào 3' UTR của cấu trúc biểu hiện luxiferaza, dựa trên giả thiết rằng khi không có phối tử aptame, thì sự phân cắt bằng RNaza P không bị ảnh hưởng, do đó, ARN thông tin được phân cắt và protein sẽ không được biểu hiện. Dựa vào sự sẵn có của phối tử aptame, liên kết aptame/phối tử khơi mào thay đổi về mặt cấu hình đối với cấu trúc ARN, mà về phần mình làm suy giảm sự phân cắt bằng RNaza P, do đó để lại ARN thông tin nguyên vẹn.

Ở cấu trúc MG1 (SEQ ID NO: 1) (hình 3a), aptame guanin được cài xen vào ngay sau trình tự mascARN, trong đó trình tự gồm 7 nucleotit ngay tiếp sau trình tự aptame guanin là hỗ trợ cho 7 nucleotit cuối cùng của mascARN. Điều này được giải thích rằng ở cấu hình này, sau khi liên kết aptame/phối tử, 7 nucleotit cuối cùng ở mascARN và trình tự hỗ trợ của nó sẽ được đưa lại với nhau để tạo ra thân của vùng tác động của công tắc ribo. Do đó, trình tự 7 nucleotit này ở mascARN mà là cần thiết để sự hình thành cấu trúc kiểu tARN sẽ được gắn vào cấu trúc aptame/phối tử mới hình thành, do đó liên kết với RNaza P và sự phân cắt sẽ bị suy giảm. Thực vậy, như được thể hiện trên hình 3c, khi không có guanosin, việc cài xen aptame xpt-G sau mascARN (MG1) gây ra hoạt tính của luxiferaza mà ở mức khoảng 68% so với cấu trúc đối chứng Luci (giảm 32% về mức độ hoạt tính của luxiferaza so với cấu trúc đối chứng Luci). Tuy nhiên, khi có guanosin, hoạt tính của luxiferaza được khôi phục đến 100% cấu trúc đối chứng Luci, khiến cảm ứng 2,1 lần mức độ biểu hiện của gen luxiferaza khi so sánh các tế bào đã được xử lý bằng guanosin so với các tế bào đã được xử lý bằng dung môi đối chứng. Mức độ hoạt tính cao của luxiferaza khi không có phối tử aptame biểu thị hiệu quả thấp của sự phân cắt gián tiếp nhờ RNaza P.

Ở ba cấu trúc khác, GM1 (SEQ ID NO: 2), GM2 (SEQ ID NO: 3), và GM3 (SEQ ID NO: 4), aptame guanin được cài xen vào trước trình tự mascARN (Hình 3b). Ở các

cấu trúc GM1 và GM2, trình tự gồm 7 nucleotit (GM1) hoặc trình tự gồm 6 nucleotit (GM2) cộng với nucleotit thứ nhất ở mascARN (G) và các trình tự bổ trợ của chúng được cài xen lẫn lượt vào các đầu tận cùng 5' và 3' của trình tự aptame guanin, và tạo nên thân của vùng tác động của cấu trúc aptame sau khi liên kết với phối tử. Nếu thân của vùng tác động không được hình thành khi không có phối tử aptame, thì trình tự gồm 7 hoặc 6 nucleotit ở đầu tận cùng 3' của aptame guanin là sợi đơn và có tác dụng làm trình tự dẫn đầu của mascARN dễ phân cắt bằng RNaza P. Sau khi liên kết với aptame/phối tử, trình tự dẫn đầu, cũng như nucleotit thứ nhất in thân của thể nhận của mascARN, được càng hóa ở thân của cấu trúc aptame, do đó ARN đơn sợi sẽ không có sẵn cho liên kết với RNaza P và phân cắt tiếp đó. Như được thể hiện trên hình 3c, khi không có guanosin, các tế bào được chuyển nhiễm với cấu trúc GM1 thể hiện mức giảm 52% hoạt tính của luxiferaza so với đối chứng Con8. Trong khi đó nếu có xử lý bằng guanosin, thì các tế bào tạo ra gần 100% hoạt tính luxiferaza của cấu trúc đối chứng, và tạo ra mức độ cảm ứng 2,9 lần khi được so sánh với các tế bào không được xử lý bằng guanosin. Các tế bào được chuyển nhiễm với cấu trúc GM2 có mức độ hoạt tính gốc của luxiferaza tương tự như MG1, tạo ra mức giảm 40% hoạt tính của luxiferaza khi không có guanosin, ám chỉ hiệu quả tương tự trong việc phân cắt ARN thông tin gián tiếp nhờ RNaza P. Tuy nhiên, hoạt tính được cảm ứng của luxiferaza là thấp hơn MG1, tạo ra mức độ cảm ứng 1,9 lần hoạt tính của luxiferaza sau khi xử lý bằng guanosin. Trái lại, ở cấu trúc GM3, trình tự gồm 5 nucleotit giữa thân của vùng tác động và thân của thể nhận của mascARN. Như được thể hiện trên hình 3c, không có mức tăng về biểu hiện luxiferaza sau khi xử lý bằng guanosin, ám chỉ rằng sự phân cắt bằng RNaza P không chịu tác động bởi cấu trúc aptame liên kết với phối tử.

Các kết quả này thể hiện rằng các công tắc ribo dựa trên aptame được tạo ra mà điều hòa sự biểu hiện của gen đích thông qua việc điều biến sự phân cắt ARN thông tin nhờ RNaza P đáp lại phối tử aptame.

Ví dụ 3. Trình tự tại chỗ xung quanh thân của aptame và khoảng cách giữa aptame và cấu trúc kiểu tARN tác động đến hoạt tính của công tắc ribo.

Kết quả:

Các thử nghiệm được thực hiện để xét nghiệm liệu cấu trúc aptame liên kết với phối tử có thể can thiệp vào liên kết RNaza P và sự phân cắt khi được đặt gần cấu trúc kiểu tARN. Các trình tự trước hoặc sau trình tự aptame này có thể tạo điều kiện thuận lợi cho sự hình thành của thân của vùng tác động. Ở cấu trúc GM1, 4 nucleotit bị đột biến, cụ thể là CGGC mà nằm trước vùng tác động và có tiềm năng ghép cặp bazơ với trình tự sau vùng tác động, với AAGA, tạo ra cấu trúc GM4 (SEQ ID NO: 5). Như được thể hiện trên hình 4a, GM4 biểu hiện hoạt tính của luxiferaza thấp hơn GM1, biểu thị mức độ phân cắt ARN thông tin hiệu quả hơn khi không có phối tử aptame guanin. Khi hai bản sao của GM4 được cài xen nối tiếp vào 3' UTR (GM4_2C, SEQ ID NO: 6), thì mức độ biểu hiện gốc còn bị giảm tiếp đến 18% của cấu trúc đối chứng Con8. Khi có xử lý bằng guanin, thì sự biểu hiện luxiferaza được cảm ứng đến 51% luxiferaza của Con8, tạo ra mức độ cảm ứng 3,95 lần khi được so sánh với các mẫu không xử lý bằng guanin.

Khoảng cách trình tự giữa aptame cấu trúc và cấu trúc kiểu tARN cũng được cải biến. Như được thể hiện trên hình 3c, cấu trúc GM3, trong đó có 5 nucleotit giữa thân tác động của công tắc ribo aptame xpt-guanin và thân của thể nhận của mascARN, không điều hòa sự biểu hiện gen luxiferaza đáp lại xử lý bằng guanosin, biểu thị thay đổi về mặt cấu hình ở cấu trúc aptame đáp lại phối tử không tác động đến hoạt tính của RNaza P khi đặt 5 nucleotit ra khỏi cấu trúc kiểu tARN. Số lượng nucleotit giữa đầu tận cùng 3' của thân vùng tác động và thân của thể nhận của cấu trúc mascARN được cải biến bắt đầu từ cấu trúc GM4 (nơi nucleotit thứ nhất trong thân của thể nhận của mascARN tham gia vào quá trình hình thành thân vùng tác động của công tắc ribo). Không, 1, 2, hoặc 3 nucleotit được cài xen để lần lượt tạo ra cấu trúc GM5 đến GM8 (SEQ ID NO: 7 đến 10). Như được thể hiện trên hình 4b, cấu trúc GM5 biểu hiện mức độ hoạt tính của luxiferaza thấp hơn khi không có guanin, biểu thị sự phân cắt hiệu quả hơn bởi RNaza P. Tuy nhiên, việc tách tiếp hai cấu trúc này không cải thiện sự phân cắt bằng RNaza P. Không giống như GM3 mà có 5 nucleotit ở giữa và không điều hòa, GM6, 7 và 8 điều hòa tăng mức độ biểu hiện luxiferaza đáp lại xử lý bằng guanin.

Tương tự, khoảng cách giữa aptame và cơ chất của RNaza P ở cấu trúc MG1 được cải biến bằng cách làm giảm số lượng nucleotit mà theo cách khác là chung giữa

thân của thể nhận của mascARN và thân của vùng tác động, từ 6 nucleotit ở MG1 đến 5, 4, hoặc 3 nucleotit, lần lượt tạo nên các cấu trúc MG2, 3 và 4 (lần lượt là SEQ ID NO: 11 đến 13), (trong khi vẫn duy trì thân của vùng tác động tổng cộng 8 cặp bazơ). Như được thể hiện trên hình 4c, việc tách hai cấu trúc này làm giảm nhẹ mức độ biểu hiện gốc của luxiferaza khi không có xử lý bằng guanin khi các nucleotit chung theo cách khác bị giảm đến 4 nucleotit (cấu trúc MG3) hoặc 3 nucleotit (cấu trúc MG4), biểu thị sự phân cắt ARN thông tin gián tiếp nhờ RNaza P hiệu quả hơn chút xíu. Khi có xử lý bằng guanin, sự biểu hiện luxiferaza được cảm ứng đến mức độ mà là tương thích với MG1, tạo ra mức cảm ứng khoảng 2 lần đối với các cấu trúc MG3 và MG4. Các nucleotit chung theo cách khác có thể bị giảm tiếp đến 2 nucleotit hoặc ít hơn để tách tiếp cấu trúc của cơ chất của RNaza P và cấu trúc aptame để cải thiện khả năng điều hòa của công tắc ribo.

Ví dụ 4. Sử dụng aptame xpt-guanin để điều hòa sự biểu hiện của gen đích thông qua điều biến mức độ phân cắt ARN thông báo gián tiếp nhờ tiền tARN^{Arg}-RNaza P.

Quy trình thử nghiệm:

Dựng cấu trúc plasmit: phân đoạn ADN chứa các trình tự cho guanin aptame xpt-G và tiền tARN arginin của người (Nashimoto M.N. *et al. Long 5' leaders inhibit removal of a 3' trailer from precursor tRNA by mammalian tRNA 3' processing endoribonuclease. Nucleic Acids Research*, 1999; 27(13): 2770-2776) được tổng hợp (IDT). Các phân đoạn ADN tổng hợp được được tiêu bằng các enzym cắt giới hạn BamHI và XhoI và được tách dòng vào cấu trúc Con8 đã được tiêu bằng cùng các enzym cắt giới hạn này. Các trình tự cấu trúc được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN (do Genewiz cung cấp).

Kết quả:

Để thể hiện tiếp khả năng ứng dụng của sự phân cắt bằng RNaza P gián tiếp qua aptame trong việc điều hòa sự biểu hiện gen, trình tự tARN arginin của người (tARN^{Arg}) được liên kết với aptame xpt-guanin. Ở cấu trúc GM1, trình tự mascARN được thể bằng trình tự tARN arginin của người. Trình tự của thân của vùng tác động 5' được thiết kế bổ trợ cho 7 nucleotit của trình tự dẫn đầu của tARN^{Arg} cộng với nucleotit thứ nhất của thân của thể tác động tARN^{Arg}, tạo ra cấu trúc GArg (SEQ ID NO: 14). Như được thể

hiện trên hình 5, khi không có guanin, GArg biểu hiện hoạt tính của luxiferaza ở mức độ tương tự, khoảng 50% của cấu trúc đối chứng Con8, biểu thị a khả năng tương tự của tARN^{Arg} như mascARN trong việc tuyển phân cắt gián tiếp nhờ RNaza P. Việc xử lý bằng guanin gây ra mức độ cảm ứng 1,6 lần đối với luxiferaza khi được so sánh với các mẫu không được xử lý, kém hiệu quả hơn một chút so với cấu trúc GM1 đáp lại guanin.

Ví dụ 5. Sử dụng theophyllin aptame và adenin aptame để điều hòa sự biểu hiện của gen đích thông qua việc điều biến sự phân cắt ARN thông tin gián tiếp nhờ mascARN-RNaza P.

Quy trình thử nghiệm:

Dựng cấu trúc plasmit: phân đoạn ADN chứa các trình tự cho aptame adenin ydhl-A (M. Mandal and R.R. Breaker, *Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. Nature Structural & Molecular Biology*. 2004; 11: 29-35, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) hoặc theophyllin aptame (G.R. Zimmerman, *et al. Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA. Nature Structural Biology*. 1997; 4: 644-649, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), và trình tự mascARN được tổng hợp (IDT). Các phân đoạn ADN tổng hợp được được tiêu bằng các enzym cắt giới hạn BamHI và XhoI và được tách dòng vào Con8 đã được tiêu cũng bằng chính các enzym cắt giới hạn này. Các trình tự cấu trúc được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN (do Genewiz cung cấp).

Chuyển nhiễm và thử nghiệm luxiferaza đối với các tế bào nuôi cấy: như được bộc lộ trong Ví dụ 1.

Bốn giờ sau khi chuyển nhiễm, môi trường được hút ra, và môi trường mới với NaOH (1mM) làm dung môi hoặc 1mM adenin (do Calbiochem cung cấp), hoặc 3mM theophyllin (do Sigma cung cấp) được bổ sung vào. Số lần cảm ứng được thể hiện ở dạng thương số của hoạt tính của luxiferaza thu được khi có phối tử aptame chia cho trị số thu được khi không có phối tử aptame.

Kết quả:

Việc sử dụng các cặp aptame/phối tử bổ sung để kiểm soát sự biểu hiện của gen đích được nghiên cứu. Bằng cách áp dụng cùng cách thức như trong Ví dụ 2 đối với cấu trúc GM1, aptame xpt-guanin được thể bằng aptame theophylin hoặc aptame adenin ydhl-A, lần lượt tạo ra các cấu trúc TheoM (SEQ ID NO: 16) và YM (SEQ ID NO: 15). Như được thể hiện trên hình 6a, khi không có xử lý bằng theophylin, cấu trúc TheoM biểu hiện mức hoạt tính của luxiferaza giảm, khoảng 43,4% cấu trúc Con8 đối chứng, biểu thị sự phân cắt ARN thông tin gián tiếp nhờ RNaza P. Khi có xử lý bằng theophylin, cấu trúc đối chứng biểu hiện mức tăng 2 lần về hoạt tính của luxiferaza, thông qua cơ chế không liên quan đến aptame. Tuy nhiên, cấu trúc TheoM làm tăng 4,1 lần mức biểu hiện luxiferaza, biểu thị tác dụng đặc hiệu với theophylin/aptame. Tương tự, đối với cấu trúc YM, như được thể hiện trên hình 6b, việc xử lý bằng adenin làm tăng hoạt tính của luxiferaza 2,2 lần ở cấu trúc đối chứng thông qua cơ chế không liên quan đến aptame. Tuy nhiên, cấu trúc YM làm tăng 3,3 lần mức độ biểu hiện luxiferaza, biểu thị tác dụng đặc hiệu đối với adenin/aptame.

Ví dụ 6. Sử dụng kết hợp công tắc ribo dựa trên sự phân cắt bằng RNaza P và công tắc ribo thứ hai để thu được kết quả điều hòa nghiêm ngặt hơn sự biểu hiện của gen đích.

Quy trình thử nghiệm:

Catxet công tắc ribo G15 hoặc G17 hoặc catxet đối chứng không có aptame đã được phát triển trước đây (xem các ví dụ 5 và 8 và SEQ ID NO: 46 và 15 của WO2016/126747, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Để tạo ra cấu trúc GM1-G15 hoặc GM1-G17, phân đoạn chứa các trình tự aptame guanin và mascARN được giải phóng khỏi cấu trúc GM1 nhờ tiêu bằng BamHI và XhoI và được tách dòng vào cấu trúc G15 hoặc G17 đã được tiêu cũng bằng chính các enzym cắt giới hạn này. Catxet điều hòa G17_2IR3 (xem SEQ ID NO: 31 của WO2016/126747, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) được tách dòng ở vị trí 308 ở ADN bổ trợ erythropoietin của chuột nhắt bằng cách áp dụng chiến lược tách dòng Golden Gate để tạo ra Epo-G17_2IR3. Phân đoạn chứa các trình tự aptame guanin và mascARN được giải phóng khỏi cấu trúc GM1 nhờ tiêu bằng BamHI và XhoI và được tách dòng vào Epo-G17_2IR3 đã được tiêu cũng bằng chính các enzym cắt giới hạn này để tạo ra cấu trúc Epo-GM1-G17_2IR3.

ELISA đối với erythropoietin của chuột nhắt: Chuyển nhiễm được thực hiện như đã được bộc lộ trong Ví dụ 1. Các tế bào HEK293 đã được chuyển nhiễm được xử lý bằng hoặc không bằng 500 μ M guanin. Các dịch nổi từ các tế bào đã chuyển nhiễm được gom 20 giờ sau khi xử lý bằng phôi tử và được đưa đi phân tích ELISA. ELISA được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (R&D).

Kết quả:

Các cấu trúc biểu hiện chứa GM1 thông qua 8 công tắc ribo có sự biểu hiện gốc của gen đích ở mức độ đáng kể. Ngoài ra, công tắc ribo dựa trên cách ghép nối khác đã phát triển trước đây cũng có sự biểu hiện gốc ở mức độ nhất định. Việc sử dụng kết hợp các công tắc nối tiếp này có tiềm năng siết chặt sự biểu hiện gốc và nhờ đó điều hòa sự biểu hiện của gen đích một cách nghiêm ngặt hơn.

Để thể hiện điều này, công tắc ribo G15 được kết hợp với công tắc ribo dựa trên tARN-RNaza P. Công tắc ribo G15 dựa trên cách ghép nối luân phiên được điều biến bởi aptame xpt-guanin và có sự biểu hiện gốc ở mức độ nhất định, mà làm giảm số lần cảm ứng đáp lại việc xử lý bằng guanin phôi tử aptame. Để làm giảm mức độ biểu hiện gốc so với cấu trúc G15, 3'UTR được thay thế bằng loại từ cấu trúc GM1, tạo ra cấu trúc GM1-G15 mà chứa hai công tắc ribo. Như được thể hiện trên hình 7a, khi không có phôi tử aptame (guanin), mức biểu hiện gốc của luxiferaza của GM1-G15 bị giảm đáng kể đến khoảng 45% hoạt tính của luxiferaza so với G15. Khi có xử lý bằng guanin, mức độ hoạt tính của luxiferaza được cảm ứng từ GM1-G15 là 96% của G15 nhưng số lần cảm ứng là cao hơn G15 (215 lần so với 100 lần), do mức biểu hiện gốc giảm. Chiến lược tương tự được áp dụng để tạo ra cấu trúc GM1-G17, trong đó G17 có mức độ biểu hiện gốc thấp hơn nhiều so với G15. Việc tổ hợp G17 với GM1 làm giảm tiếp mức độ biểu hiện gốc của gen đích và tạo ra số lần cảm ứng cao hơn đối với sự biểu hiện của gen đích đáp lại xử lý bằng guanin, như được thể hiện trên hình 7b. Các kết quả tương tự đạt được khi công tắc GM1 được kết hợp với G17_2IR3 để điều hòa sự biểu hiện của protein erythropoietin của chuột nhắt, như được thể hiện trên Hình 7c.

Các kết quả này thể hiện rằng công tắc nghiêm ngặt hơn có thể được tạo ra bằng cách kết hợp nối tiếp hai công tắc mà có mức biểu hiện gốc. Các aptame ở công tắc kép này có thể là các aptame giống nhau hoặc khác nhau mà liên kết với các phôi tử giống

nhau hoặc khác nhau như được thể hiện trong bản mô tả này, hoặc các aptame đáp ứng với các phối tử khác nhau.

YÊU CẦU BẢO HỘ

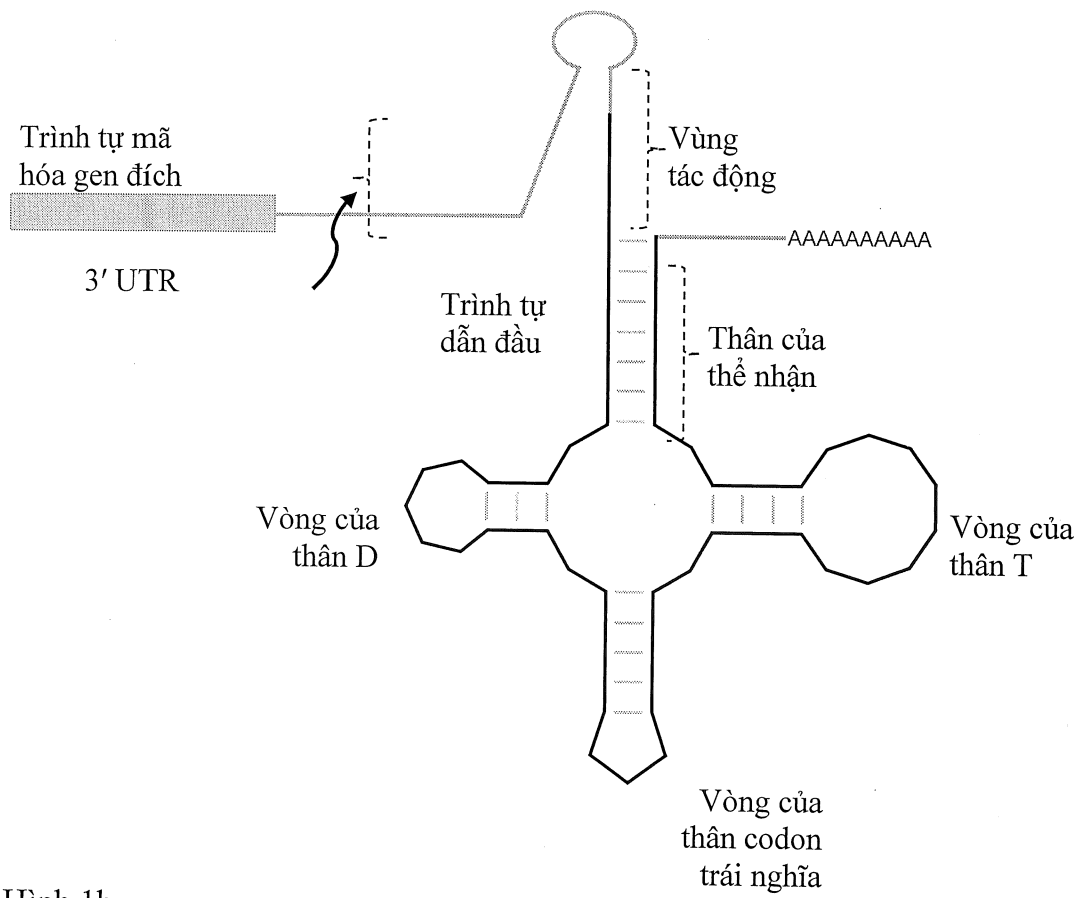
1. Catxet polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện của gen đích, catxet polynucleotit mã hóa trình tự cơ chất của RNaza P, trong đó trình tự cơ chất của RNaza P này có cấu trúc kiểu tARN chứa trình tự dẫn đầu và thân nhận, được liên kết với công tắc ribo, trong đó công tắc ribo chứa vùng tác động được liên kết với trình tự aptame, trong đó vùng tác động chứa một trình tự bổ sung cho một phần của trình tự cơ chất của RNaza P, trong đó khi aptame không được liên kết với phối tử của nó, thì vùng tác động không tạo nên nhánh và cho phép tiếp cận đến trình tự cơ chất RNaza P, bằng cách đó dẫn đến sự phân cắt bởi RNaza P; và trong đó khi aptame được liên kết với phối tử của nó, thì vùng tác động tạo nên thân chứa một phần của trình tự cơ chất RNaza P, bằng cách đó ngăn ngừa sự phân cắt của trình tự cơ chất bởi RNaza P.
2. Catxet polynucleotit theo điểm 1, trong đó aptame liên kết với phối tử phân tử nhỏ.
3. Catxet polynucleotit theo điểm 1, trong đó trình tự cơ chất của RNaza P chứa trình tự mã hóa tARN, mascARN, cấu trúc kiểu tARN MEN beta, cấu trúc kiểu tARN của virus, cơ chất mô hình của RNaza P, và các trình tự tương đồng mà có thể khơi mào quá trình phân cắt RNaza P.
4. Catxet polynucleotit theo điểm 1, trong đó thân của vùng tác động gồm 6 đến 12 cặp bazơ.
5. Catxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó trình tự aptame nằm ở phía 5' so với trình tự cơ chất của RNaza P và vùng tác động chứa trình tự bổ trợ cho trình tự dẫn đầu của cơ chất RNaza P.
6. Catxet polynucleotit theo điểm 5, trong đó thân của thể nhận của cơ chất RNaza P và vùng tác động công tắc ribo được tách bởi 0, 1, 2, 3, hoặc 4 nucleotit.
7. Catxet polynucleotit theo điểm 5, trong đó vùng tác động còn chứa trình tự bổ trợ cho trình tự thân của thể nhận của cơ chất RNaza P.
8. Catxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó trình tự aptame nằm ở phía 3' so với trình tự cơ chất của RNaza P và vùng tác động chứa trình tự bổ trợ cho thân của thể nhận 3' của trình tự cơ chất của RNaza P.

9. Catxet polynucleotit theo điểm 8, trong đó trình tự của vùng tác động hỗ trợ cho thân của thể nhận 3' của cơ chất RNaza P gồm 1 đến 7 nucleotit.
10. Phương pháp điều hòa sự biểu hiện của gen đích bao gồm các bước:
 - a. cài xen catxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 vào vùng chưa được dịch mã (UTR) của gen đích,
 - b. đưa gen đích chứa catxet polynucleotit vào tế bào *ex vivo* hoặc *in vitro*, và
 - c. cho tế bào tiếp xúc với phối tử phân tử nhỏ mà liên kết một cách đặc hiệu với aptame với lượng hữu hiệu để tăng mức độ biểu hiện của gen đích.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó trình tự aptame của catxet polynucleotit nằm ở phía 5' so với trình tự cơ chất của RNaza P và vùng tác động chứa trình tự hỗ trợ cho trình tự dẫn đầu của cơ chất RNaza P.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó thân của thể nhận của cơ chất RNaza P và vùng tác động công tắc ribo được tách bởi 0, 1, 2, 3, hoặc 4 nucleotit.
13. Phương pháp theo điểm 10, trong đó trình tự aptame của catxet polynucleotit nằm ở phía 3' so với trình tự cơ chất của RNaza P và vùng tác động chứa trình tự hỗ trợ cho thân của thể nhận 3' của trình tự cơ chất của RNaza P.
14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó trình tự của vùng tác động mà là hỗ trợ cho thân của thể nhận 3' của cơ chất RNaza P gồm 1 đến 7 nucleotit.
15. Phương pháp theo điểm 10, trong đó catxet polynucleotit được cài xen vào vùng 5' chưa được dịch mã của gen đích.
16. Phương pháp theo điểm 10, trong đó catxet polynucleotit được cài xen vào vùng 3' chưa được dịch mã của gen đích.
17. Phương pháp theo điểm 10, trong đó hai hoặc nhiều catxet polynucleotit được cài xen vào gen đích.
18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó hai hoặc nhiều catxet polynucleotit chứa các aptame khác nhau mà liên kết một cách đặc hiệu với các phối tử phân tử nhỏ khác nhau.

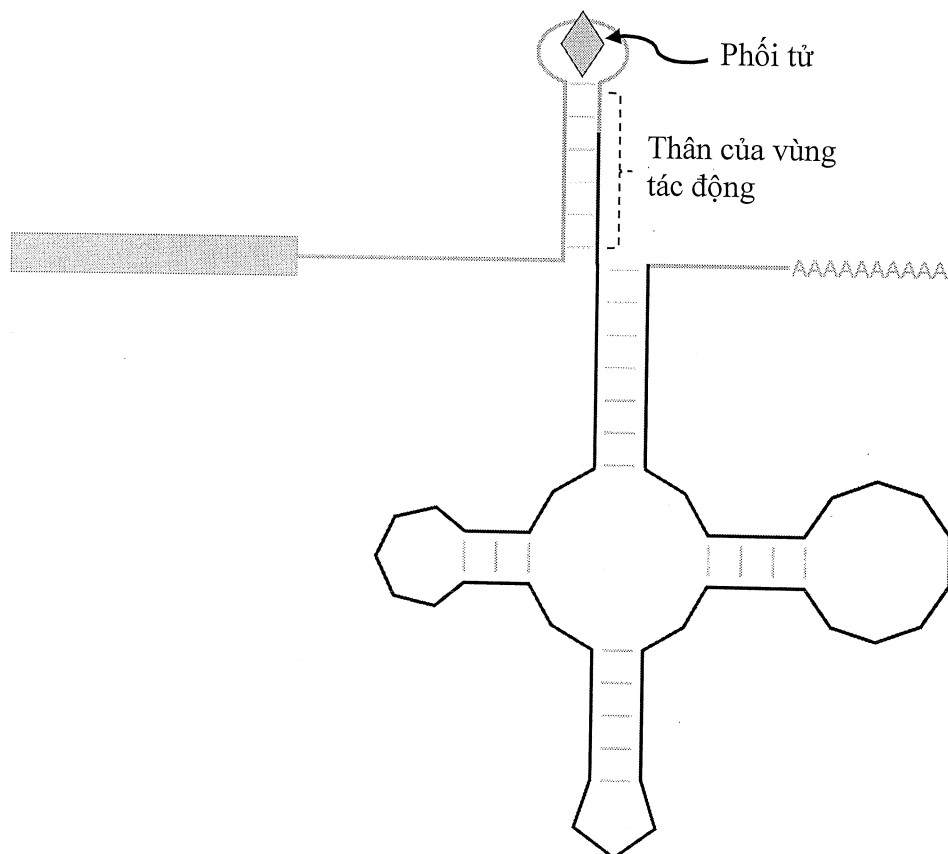
19. Phương pháp theo điểm 17, trong đó hai hoặc nhiều catxet polynucleotit chứa cùng một aptame.
20. Phương pháp theo điểm 10, trong đó gen đích còn chứa catxet điều hòa gen mà điều biến sự biểu hiện của gen đích bằng cách điều hòa gián tiếp qua aptame cách ghép nối khác.
21. Phương pháp theo điểm 10, trong đó gen đích chứa catxet polynucleotit được tích hợp vào vector để biểu hiện gen đích.
22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó vector là vector virus.
23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó vector virus được chọn từ nhóm bao gồm vector adenovirus, vector virus kết hợp adeno, và vector lentivirus.
24. Vector chứa gen đích mà chứa catxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.
25. Vector theo điểm 24, trong đó vector là vector virus.
26. Vector theo điểm 25, trong đó vector virus được chọn từ nhóm bao gồm vector adenovirus, vector virus kết hợp adeno, và vector lentivirus.
27. Vector theo điểm 24, trong đó gen đích còn chứa catxet điều hòa gen mà điều biến sự biểu hiện của gen đích bằng cách điều hòa gián tiếp qua aptame cách ghép nối khác.

Hình 1a.

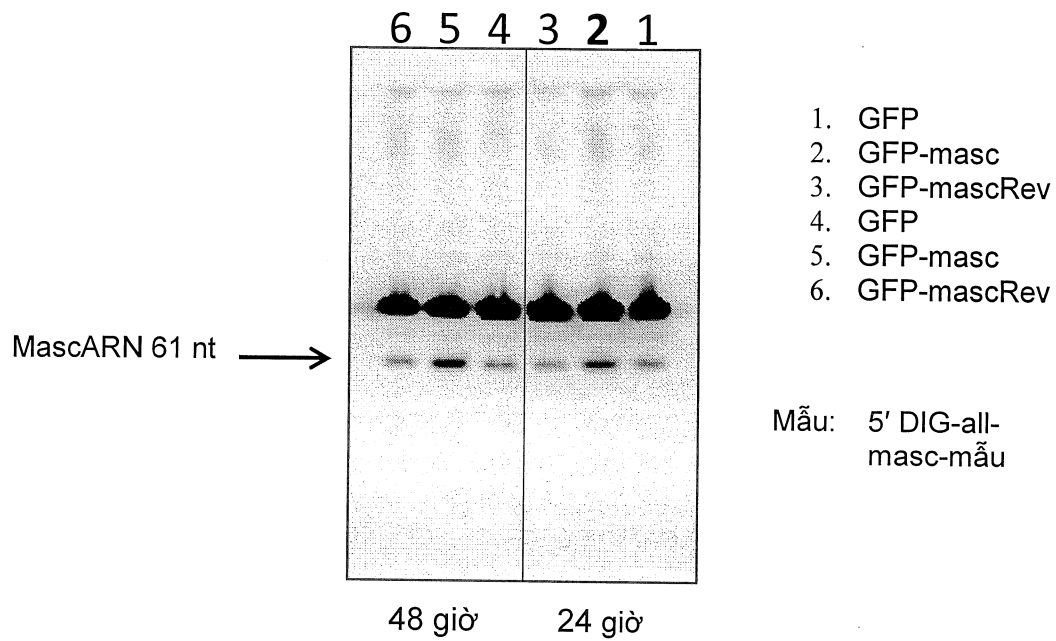
Aptame



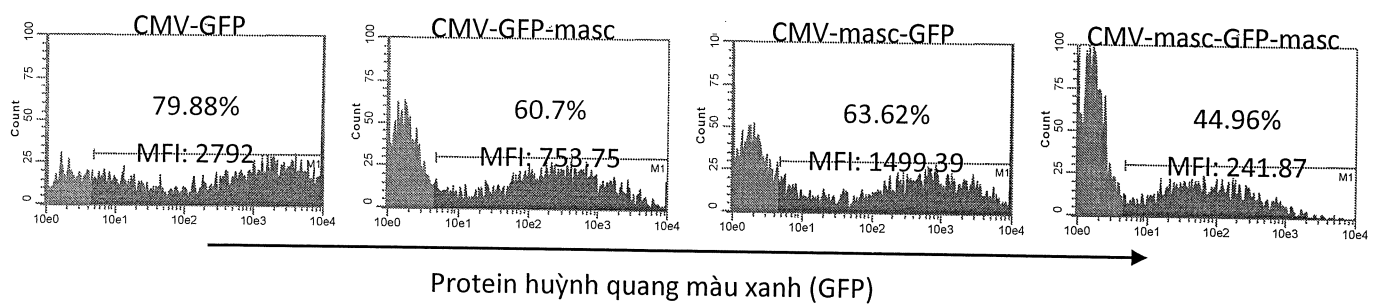
Hình 1b.



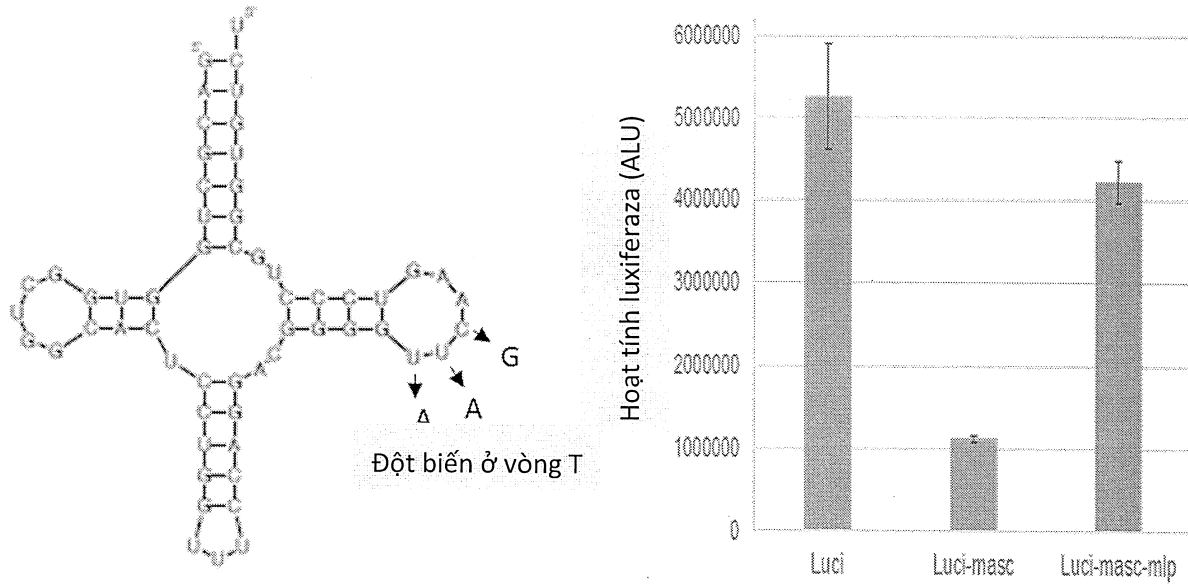
Hình 2a.



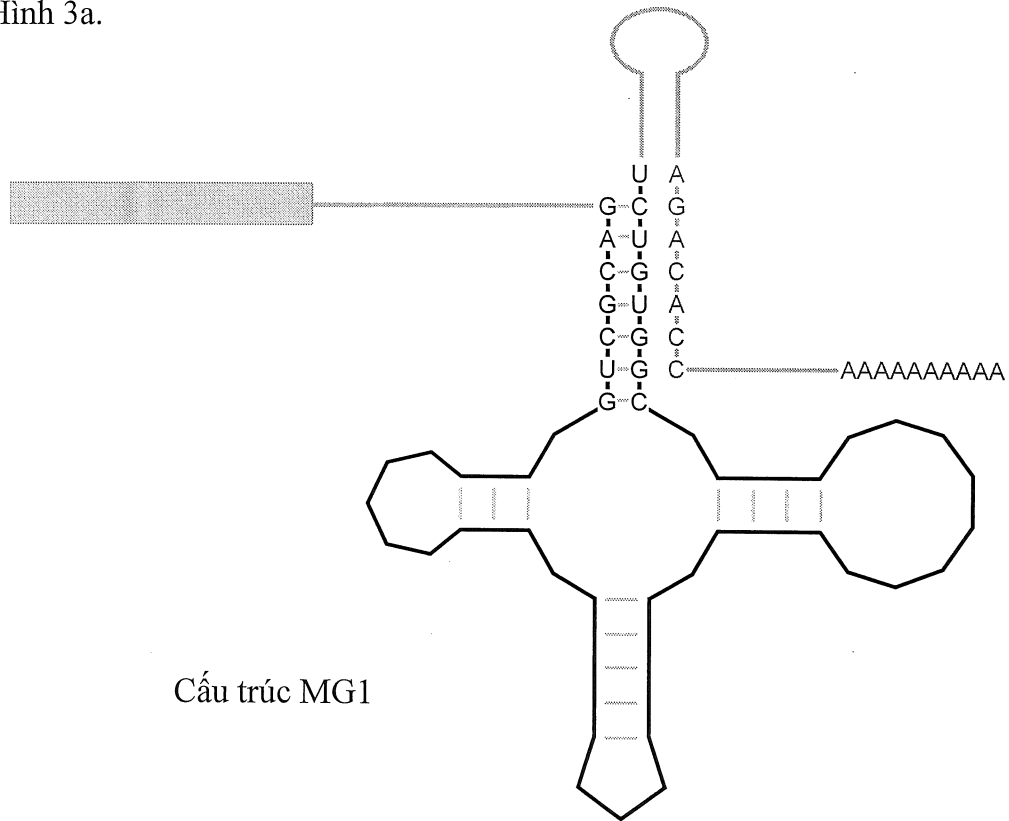
Hình 2b.



Hình 2c

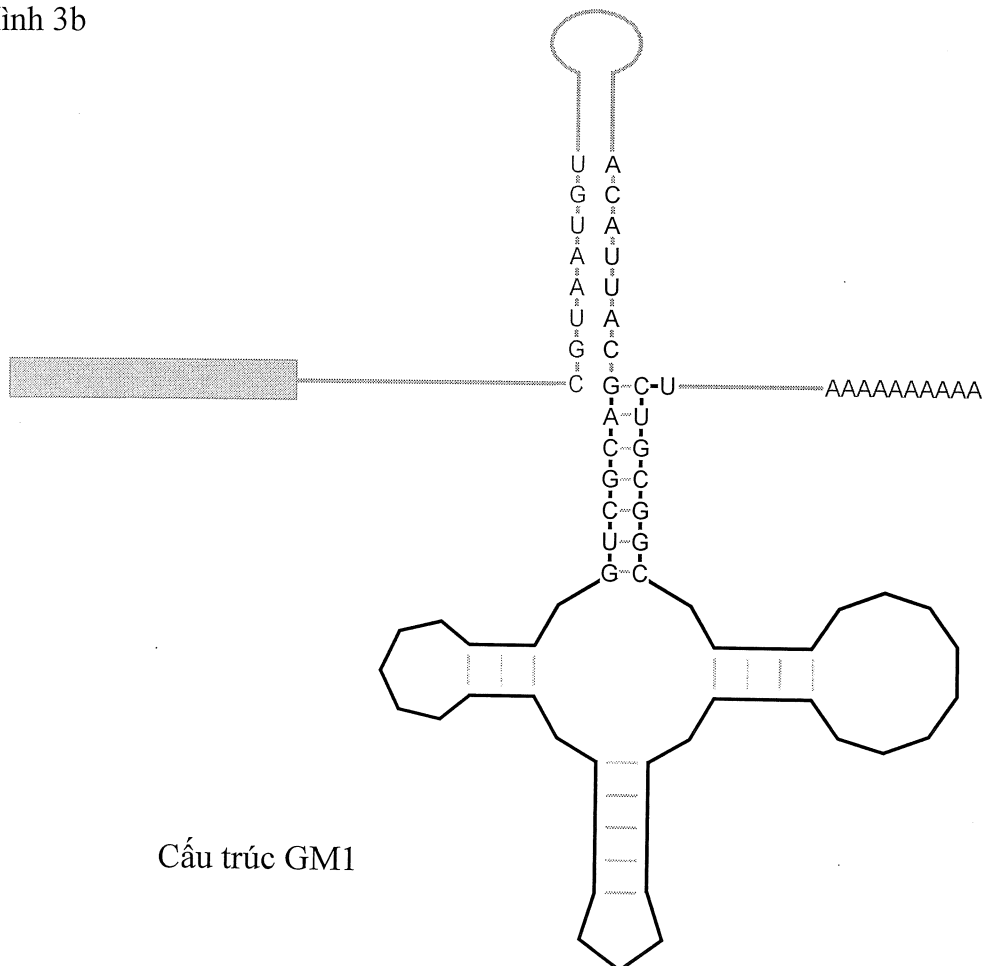


Hình 3a.



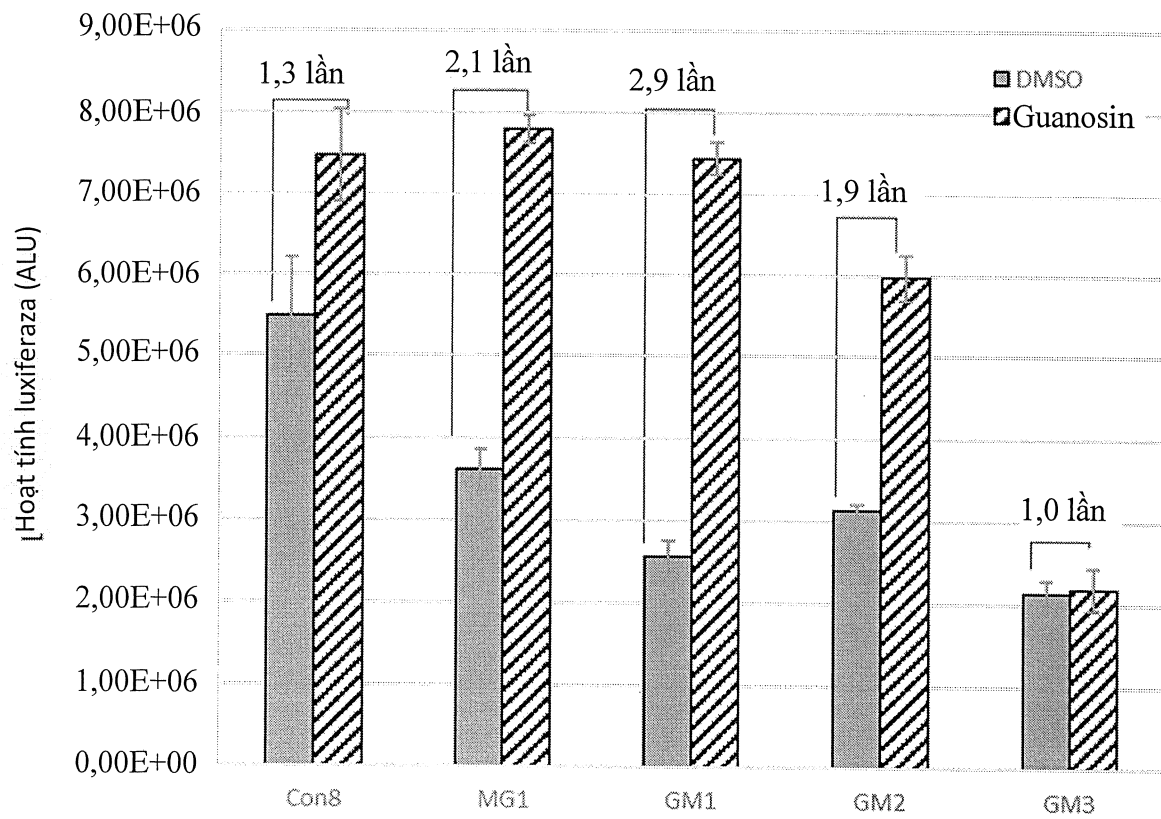
Cấu trúc MG1

Hình 3b

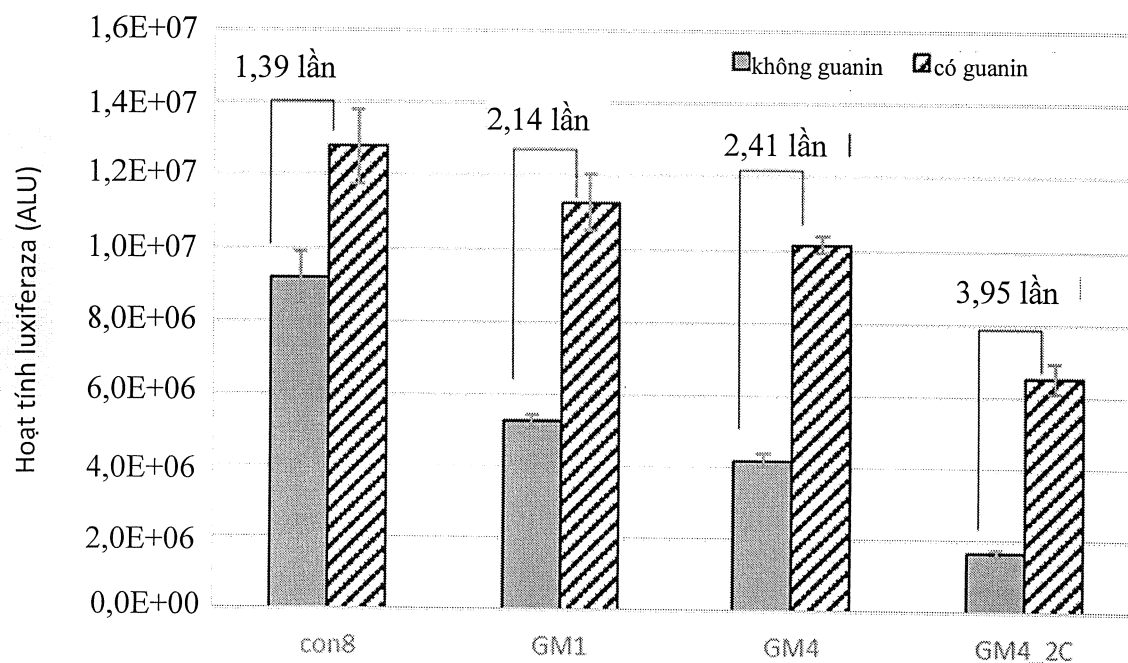


Cấu trúc GM1

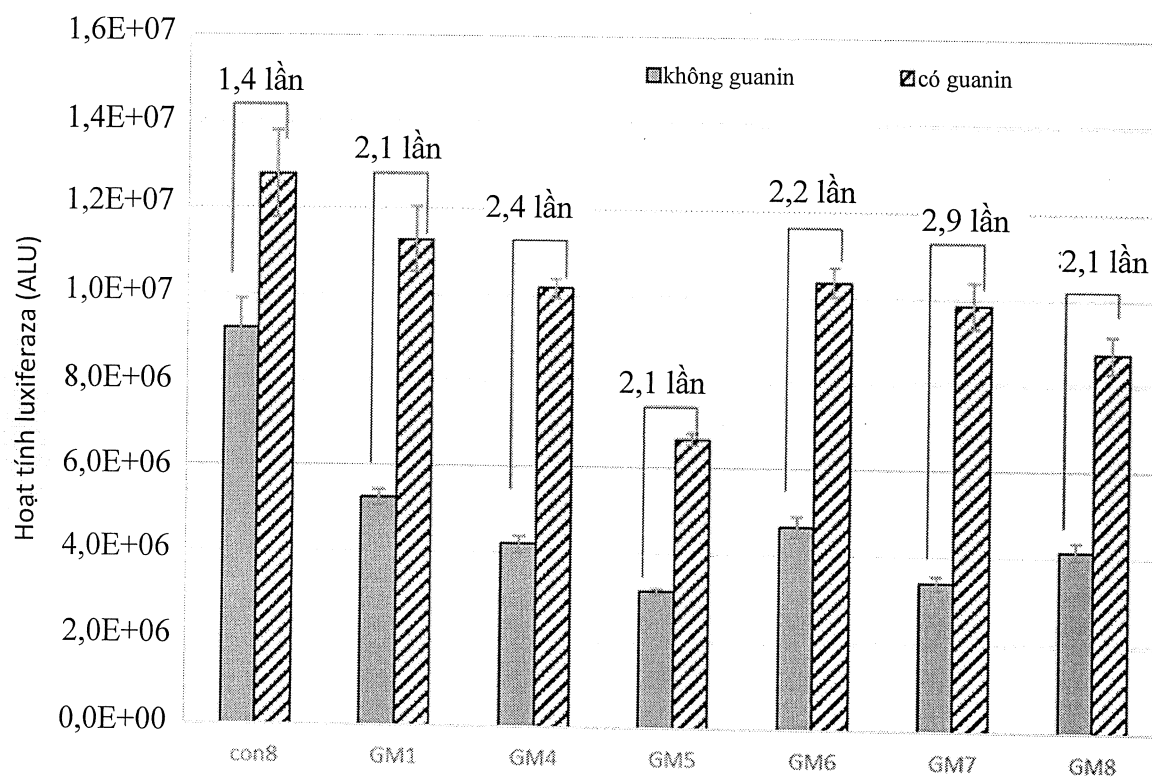
Hình 3c.



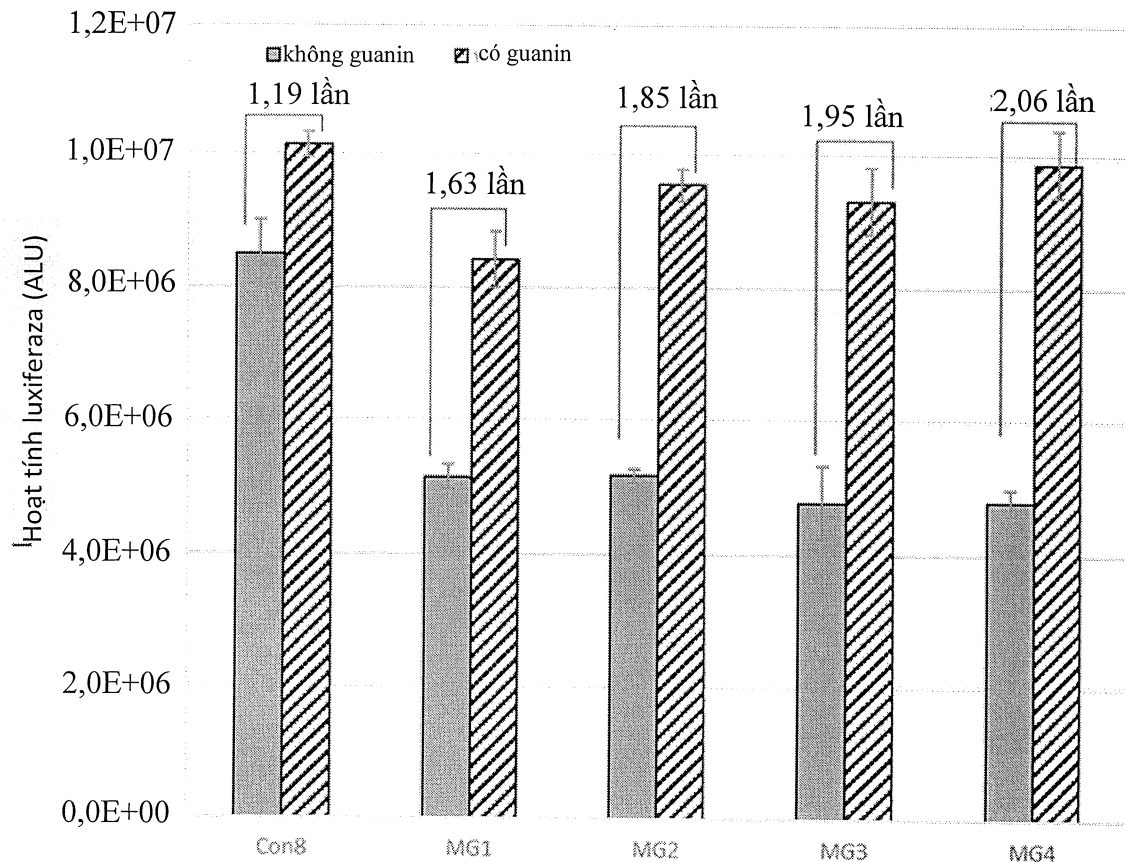
Hình 4a.



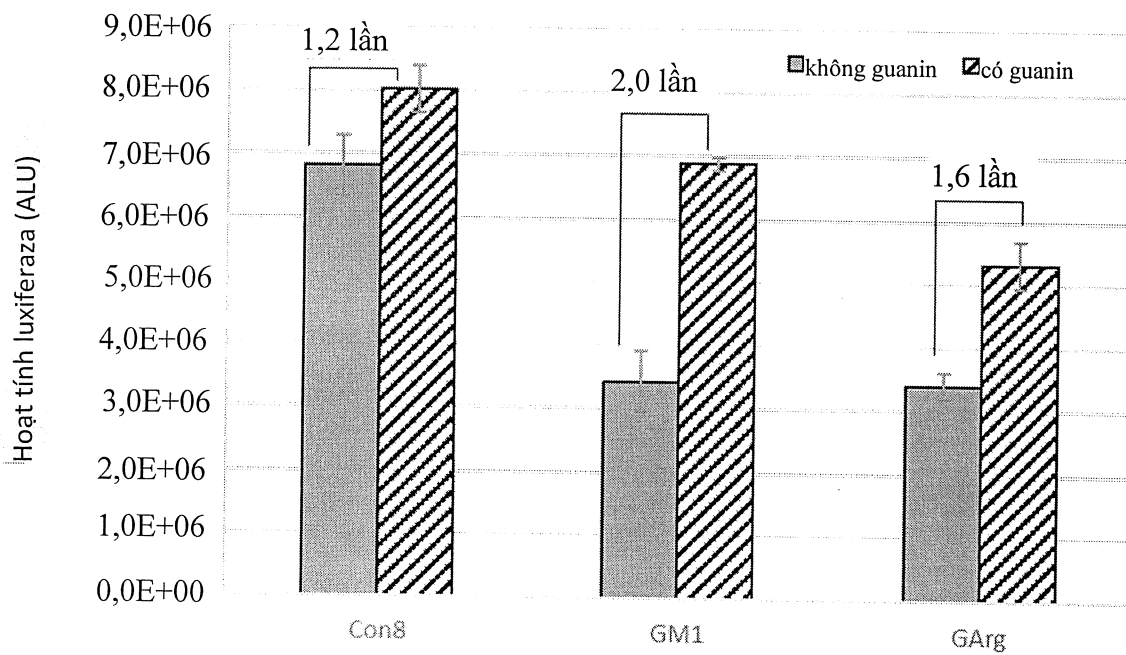
Hình 4b.



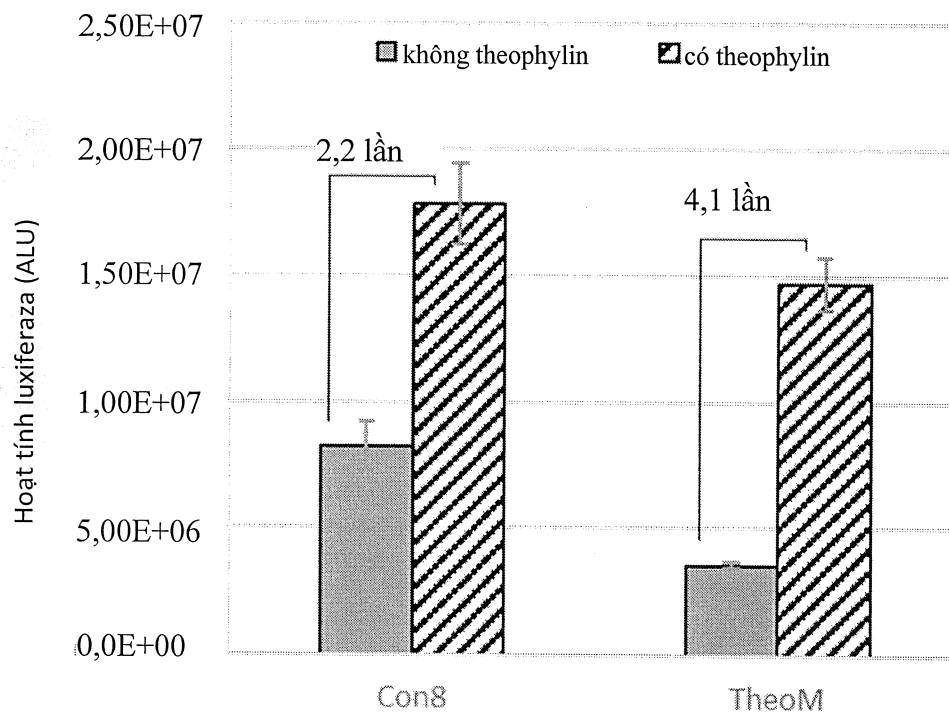
Hình 4c.



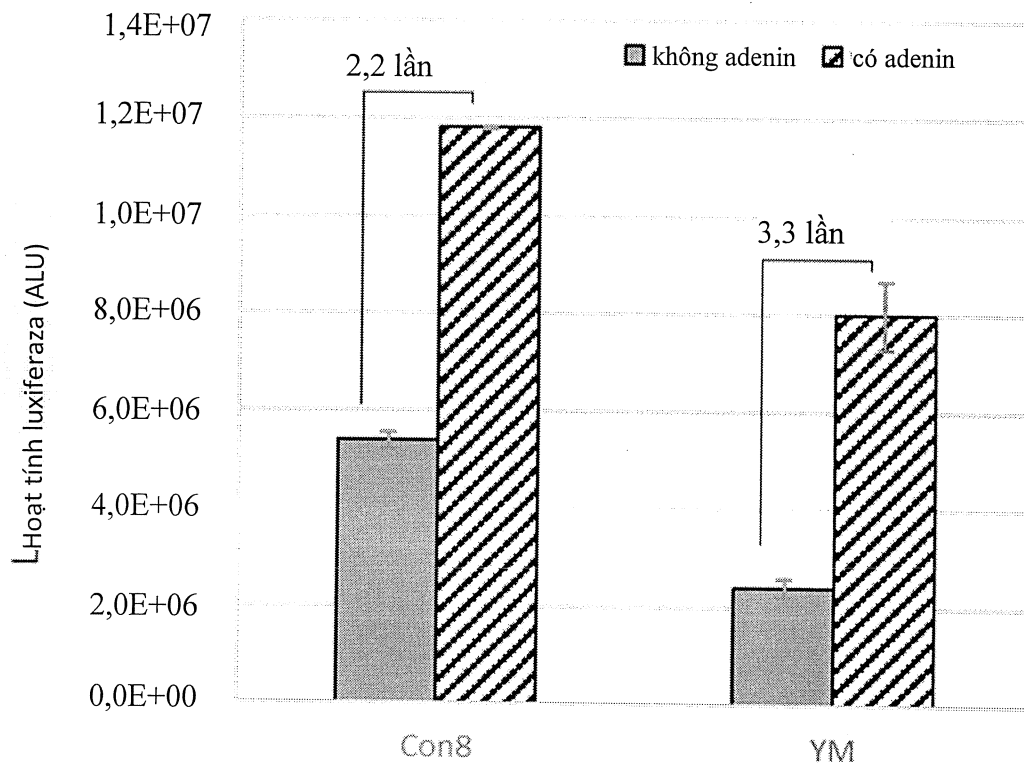
Hình 5.



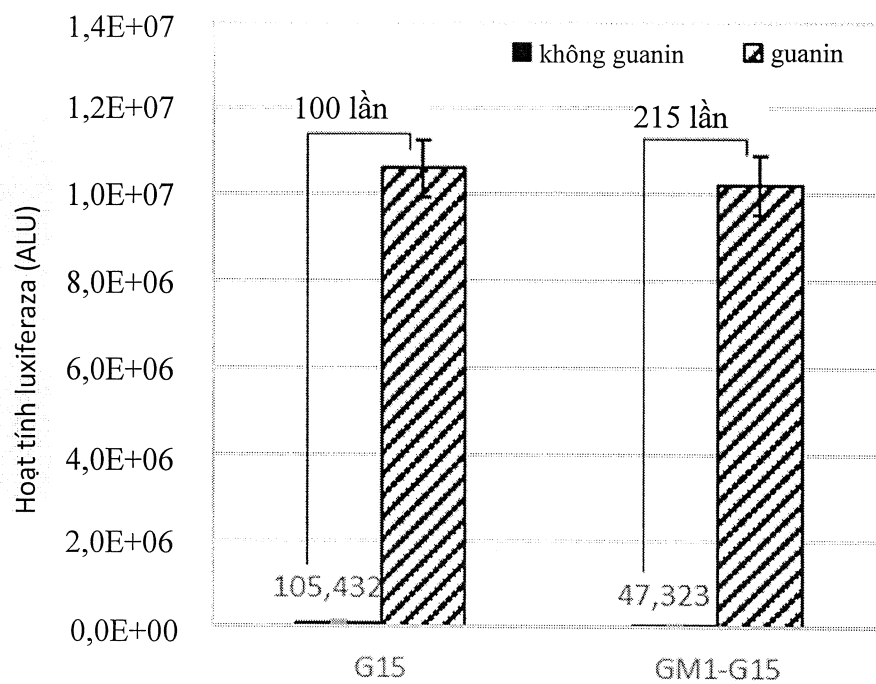
Hình 6a.



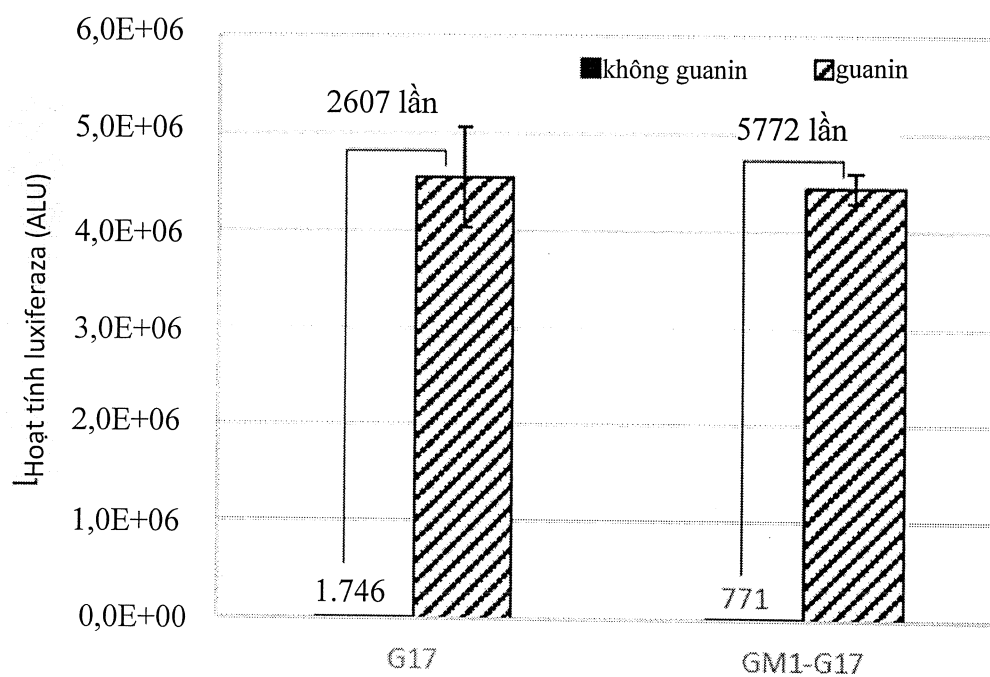
Hình 6b.



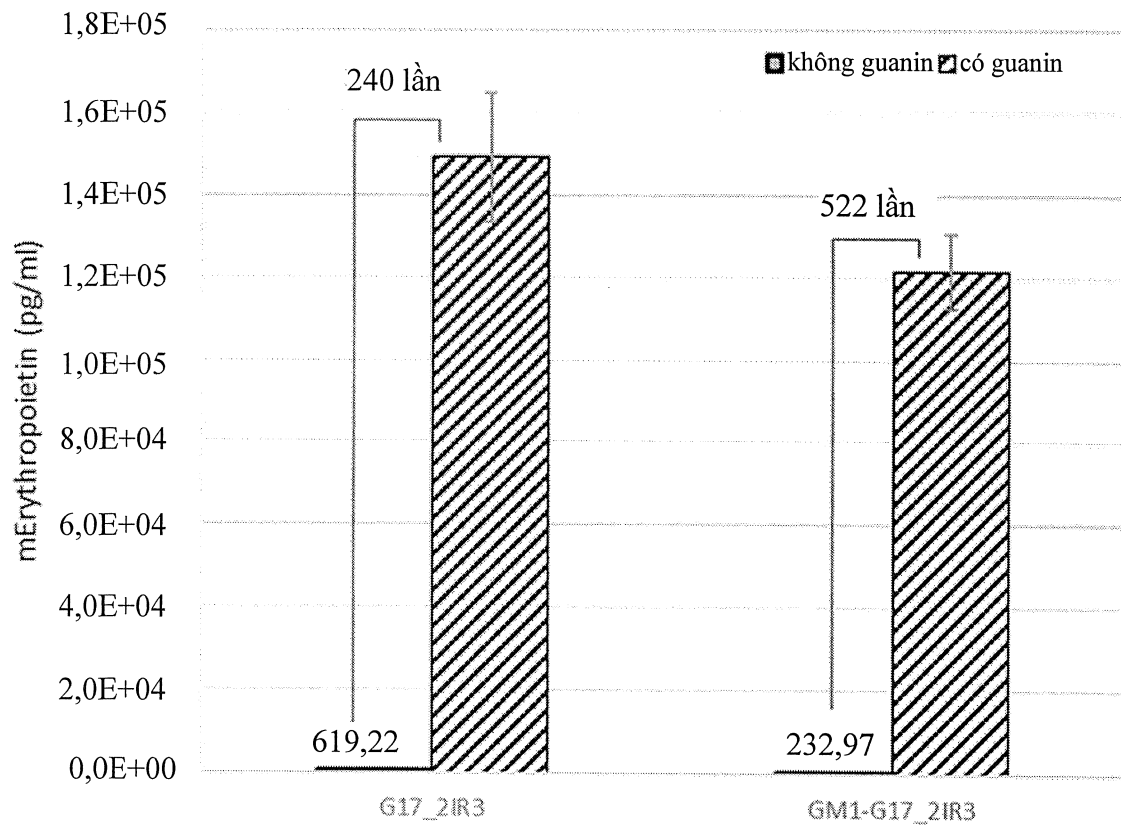
Hình 7a.



Hình 7b.



Hình 7c.



Hình 8.

MG1 (SEQ ID NO: 1):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatccaagacgagc
tgtacaagtaaagcggccaattcggacaaaaacgagacgctgggtggctggcactcctggttccaggacgggggtcaagt
ccctgcgggtgtctataatcgctgggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactagacaccatctaga
gtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggcccagatctaattcacccaccagtgcaggctgcctatcag

GM1 (SEQ ID NO: 2):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatccaagacgagc
tgtacaagtaaagcggccgtaattgtataatcgctgggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactac
attacgacgctgggtggctggcactcctggttccaggacgggggtcaagtccctgcgggtgtctttgcttgatcgccgcga
ctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggcccagatctaattcacccaccagtgcaggctgcct
atcag

GM2 (SEQ ID NO: 3):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatccaagacgagc
tgtacaagtaaagcggccgatcatataatcgctgggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactat
ggctgacgctgggtggctggcactcctggttccaggacgggggtcaagtccctgcgggtgtctttgcttgatcgccgcga
ctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggcccagatctaattcacccaccagtgcaggctgcct
atcag

GM3 (SEQ ID NO: 4):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatccaagacgagc
tgtacaagtaaagcggccggacaaaataatcgctgggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgacttt
tgtccaacgagacgctgggtggctggcactcctggttccaggacgggggtcaagtcctgcgggtgtctttgcttgatcggc
cgcgactctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggcccagatctaattcacccaccagtgcagg
ctgcctatcag

GM4 (SEQ ID NO: 5):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatccaagacgagc
tgtacaagtaaagaagacgtaattgtataatcgctgggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactac
attacgacgctgggtggctggcactcctggttccaggacgggggtcaagtcctgcgggtgtctttgcttgatcgccgcga
ctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggcccagatctaattcacccaccagtgcaggctgcct
atcag

Hình 8 (tiếp theo).

GM4_2C (SEQ ID NO: 6):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatccaagacgagc
tgtacaagtaaagaagacgtaatgtataatcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactac
attacgacgctgggtggctggcactcctggtttccaggacgggggtcaagtcctgcggtgtctttgcttggatcgccgcga
ctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttcagaagtaaagaagacgtaatgtataatcgctggatatggcacgcaagtt
tctaccgggcaccgtaaatgtccgactacattacgacgctgggtggctggcactcctggtttccaggacgggggtcaagtcct
ctgcggtgtctttgcttggatcgccgcgactctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggccagat
ctaattcaccaccagtgaggctgcctatcag

GM5 (SEQ ID NO: 7):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatcCAAGAC
GAGCTGTACAAGTAAAGaagagcta atgtataatcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccg
taaatgtccgactacattacgacgctgggtggctggcactcctggtttccaggacgggggtcaagtcctgcggtgtctttg
cttggatcgccgcgactctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggccagatctaattcacccca
ccagtgaggctgcctatcag

GM6 (SEQ ID NO: 8):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatccaagacgagc
tgtacaagtaaagaagagcta atgtataatcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactac
attagcagacgctgggtggctggcactcctggtttccaggacgggggtcaagtcctgcggtgtctttgcttggatcgccgcg
gactctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggccagatctaattcaccaccagtgaggctgc
ctatcag

GM7 (SEQ ID NO: 9):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatccaagacgagc
tgtacaagtaaagaagagcta atgtataatcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactac
attagcagacgctgggtggctggcactcctggtttccaggacgggggtcaagtcctgcggtgtctttgcttggatcgccgcg
cgactctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggccagatctaattcaccaccagtgaggctgc
cctatcag

GM8 (SEQ ID NO: 10):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatccaagacgagc
tgtacaagtaaagaagagcta atgtataatcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactac
attagccgagacgctgggtggctggcactcctggtttccaggacgggggtcaagtcctgcggtgtctttgcttggatcgccgcg
cgactctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggccagatctaattcaccaccagtgaggctgc
cctatcag

Hình 8 (tiếp theo).

MG2 (SEQ ID NO: 11):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatccaagacgagc
tgtacaagtaaagcggccaattcggacaaaaacgagacgctgggtggctggcactcctggttccaggacgggggtcaagt
ccctgcgggtgtcttataatcgctgggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactaagacacatctaga
gtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggcccagatctaattcaccaccagtgaggctgcctatcag

MG3 (SEQ ID NO: 12):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatccaagacgagc
tgtacaagtaaagcggccaattcggacaaaaacgagacgctgggtggctggcactcctggttccaggacgggggtcaagt
ccctgcgggtgtcttataatcgctgggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacagacaatctag
agtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggcccagatctaattcaccaccagtgaggctgcctatcag

MG4 (SEQ ID NO: 13):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatcCAAGAC
GAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCaattCGGACAAAAACGAgacgctgggtggctggcactc
ctggttccaggacgggggtcaagtcctgcgggtgtctagataatcgctgggatatggcacgcaagtttctaccgggcacc
gtaaatgtccgactactagacttctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggcccagatctaattcac
cccaccagtgaggctgcctatcag

GArg (SEQ ID NO: 14):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatccaAgacgag
ctgtacaagtaaagaagactgcgacgataatcgctgggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgact
cgctgcagggccagtgggcgcaatggataacgegtctgactaeggatcagaagattccaggttcgactcctggctggctc
ggtgtaggccgcgactctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggcccagatctaattcaccacc
agtgcaggctgcctatcag

YM (SEQ ID NO: 15):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAg gatcCAAGAC
GAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCcgtaatgttataacctcaataatggtttgaggggtgtctaccaggaac
cgtaaaatcctgattaacattacgacgctgggtggctggcactcctggttccaggacgggggtcaagtcctgcgggtgtctt
gcttggatcgggccgcgactctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggcccagatctaattcaccac
accagtgaggctgcctatcag

Hình 8 (tiếp theo).

TheoM (SEQ ID NO: 16):

CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAggatcCAAGAC
GAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCtaatgtgataccagccgaaaggcccttggcagcacattagacgctg
gtggctggcactcctggttccaggacgggggtcaagtcctgcgggtgtcttgttgccttgatcggccgcgactctagagtcga
cctgcaggcatgcaagcttcagctgctcgagggcccagatctaattcaccaccagtcaggtgcctatcag

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Meiragtx UK II Limited
- <120> CATXET POLYNUCLEOTIT ĐỂ ĐIỀU HÒA SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÍCH, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU HÒA SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÍCH VÀ VECTƠ CHỨA GEN ĐÍCH
- <130> 162027.48501
- <140> 16/487,587
- <141> 2018-08-021
- <150> PCT/US2018/020795
- <151> 2018-03-02
- <150> US 62/466,138
- <151> 2017-03-02
- <160> 19
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
- <211> 296
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> Cấu trúc tổng hợp
- <400> 1
- cctcataaag gccagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60
- aagtaaagcg gccaatccg acaaaaacga gacgctggcg gctggcactc ctggtttcca
120
- ggacgggggt caagtcctg cgggtgtctat aatcgcggtg atatggcacg caagtttcta
180
- ccgggcaccg taaatgtccg actagacacc atctagagtc gacctgcagg catgcaagct
240
- tcagctgctc gagggcccag atctaattca cccaccagt gcaggctgcc tatcag
296
- <210> 2
- <211> 305
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2

cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60

aagtaaagcg gccgtaatgt ataatcgcggt ggatatggca cgcaagtttc taccgggcac
120

cgtaaagtgc cgactacatt acgacgctgg tggctggcac tcctggtttc caggacgggg
180

ttcaagtccc tgcggtgtct ttgcttggat cggccgcgac tctagagtcg acctgcaggc
240

atgcaagctt cagctgctcg agggcccaga tctaattcac ccaccagtg caggctgcct
300

atcag
305

<210> 3

<211> 304

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3

cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60

aagtaaagcg gcccgatcat ataatcgcggt ggatatggca cgcaagtttc taccgggcac
120

cgtaaagtgc cgactatgggt cgacgctgggt ggctggcact cctgggtttcc aggacgggggt
180

tcaagtccct gcggtgtctt tgcttggatc ggccgcgact ctagagtcga cctgcaggca
240

tgcaagcttc agctgctcga gggcccagat ctaattcacc ccaccagtg aggetgccta
300

tcag
304

<210> 4

<211> 310

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60aagtaaagcg gccggacaaa ataatcgcggt ggatatggca cgcaagtttc taccgggcac
120cgtaaagtgc cgacttttgt ccaacgagac gctggtggct ggcaactcctg gtttccagga
180cggggttcaa gtccctgcgg tgtctttgct tggatcggcc gcgactctag agtcgacctg
240caggcatgca agcttcagct gctcgagggc ccagatctaa ttcaccccac cagtgcaggc
300

tgcctatcag

310

<210> 5

<211> 305

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 5

cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60aagtaaagaa gacgtaatgt ataatcgcggt ggatatggca cgcaagtttc taccgggcac
120cgtaaagtgc cgactacatt acgacgctgg tggctggcac tcctgggttc caggacgggg
180ttcaagtccc tgcggtgtct ttgcttgat cgcccgcgac tctagagtcg acctgcaggc
240atgcaagctt cagctgctcg agggcccaga tctaattcac cccaccagtg caggctgcct
300

atcag

305

<210> 6

<211> 498

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6

cctcataaag gccagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60

aagtaaagaa gacgtaatgt ataatcgcggt ggatatggca cgcaagtttc taccgggcac
120

cgtaaagtgc cgactacatt acgacgctgg tggctggcac tcctgggttc caggacgggg
180

ttcaagtccc tgcggtgtct ttgcttggat cggccgcgac tctagagtcg acctgcaggc
240

atgcaagctt cagaagtaaa gaagacgtaa tgtataatcg cgtggatatg gcacgcaagt
300

ttctaccggg caccgtaaat gtccgactac attacgacgc tgggtggctgg cactcctggg
360

ttccaggacg gggttcaagt ccctgcggtg tctttgcttg gatcgggccgc gactctagag
420

tcgacctgca ggcatgcaag cttcagctgc tcgagggccc agatctaatt caccacacca
480

gtgcaggctg cctatcag
498

<210> 7

<211> 306

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7

cctcataaag gccagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60

aagtaaagaa gagctaattgt ataatcgcggt ggatatggca cgcaagtttc taccgggcac
120

cgtaaagtgc cgactacatt agcgacgctg gtggctggca ctctgggttt ccaggacggg
180

gttcaagtcc ctgcggtgtc tttgcttggg tcggccgcga ctctagagtc gacctgcagg
240

catgcaagct tcagctgctc gagggcccag atctaattca cccaccagt gcaggctgcc
300

tatcag
306

<210> 8
<211> 307
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8
cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60

aagtaaagaa gagctaattgt ataatcgctt ggatatggca cgcaagtttc taccgggcac
120

cgtaaattgtc cgactacatt agcagacgct ggtggctggc actcctggtt tccaggacgg
180

ggttcaagtc cctgcggtgt ctttgcttgg atcggccgcg actctagagt cgacctgcag
240

gcattgcaagc ttcatctgct cgagggccca gatctaattc acccaccag tgcaggctgc
300

ctatcag
307

<210> 9
<211> 308
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 9
cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60

aagtaaagaa gagctaattgt ataatcgctt ggatatggca cgcaagtttc taccgggcac
120

cgtaaattgtc cgactacatt agcagacgct tgggtggctgg cactcctggt ttccaggacg
180

gggttcaagt ccctgcggtg tctttgcttg gatcggccgc gactctagag tgcacctgca
240

ggcatgcaag cttcagctgc tcgagggccc agatctaatt cacccacca gtgcaggctg
300

cctatcag
308

<210> 10
<211> 309
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10
cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60

aagtaaagaa gagctaattg ataatcgctg ggatatggca cgcaagtttc taccgggcac
120

cgtaaattgc cgactacatt agccgagacg ctggtggctg gcaactcctgg tttccaggac
180

ggggttcaag tccctgcggt gtctttgctt ggatcggccg cgactctaga gtcgacctgc
240

aggcatgcaa gcttcagctg ctcgagggcc cagatctaatt tcaccccacc agtgcaggct
300

gcctatcag
309

<210> 11
<211> 297
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 11
cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60

aagtaaagcg gccaattcgg acaaaaacga gacgctgggtg gctggcactc ctggtttcca
120

ggacgggggtt caagtcacctg cgggtgtctta taatcgcggtg gatatggcac gcaagtttct
180

accggggcacc gtaaattgtcc gactaagaca catctagagt cgacctgcag gcatgcaagc
240

ttcagctgct cgagggccca gatctaattc accccaccag tgcaggctgc ctatcag
297

<210> 12
<211> 298
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12
cctcataaag gccagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60

aagtaaagcg gccaatcgg acaaaaacga gacgctgggtg gctggcactc ctggtttcca
120

ggacgggggtt caagtcacctg cgggtgtctgt ataatcgcggt ggatatggca cgcaagtttc
180

taccgggcac cgtaaattgtc cgactacaga caatctagag tcgacctgca ggcatgcaag
240

cttcagctgc tcgagggccc agatctaatt caccacacca gtgcaggctg cctatcag
298

<210> 13
<211> 299
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13
cctcataaag gccagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60

aagtaaagcg gccaatcgg acaaaaacga gacgctgggtg gctggcactc ctggtttcca
120

ggacgggggtt caagtcacctg cgggtgtctag tataatcgcg tggatatggc acgcaagttt
180

ctaccgggca ccgtaaatgt ccgactacta gacttctaga gtcgacctgc aggcattgcaa
240

gcttcagctg ctcgagggcc cagatctaatt tcaccccacc agtgcaggct gcctatcag
299

<210> 14
<211> 314
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14
cctcataaag gccagaagg gcggaaagat gccggtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60

aagtaaagaa gactgagacg ataatcgctt ggatatggca cgcaagtttc tacggggcac
120

cgtaaatgtc cgactcgctg cagggccagt ggcgcaatgg ataacgcgtc tgactacgga
180

tcagaagatt ccaggttcga ctctggctg gctcgggtga ggccggcact ctagagtcga
240

cctgcaggca tgcaagcttc agctgctcga gggcccagat ctaattcacc ccaccagtgc
300

aggctgccta tcag
314

<210> 15
<211> 307
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15
cctcataaag gccagaagg gcggaaagat gccggtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60

aagtaaagcg gccgtaattg tataacctca ataatatggt ttgaggggtg ctaccaggaa
120

ccgtaaaatc ctgattaaca ttacgacgct ggtggctggc actcctgggt tccaggacgg
180

ggttcaagtc cctgcggtgt ctttgcttgg atcggccgcg actctagagt cgacctgcag
240

gcatgcaagc ttcagctgct cgagggccca gatctaattc accccaccag tgcaggctgc
300

ctatcag
307

<210> 16
<211> 275
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16
cctcataaag gccagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa ggatccaaga cgagctgtac
60

aagtaaagcg gcctaattgtg ataccagccg aaaggccctt ggcagcacat tagacgctgg
120

tggtggcac tcttggtttc caggacgggg ttcaagtccc tgcggtgtct ttgcttgat
180

cggccgcgac tctagagtcg acctgcaggc atgcaagctt cagctgctcg agggcccaga
240

tctaattcac cccaccagtg caggctgcct atcag
275

<210> 17
<211> 58
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mouse masRNA or mutant mouse masRNA inserted in the 3' UTR of a
luciferase gene

<400> 17
gacgcuggug gcuggcacuc cugguuucca ggacggggguu caagucccug cggugucu
58

<210> 18
<211> 58
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đột biến ở vòng T của mascARN (Luci-masc-mlp)

<400> 18

gacgcuggug gcuggcacuc cugguuucca ggacggggaa gaaguccug cggugucu
58

<210> 19

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit đã được cải biến bằng axit nucleic đã bị khóa (LNA)

<400> 19

tggaaccag gaggcca
18