



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

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

(11)



1-0042061

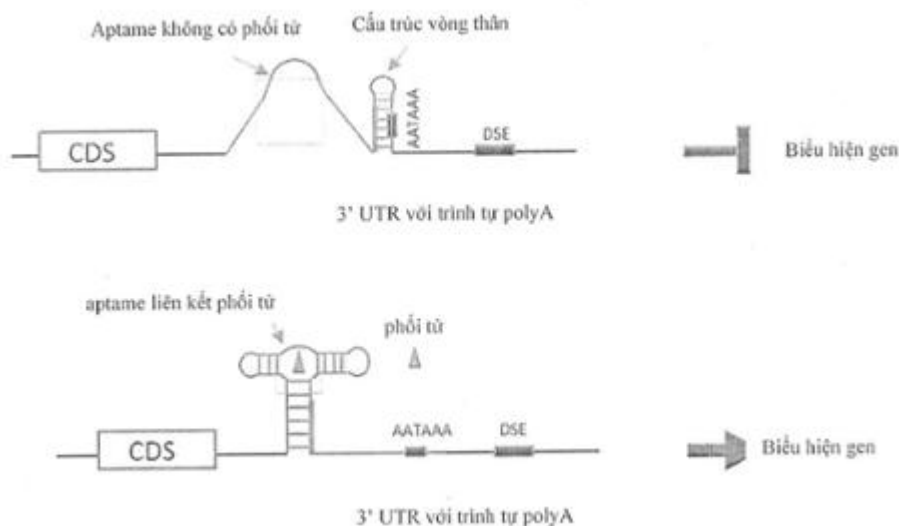
(51)^{2010.01} C12N 15/115; C12N 15/867; C12N
15/864; C12N 15/63; C12N 15/861

(13) B

(21) 1-2019-05125 (22) 21/02/2018
(86) PCT/US2018/019056 21/02/2018 (87) WO 2018/156658 30/08/2018
(30) 62/461,689 21/02/2017 US
(45) 25/12/2024 441 (43) 25/02/2020 383A
(73) MEIRAGTX, UK II Limited (GB)
92 Britannia Walk, London, N1 7NQ, United Kingdom
(72) Xuecui GUO (US); Joonhee HAN (US); Zhaojing ZHONG (US).
(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) CATXET POLYNUCLEOTIT, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU BIẾN SỰ BIỂU HIỆN GEN ĐÍCH BẰNG CÁCH SỬ DỤNG CATXET POLYNUCLEOTIT VÀ VẬT TRUYỀN CHỨA CATXET POLYNUCLEOTIT

(57) Sáng chế đề xuất các catxet polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện gen bằng cách cải biến khả năng tiếp cận một hoặc nhiều tín hiệu polyadenyl hóa dựa trên aptame và các phương pháp sử dụng các cấu trúc này để điều hòa sự biểu hiện gen đáp lại sự có mặt hoặc sự không có mặt của phối tử mà liên kết aptame này. Cấu trúc polynucleotit chứa công tắc ribo chứa aptame và vòng thân tác động, trong đó vòng thân tác động chứa trình tự tín hiệu polyadenyl hóa. Sáng chế còn đề xuất các vật truyền chứa các catxet polynucleotit này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất các cấu trúc polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện gen bằng cách cải biến dựa trên aptame khả năng tiếp cận được một hoặc nhiều tín hiệu polyadenyl hóa và các phương pháp sử dụng các cấu trúc polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện gen đáp lại sự có mặt hoặc sự không có mặt của phối tử mà liên kết aptame này. Cấu trúc polynucleotit chứa công tắc ribo chứa aptame và vòng thân tác động, trong đó vòng thân tác động chứa trình tự tín hiệu polyadenyl hóa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các ARN thông tin (mRNA) trong các tế bào nhân chuẩn được tạo ra từ các bản sao của tiền-ARN thông tin nhờ quá trình xử lý rộng sau phiên mã, kể cả chụp đầu tận cùng 5', loại bỏ các intron bằng cách ghép nối, và phân cắt và polyadenyl hóa đầu tận cùng 3'. Đầu tận cùng 3' của hầu hết tất cả các ARN thông tin của sinh vật có nhân chuẩn chứa đuôi poly(A)—homopolyme gồm 20 đến 250 gốc adenosin. Đuôi poly(A) được bổ sung vào tiền-ARN thông tin ở nhân bằng cách phân cắt và polyadenyl hóa, quy trình được xúc tác bởi phức protein lớn. Việc bổ sung đuôi poly(A) vào phụ thuộc vào sự có mặt của nhiều yếu tố kể cả trình tự tín hiệu polyadenyl hóa AATAAA được bảo toàn ở mức độ cao (hoặc biến thể của nó ATTAAA) được tìm thấy trước vị trí polyadenyl hóa, và các yếu tố trước khác (“USE”), cũng như yếu tố sau (“DSE”) giàu T hoặc GT. Việc bổ sung đuôi poly(A) vào ARN thông tin bảo vệ việc truyền thông tin không bị thoái biến, trong số các chức năng khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất catxet polynucleotit, phương pháp điều biến sự biểu hiện gen đích bằng cách sử dụng catxet polynucleotit và vật truyền chứa catxet polynucleotit để khắc phục các nhược điểm đã biết trong tình trạng kỹ thuật. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất catxet polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện của gen đích chứa công tắc ribo, trong đó công tắc ribo chứa vòng thân tác động và aptame, trong đó vòng thân tác động chứa tín hiệu polyadenyl hóa, và trong đó aptame và vòng thân tác động được liên kết bởi nhánh thân chung theo cách khác chứa trình tự mà là hỗ trợ cho nhánh không chung của

thân aptame này và cho nhánh không chung của vòng thân tác động. Theo một phương án, aptame liên kết phối tử phân tử nhỏ.

Theo các phương án, phần của nhánh thân chung theo cách khác mà là hỗ trợ cho trình tự ở thân aptame và cho trình tự ở vòng thân tác động gồm 4 đến 8 nucleotit, 5 đến 7 nucleotit, 5 nucleotit, hoặc 6 nucleotit. Theo các phương án, thân aptame gồm 6 đến 12 cặp bazơ, 7 đến 10 cặp bazơ, 8 cặp bazơ, hoặc 9 cặp bazơ. Theo các phương án, thân của vòng thân tác động is 4 đến 24 cặp bazơ, 5 đến 20 cặp bazơ, 9 đến 14 cặp bazơ, 9 cặp bazơ, 10 cặp bazơ, 11 cặp bazơ hoặc 12 cặp bazơ.

Theo một phương án, vòng thân tác động nằm ở vị trí 3' của aptame sao cho nhánh thân chung theo cách khác chứa toàn bộ hoặc một phần của nhánh thân aptame 3' và toàn bộ hoặc một phần của nhánh 5' của thân tác động. Theo một phương án, vòng thân tác động nằm ở vị trí 5' của aptame này sao cho nhánh thân chung theo cách khác chứa toàn bộ hoặc một phần của nhánh thân aptame 5' và toàn bộ hoặc một phần của nhánh 3' của thân tác động. Theo một phương án, tín hiệu polyadenyl hóa là AATAAA hoặc ATTAAA. Theo một phương án, tín hiệu polyadenyl hóa là yếu tố sau (DSE). Theo một phương án, tín hiệu polyadenyl hóa là yếu tố trình tự trước (USE).

Theo một phương án, catxet polynucleotit chứa hai công tắc ribo theo sáng chế, trong đó vòng thân tác động của công tắc ribo thứ nhất chứa toàn bộ hoặc một phần của tín hiệu polyadenyl hóa AATAAA hoặc ATTAA và vòng thân tác động của công tắc ribo thứ hai chứa toàn bộ hoặc một phần của yếu tố sau (DSE). Theo một phương án, mỗi công tắc ribo trong số hai công tắc ribo bao gồm aptame mà liên kết với cùng một phối tử. Theo một phương án, hai công tắc ribo này bao gồm các aptame khác nhau mà liên kết các phối tử khác nhau.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều hòa sự biểu hiện của gen đích chứa

- (a) cài xen một hoặc nhiều catxet polynucleotit theo sáng chế vào vùng 3' chưa được dịch mã 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 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, hai công tắc ribo được cài xen vào vùng 3' chưa được dịch mã ("UTR") của gen đích, trong đó vòng thân tác động của công tắc ribo thứ nhất chứa toàn bộ hoặc một phần của tín hiệu polyadenyl hóa AATAAA hoặc ATTAA và vòng thân tác động của công tắc ribo thứ hai chứa toàn bộ hoặc một phần của yếu tố sau (DSE). Theo một phương án, mỗi công tắc ribo trong số hai công tắc ribo bao gồm aptame mà liên kết với cùng một phối tử. Theo một phương án, hai công tắc ribo này bao gồm các aptame khác nhau mà liên kết các phối tử khác nhau. Theo một phương án, hai hoặc nhiều catxet polynucleotit bao gồm cùng một aptame.

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

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vật truyền chứa gen đích mà chứa catxet polynucleotit được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một phương án, vật truyền là vật truyền virus. Theo một phương án, vật truyền virus được chọn từ nhóm bao gồm vật truyền adenovirus, vật truyền virus kết hợp adeno, và vật truyền lentivirus.

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/US1207/016279, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1a. Sơ đồ cho một phương án theo sáng chế trong đó nhánh thân 3' của aptame được liên kết với nhánh thân 5' của vòng thân tác động thông qua nhánh thân chung theo cách khác (tức là nhánh thân mà có thể tạo ra cấu trúc thân với thân aptame hoặc thân tác động,

nhưng không cả hai tại cùng một thời điểm), và trình tự tín hiệu polyadenyl hóa (trong trường hợp này AATAAA) được định vị ở thân của vòng thân tác động.

Hình 1b. Sơ đồ cho một phương án theo sáng chế trong đó mức độ tiếp cận được của tín hiệu polyadenyl hóa (trong trường hợp này AATAAA) được điều hòa bởi sự có mặt hoặc sự không có mặt của phối tử aptame. Aptame liên kết với vòng thân tác động (với AATAAA trình tự gắn vào thân) được cài xen vào UTR 3'. Trình tự bổ trợ của nhánh 5' của cấu trúc vòng thân, tiếp theo là trình tự aptame được liên kết với nhánh 5' của cấu trúc vòng thân. Khi không có phối tử aptame (khối trên), trình tự AATAAA bị phong bế bởi cấu trúc vòng thân tạo thành được nhờ vòng thân tác động, ức chế quá trình polyadenyl hóa và bằng cách đó chặn sự biểu hiện gen. Khi có phối tử aptame, sự liên kết aptame/phối tử tạo điều kiện thuận lợi cho việc hình thành thân aptame P1, nhờ đó phá vỡ cấu trúc vòng thân tác động và dẫn đến việc giải phóng AATAAA khỏi bị càng hóa. Trình tự mà có chung ở thân của cấu trúc vòng thân và thân aptame P1 được biểu hiện là đường nét đậm.

Hình 1c và Hình 1d. Điều hòa sự biểu hiện luxiferaza thông qua điều biến sự tiếp cận AATAAA gián tiếp thông qua aptame. Các tế bào HEK 293 được chuyển nhiễm với các cấu trúc đã được chỉ định và được xử lý bằng DMSO (hình 1c) hoặc NaOH (hình 1d) làm dung môi đối chứng hoặc 500 μ M guanosin (hình 1c) hoặc guanin (hình 1d). Hoạt tính của luxiferaza được thể hiện ở dạng trung bình $\pm$ dao động chuẩn (S.D.) ($n=3$), và mức độ cảm ứng xoắn cuộn được thể hiện ở dạng thương số của hoạt tính của luxiferaza thu được khi có guanosin hoặc guanin chia cho trị số thu được khi không có guanosin hoặc guanin.

Hình 1e. Điều hòa sự biểu hiện EGFP thông qua việc điều biến khả năng tiếp cận của AATAAA gián tiếp nhờ aptame. Các tế bào HEK 293 được chuyển nhiễm với các cấu trúc đã được chỉ định và được xử lý bằng NaOH làm dung môi đối chứng hoặc 500 μ M guanin. Cường độ huỳnh quang của GFP được thể hiện ở dạng trung bình $\pm$ S.D. ($n=3$), và mức độ cảm ứng xoắn cuộn được thể hiện ở dạng thương số của cường độ huỳnh quang thu được khi có guanin chia cho trị số thu được khi không có guanin.

Hình 2a. Sơ đồ điều hòa mức độ tiếp cận được của DSE ở vòng thân bằng cách liên kết aptame/phối tử. Cấu trúc tạo nên vòng thân với trình tự DSE gắn vào thân được cài xen vào UTR 3'. Trình tự aptame được liên kết với nhánh 3' của cấu trúc tạo nên vòng thân, tiếp theo là trình tự bổ trợ của nhánh 3' của cấu trúc vòng thân. Khi không có phối tử aptame (khối trên), trình tự DSE bị phong bế bằng cách tạo ra cấu trúc vòng thân, nhờ đó ức chế quá trình polyadenyl hóa và chặn sự biểu hiện của gen đích. Khi có phối tử aptame (khối dưới), sự liên

kết aptame/phối tử tạo điều kiện thuận lợi cho sự hình thành của thân aptame P1, nhờ đó phá vỡ cấu trúc vòng thân và dẫn đến việc giải phóng trình tự DSE khỏi bị càng hóa. Trình tự mà có chung ở thân của cấu trúc vòng thân tác động và thân aptame P1 được biểu hiện bằng đường nét đậm.

Hình 2b và Hình 2c. Điều hòa sự biểu hiện luxiferaza thông qua việc điều biến khả năng tiếp cận DSE gián tiếp nhờ aptame. Các tế bào HEK 293 được chuyển nhiễm với các cấu trúc đã được chỉ định và được xử lý bằng DMSO (hình 2b) hoặc NaOH (hình 2c) làm dung môi đối chứng hoặc 500 μ M guanosin (hình 2b) hoặc guanin (hình 2c). Hoạt tính của luxiferaza được thể hiện là trung bình $\pm$ dao động chuẩn (S.D.) (n=3), và mức độ cảm ứng xoắn cuộn được thể hiện ở dạng thương số của hoạt tính của luxiferaza thu được khi có guanosin hoặc guanin chia cho trị số thu được khi không có guanosin hoặc guanin.

Hình 3. Điều hòa sự biểu hiện luxiferaza thông qua việc điều biến khả năng tiếp cận đến trình tự polyA tổng hợp gián tiếp nhờ aptame.

Hình 4. Trình tự của vòng trong cấu trúc vòng thân tác động đến hoạt tính của công tắc ribo dựa trên polyA. Stbl_ATA_Gua_1 có vòng TTCG ổn định hơn, ATA_Gua_1 có vòng GAAA và gaat_ATA_Gua_1 có vòng GAAT.

Hình 5a. Sơ đồ điều hòa mức độ tiếp cận được của cả hai trình tự AATAAA và DSE đồng thời thông qua aptame. Mỗi cấu trúc vòng thân trong số hai cấu trúc vòng thân này có gắn trình tự AATAAA hoặc DSE được cài xen vào vào UTR 3' của gen đích, và các aptame được liên kết với từng cấu trúc vòng thân như đã được bộc lộ cho Hình 1b và Hình 2a. Aptame 1 và aptame 2 biểu thị cùng một aptame hoặc các aptame khác nhau mà liên kết với cùng một phối tử hoặc các phối tử khác nhau. Khi không có phối tử aptame (khối trên), cả AATAAA và DSE được càng hóa trong cấu trúc vòng thân, do đó sự biểu hiện gen bị chặn. Khi có phối tử aptame (mảng dưới), khi cả hai aptame liên kết với phối tử của chúng, thì cả hai trình tự AATAAA và DSE được giải phóng khỏi cấu trúc vòng thân, cho phép gen đích được biểu hiện.

Hình 5b. Các tế bào HEK 293 được chuyển nhiễm với các cấu trúc đã được chỉ định và được xử lý bằng NaOH làm dung môi đối chứng hoặc 500 μ M guanin. Hoạt tính của luxiferaza được thể hiện ở dạng trung bình $\pm$ S.D. (n=3), và mức độ cảm ứng xoắn cuộn 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. Việc càng hóa đồng thời cả hai yếu tố trình tự AATAAA và

DSE ở trình tự polyA làm giảm tiếp mức độ biểu hiện cơ bản của luxiferaza ở cấu trúc ATA_DSE_Gua.

Hình 6a. Sơ đồ của cấu trúc công tắc kép, trong đó công tắc ribo ATA_Gua ở 3'UTR và công tắc ribo G15 được cài xen vào trình tự mã hóa luxiferaza.

Hình 6b. Hoạt tính của luxiferaza từ các tế bào HEK 293 được chuyển nhiễm với các cấu trúc đã được chỉ định và được xử lý bằng hoặc không bằng 500uM guanin. Cấu trúc với hai công tắc pFLuc-G15_ATA_Gua tạo ra mức cảm ứng gấp cuộn cao hơn so với cấu trúc với một công tắc ribo.

Hình 7. Điều hòa sự biểu hiện luxiferaza thông qua adenin aptame-mediated điều biến khả năng tiếp cận của AATAAA gián tiếp thông qua adenin aptame. Các tế bào HEK 293 được chuyển nhiễm với các cấu trúc đã được chỉ định và được xử lý bằng NaOH làm dung môi đối chứng hoặc 1mM adenin. Hoạt tính của luxiferaza được thể hiện ở dạng trung bình $\pm$ S.D. (n=3), và mức độ cảm ứng xoắn cuộn được thể hiện ở dạng thương số của hoạt tính của luxiferaza thu được khi có adenin chia cho trị số thu được khi không có adenin.

Hình 8. 3' UTR của các cấu trúc được sử dụng ở các Ví dụ. Trình tự mã hóa cho gen luxiferaza là ở các chữ in hoa; AATAAA và DSE được nhấn mạnh bằng màu xám; trình tự aptame được gạch chân; trình tự của vòng thân được gạch chân bằng đường sóng; và trình tự thân aptame P1 được thể hiện bằng chữ in nghiêng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Đơn đăng ký sáng chế này yêu cầu hưởng quyền ưu tiên của đơn tạm thời Mỹ số 62/461,689, nộp ngày 21 tháng 2 năm 2017, mà được kết hợp hoàn toàn vào đây. Đơn này viện dẫn đến Danh mục Trình tự liệt kê các SEQ ID NO 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 protein có vai trò thực tế và, trong một vài trường hợp, vai trò quan trọng đối với ứng dụng điều trị an toàn và hữu hiệu. Sáng chế đề xuất các cấu trúc polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện gen bằng cách cải biến quá trình polyadenyl hóa dựa trên aptame bằng cách càng hóa một hoặc nhiều tín hiệu polyadenyl hóa

ở cấu trúc vòng thân (vòng thân tác động) mà được liên kết với aptame và các phương pháp sử dụng các cấu trúc để điều hòa sự biểu hiện gen đáp lại sự có mặt hoặc sự không có mặt của phối tử mà liên kết aptame này.

Cấu trúc polynucleotit chứa ít nhất là một công tắc ribo mà chứa vòng thân tác động và aptame khi vòng thân tác động chứa trình tự tín hiệu polyadenyl hóa. Aptame và vòng thân tác động được liên kết bởi nhánh thân chung mà theo cách khác có thể tạo nên thân với thân aptame hoặc thân tác động tùy theo sự có mặt của phối tử aptame. Khi phối tử aptame có mặt và được liên kết với aptame, thì thân aptame (thân aptame P1) được ổn định và tạo nên thân với nhánh thân chung theo cách khác. Do đó, khi có phối tử, cấu trúc vòng thân tạo thành bởi vòng-bước tác động không được ưa chuộng và tín hiệu polyadenyl hóa dễ tiếp cận, cho phép xảy ra quá trình polyadenyl hóa dẫn đến sự biểu hiện nâng cao gen đích. Khi không có phối tử, vòng thân tác động tạo nên cấu trúc thân với nhánh thân chung theo cách khác, nhờ đó cản trở hóa trình tự tín hiệu polyadenyl hóa, ngăn cản quá trình polyadenyl hóa và làm giảm sự biểu hiện của gen đích.

Theo một phương án, vòng thân tác động nằm ở vị trí 3' của aptame này sao cho nhánh thân chung theo cách khác chứa toàn bộ hoặc một phần của the nhánh thân aptame 3' và toàn bộ hoặc một phần của nhánh 5' của vòng thân tác động (ví dụ, xem các hình 1a và 1b). Theo một phương án, vòng thân tác động nằm ở vị trí 5' của aptame này sao cho nhánh thân chung theo cách khác chứa toàn bộ hoặc một phần của nhánh thân aptame 5' và toàn bộ hoặc một phần của nhánh 3' của vòng thân tác động (ví dụ, xem hình 3).

Thuật ngữ catxet polynucleotit điều hòa gen được dùng để chỉ cấu trúc ADN tái tổ hợp mà khi được kết hợp vào ADN của gen đích ở 3' UTR, đem lại khả năng điều hòa sự biểu hiện của gen đích bằng cách điều hòa quá trình polyadenyl hóa gián tiếp nhờ aptame/phối tử. Thuật ngữ cấu trúc hoặc catxet polynucleotit được dùng trong bản mô tả này 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 tương tự).

Công tắc ribo

Catxet polynucleotit chứa 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 ADN mã hóa công tắc ribo). Trong phạm vi của sáng chế, công tắc ribo chứa vùng cảm giác (ví dụ, aptame) và vòng-bước 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 mức độ tiếp cận được của trình tự polyadenyl hóa

nằm ở vòng thân tác động. 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 liên quan đến công tắc ribo để chỉ công tắc ribo mà không có trong tự nhiên.

Vòng thân tác động

Vòng thân tác động của công tắc ribo chứa trình tự ARN (hoặc ADN mà mã hóa trình tự ARN) mà, khi không có liên kết phối tử vùng cảm giác (ví dụ, aptame), tạo nên cấu trúc thân (tức là vùng sợi đôi) mà làm giảm mức độ tiếp cận được của trình tự tín hiệu polyadenyl hóa. Theo một phương án, vòng thân tác động chứa trình tự tín hiệu polyadenyl hóa và trình tự hỗ trợ cho trình tự tín hiệu polyadenyl hóa. Theo một số phương án, phần thân của vòng thân tác động chỉ chứa một phần của trình tự tín hiệu polyadenyl hóa. Theo một số phương án, toàn bộ hoặc một phần của trình tự tín hiệu polyadenyl hóa nằm ở phần vòng của vòng thân tác động.

Trình tự tín hiệu polyadenyl hóa có thể là trình tự bất kỳ ở 3' UTR của gen đích mà tham gia vào việc polyadenyl hóa hữu hiệu ARN thông tin được phiên mã từ gen đích bao gồm AATAAA (hoặc các trình tự liên quan), yếu tố trình tự sau (DSE) (ví dụ, trình tự giàu T hoặc GT), hoặc yếu tố trình tự trước (USE). Theo một số phương án, trình tự tín hiệu polyadenyl hóa là trình tự nội sinh từ 3' UTR của gen đích. Theo các phương án khác, trình tự tín hiệu polyadenyl hóa là trình tự ngoại sinh (ví dụ, trình tự từ một gen khác hoặc sinh vật khác) hoặc trình tự tín hiệu polyadenyl hóa tổng hợp.

Một trong số các nhánh thân của vòng thân tác động được liên kết với aptame thông qua thân của aptame này (ví dụ, xem các hình 1a, 1b, và 2a). Khi aptame không được liên kết với phối tử của nó, vòng thân tác động ở bối cảnh mà ức chế sự tiếp cận đến trình tự tín hiệu polyadenyl hóa, ức chế quá trình polyadenyl hóa và dẫn đến sự thoái biến của thông báo. Khi aptame này liên kết với phối tử của nó, vòng thân tác động có cấu hình mà không ức chế sự tiếp cận đến trình tự tín hiệu polyadenyl hóa, cho phép polyadenyl hóa thông báo và làm tăng mức độ biểu hiện của gen đích.

Phần thân của vòng thân tác động nên có đủ chiều dài (và hàm lượng GC) để thúc đẩy sự hình thành của to promote cấu trúc vòng thân và bằng cách đó ức chế sự tiếp cận đến trình tự tín hiệu polyadenyl hóa KHI aptame phối tử không có mặt với lượng đủ. Theo các phương án của sáng chế, phần thân của vòng thân tác động chứa trình tự thân ngoài trình tự tín hiệu polyadenyl hóa và trình tự hỗ trợ của nó. Chiều dài và trình tự của phần thân 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. Ví dụ, nếu thân là quá dài thì nó có thể che giấu sự tiếp cận đến trình tự tín hiệu polyadenyl hóa khi có hoặc không có phối tử. Nếu thân là quá ngắn, nó có thể tạo nên cấu trúc vòng thân ổn định có khả năng cản trở hóa trình tự tín hiệu polyadenyl hóa, trong trường hợp đó quá trình polyadenyl hóa thông báo (dẫn đến sự biểu hiện của gen đích) sẽ xảy ra khi có hoặc không có phối tử. Theo một phương án, tổng chiều dài của thân tác động (tức là phần tạo nên thân của vòng thân tác động) là 4 đến 24 cặp bazơ, 5 đến 20 cặp bazơ, 9 đến 14 cặp bazơ, 9 cặp bazơ, 10 cặp bazơ, 11 cặp bazơ hoặc 12 cặp bazơ. Ngoài chiều dài của thân, hàm lượng cặp bazơ GC của thân cũng có thể được thay đổi để cải thiện tính ổn định của thân. Theo một số phương án, thân vùng tác động chứa một hoặc nhiều các nucleotit không khớp mà không ghép cặp bazơ với phần bổ trợ của thân vùng tác động.

Nhánh thân chung theo cách khác

Vòng thân tác động và aptame được liên kết thông qua nhánh thân chung theo cách khác mà chứa trình tự mà là bổ trợ cho cả nhánh không chung của vòng thân tác động và nhánh không chung của thân aptame này. Do trình tự mà là bổ trợ cho cả thân aptame và thân tác động trên nhánh không chung, nhánh thân chung có thể theo cách khác tạo nên một thân với thân aptame hoặc thân tác động (nhưng đồng thời cả hai) tùy theo sự có mặt của phối tử aptame. Theo các phương án, phần nhánh thân chung theo cách khác mà là bổ trợ cho trình tự ở thân aptame và cho trình tự ở vòng thân tác động (tức là trình tự chung theo cách khác) là 4 đến 8 nucleotit, 5 đến 7 nucleotit, 5 nucleotit, hoặc 6 nucleotit. Theo một số phương án, nhánh thân chung theo cách khác chứa trình tự bổ sung mà là bổ trợ cho chỉ một trong số thân tác động không chung hoặc thân aptame. Theo một số phương án, ngoài trình tự chung theo cách khác, nhánh thân chung theo cách khác chứa (a) trình tự mà là bổ trợ cho nhánh thân tác động không chung, nhưng không bổ trợ cho nhánh thân aptame không chung; (b) trình tự mà là bổ trợ cho nhánh thân aptame không chung, nhưng không bổ trợ cho nhánh thân tác động không chung; hoặc (c) cả hai.

Aptame/Phối tử

Theo một phương án, vùng cảm giác chứa aptame. Thuật ngữ “aptame” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ polynucleotit của ARN mà liên kết một cách đặc hiệu với phối tử. Aptame được liên kết với vòng thân tác động thông qua thân aptame. Thân aptame có thể, hoặc không thể, bao gồm trình tự mà thường là một phần của aptame (ví dụ, trình tự thân aptame thông thường). Như vậy, việc viện dẫn đến thân aptame không ám chỉ rằng thân

aptame chứa trình tự cụ thể nào. Do đó, thân aptame có thể bao gồm trình tự từ aptame và/hoặc trình tự bổ sung có khả năng tạo nên thân khi liên kết với phối tử/aptame.

Vì với thân của vòng thân tác động nêu trên, vòng thân aptame nên là đủ dài (và hàm lượng GC) sao cho aptame này tạo nên thân aptame khi có phối tử aptame và vòng thân tác động tạo nên thân khi phối tử không có mặt. Chiều dài và trình tự của thân aptame này 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. Theo các phương án, thân aptame là 6 đến 12 cặp bazơ, 7 đến 10 cặp bazơ, 8 cặp bazơ, hoặc 9 cặp bazơ.

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 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 với hai 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, moricizine hydroclorua, N6-metyladenosin, nadide, 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 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 thông thường có nồng độ cao hơn ở các tế bào ung thư hoặc ở 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-dioxygenaza (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 tăng do

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 đối với phối tử của nó so với hằng số phân ly của aptame này đối với các phân tử không liên kết. Do đó, phối tử là phân tử mà liên kết với aptame với ái lực cao hơn so với ái lực liên kết với nguyên liệu không liên kết. Nói chung, K_d cho aptame đối với phối tử của nó sẽ thấp hơn ít nhất là khoảng 10 lần K_d cho aptame với các phân tử không liên kết. 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 dạng 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, theophyllin, dopamin, sulforodamin B, xelobioza, kanamycin A, lividomycin, tobramycin, neomycin B, viomycin, chloramphenicol, streptomycin, các xytokin, các phân tử bề mặt của tế bào, và các chất chuyển hóa. Xem tổng quan về các aptame mà nhận diện các phân tử nhỏ, ví dụ: Famulok, *Science* 9:324-9 (1999) và McKeague, M. & DeRosa, M.C. *J. Nuc. Aci.* 2012 (cả hai đều được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Theo một phương án khác, aptame là polynucleotit hỗ trợ.

Các phương pháp để 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 sử 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 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 việc liên kết phối tử khi có nồng độ muối, nhiệt độ, và các điều kiện khác mà bất 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 được rửa đi. Các oligonucleotit mà liên kết với phối tử tiếp đó 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). Quá 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 của aptame 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.

Việc sàng lọc aptame *in vivo* có thể được áp dụng sau một hoặc nhiều vòng chọn lọc *in vitro* (ví dụ, SELEX). Ví dụ, Konig, J. và các đồng tác giả (RNA. 2007, 13(4):614–622, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) mô tả việc kết hợp SELEX và hệ nấm 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 đích, mô hoặc sinh vật với ARN thông tin mà đã được polyadenyl hóa. Thuật ngữ “gen đích” được dùng để chỉ polynucleotit mà được đưa vào 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 nằm ở 3' UTR của gen đích. Ví dụ về gen đích là polynucleotit mã hóa polypeptit điều trị bệnh. 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. Gen đích có thể, ví dụ, 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), phiên mã các nucleaza tác động kiểu chất hoạt hóa (TALEN), insulin của người, protein 9 kết hợp CRISPR (cas9), hoặc globulin miễn dịch (hoặc một phần của nó), kể cả, ví dụ, kháng thể có tác dụng điều trị bệnh.

Các cấu trúc biểu hiện

Sáng chế dự tính việc sử dụng vật truyền tái tổ hợp để đưa polynucleotit mã hóa gen đích vào các tế bào 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 theo sáng chế bao gồm các yếu tố ADN bổ sung bao gồm các phân đoạn ADN mà gây ra sự sao chép ADN ở tế bào chủ và sự biểu hiện của gen đích ở tế bào đó ở mức độ thích hợp. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu được rằng các trình tự kiểm soát biểu hiện (các gen khởi đầu, gen tăng cường, và tương tự) được chọn dựa trên khả năng của chúng trong việc thúc đẩy sự biểu hiện của gen đích ở tế bào đích. “Vật truyền” 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, *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, vật truyền tái tổ hợp là vật truyền virus hoặc tổ hợp gồm nhiều vật truyền virus.

Các vật truyền 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 vật truyền adenovirus (AV), các vật truyền virus kết hợp adeno (AAV), vật truyền retrovirus và vật truyền lentivirus, và các vật truyền Herpes simplex typ 1 (HSV1).

Các vật truyền adenovirus bao gồm, ví dụ, các vật truyền 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 vật truyền tái tổ hợp E1/E3-xóa bỏ AV. Các vật truyền adenovirus còn bao gồm các vật truyền adenovirus có khả năng cao phụ thuộc vào gen trợ giúp (còn được gọi là các vật truyền có khả năng cao, “không ruột” hoặc “có ruột”), mà không chứa các trình tự mã hóa virus. Các vật truyền này, chứa các yếu tố hoạt động cis cần thiết cho việc sao chép và bao gói ADN của virus, 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 vật truyền AV phụ thuộc gen trợ giúp này có tiềm năng mang từ vài trăm cặp bazơ đến khoảng 36kb ADN lạ.

Các vật truyền virus kết hợp adeno tái tổ hợp “rAAV” bao gồm vật truyền bất kỳ thu được từ typ huyết thanh bất kỳ của virus 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 vật truyền 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 vẫn thực hiện việc giải cứu, sao chép và bao gói mang tính chức năng.

Theo cách khác, các hệ khác như các vật truyền lentivirus có thể được dùng trong các phương án của sáng chế. các hệ trên cơ sở lentivirus 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 vật truyền lentivirus thu được từ virus gây suy giảm miễn dịch ở người và, giống như virus đó, hợp nhất vào hệ gen của vật chủ đem lại tiềm năng cho sự 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 vận chuyển không là virus bằng cách sử dụng, ví dụ, lipid cation, các polyme, hoặc cả hai, làm chất mang. Các hệ polyme poly-L-lysine (PLL) và polyme polyetylenimin (PEI) đã tiếp hợp cũng có thể được sử dụng để phân phối vật truyền này đến các tế bào. Các phương pháp khác để phân phối vật truyền đến các tế bào bao gồm kỹ thuật nạp thủy động lực và đục lỗ bằng xung điện và sử dụng siêu âm, cả hai đều cho giống cấy tế bào và cho 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 một hoặc nhiều catxet điều hòa gen polynucleotit theo sáng chế vào 3' UTR của gen đích; (b) đưa gen đích chứa catxet điều hòa gen này vào tế bào; và (c) cho tế bào tiếp cận với phối tử mà liên kết 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 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, kể cả, ví dụ, mô mỡ, hệ thần kinh trung ương (CNS), cơ, tim, mắt, gan, và các mô tương tự.

Theo một phương án, một hoặc nhiều catxet điều hòa gen được cài xen vào vùng 3' chưa được dịch mã của gen đích. Theo một phương án, một catxet điều hòa gen được cài xen vào 3' UTR của gen đích. Theo một phương án, hai công tắc ribo được cài xen vào vùng 3' chưa được dịch mã của gen đích, trong đó vòng thân tác động của công tắc ribo thứ nhất chứa toàn bộ hoặc một phần của tín hiệu polyadenyl hóa AATAAA (hoặc ATTAA) và vòng thân tác động của công tắc ribo thứ hai chứa toàn bộ hoặc một phần của yếu tố sau (DSE).

Theo một phương án, khi nhiều catxet điều hòa gen được cài xen vào gen đích, thì từng catxet có thể chứa cùng một aptame sao cho một phối tử có thể được dùng để điều biến sự biểu hiện của gen đích. Theo các phương án khác, khi nhiều catxet điều hòa gen được cài xen vào gen đích, mỗi catxet có thể chứa một aptame khác sao cho tiếp xúc với nhiều phối tử phân tử nhỏ khác nhau điều biến sự biểu hiện của gen đích.

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 tổ 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.

Các phương pháp điều trị bệnh 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 một 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 vật truyền. 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 vật truyền này. Sự phân phối của cấu trúc vật truyền chứa gen đích và catxet polynucleotit, và sự chuyển nhiễm của các mô đích gây ra sự chuyển nhiễm ổn định gen đích đã được điều hòa, thường là các bước đầu tiên trong quá trình tạo ra protein có tác dụng điều trị bệnh.

Tuy nhiên, do sự có mặt của catxet điều hòa ở trình tự gen đích, gen đích không được biểu hiện ở mức độ đáng kể (hoặc được biểu hiện ở mức độ thấp hơn), 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. Khi phối tử đặc hiệu với aptame được dùng (hoặc nói cách khác có mặt với lượng đủ) thì sự biểu hiện của gen đích mới được hoạt hóa hoặc tăng.

Sự phân phối cấu trúc vật truyền chứa gen đích với catxet polynucleotit và sự phân phối phối tử hoạt hóa thường được tách theo thời gian. Sự phân phối phối tử hoạt hóa sẽ kiểm soát khi nào gen đích được biểu hiện, cũng như nồng độ của 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 đường khu trú.

Việc điều chỉnh thời gian phân phối phối tử sẽ phụ thuộc vào yêu cầu về hoạt hóa của gen đích. Ví dụ, nếu protein có tác dụng điều trị bệnh được mã hóa bởi gen đích được yêu cầu liên tục, thì phối tử phân tử nhỏ qua đường miệng có thể được phân phối hàng ngày, hoặc

nhiều lần một ngày, để đảm bảo hoạt hóa liên tục gen đích, và do đó biểu hiện liên tục protein có tác dụng điều trị bệnh. Nếu gen đích có tác dụng hoạt động kéo dài, thì phôi tử cảm ứng có thể được cấp liều lượng kém thường xuyên hơn.

Sáng chế cho phép sự biểu hiện 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 ở công tắc ribo của catxet điều hòa polynucleotit. Hiện tượng tang mức biểu hiện gen chuyển có tính chất chữa trị bệnh chỉ sau 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 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 ở catxet mà sẽ được hoạt hóa bởi phân 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 cho aptame chứa trong catxet điều hòa trú ở từng gen đích.

Sáng chế cho phép protein có tác dụng điều trị bệnh bất kỳ mà gen của nó có thể được phân phối đến cơ thể (như erythropoietin (EPO) hoặc kháng thể có tác dụng điều trị bệnh) để được sản sinh 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 protein có tác dụng điều trị bệnh đó ngoài cơ thể mà sau đó được tiêm hoặc được truyền, ví dụ, các kháng thể được dùng trong ung thư hoặc để phòng bé bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn dịch. Cơ thể chứa gen đích đã được điều hòa trở thành nhà máy sản xuất sinh học, mà được bật khi phôi tử đặc hiệu với gen được dùng.

Mức độ liều lượng và việc điều chỉnh 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, trong quá trình phân phối AVASTIN (kháng thể kháng VEGF) đối với ung thư. Sáng chế nâng cao mức độ dễ dàng cấp liều lượng khi theo dõi nồng độ và tác dụng của protein có tác dụng 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 là chỉ cần thiết cho một khoảng thời gian ngắn mà là đủ để sửa chữa gen nội sinh đích. Tuy nhiên, nếu

gen nucleaza chưa điều hòa được phân phối đến cơ thể, thì protein này có thể có mặt trong suốt khoảng thời gian còn lại của tế bào. Trong trường hợp các nucleaza, có nguy cơ gia tăng sửa chữa đích lạ khi có nucleaza dài hơn. Việc điều hòa sự biểu hiện của các protein này có ưu điểm an toàn đáng kể. Trong trường hợp này, vật truyền chứa gen đích nucleaza chứa catxet điều hòa có thể được phân phối đến các tế bào thích hợp ở cơ thể. Gen đích ở trạng thái “tắt” khi không có phối tử đặc hiệu với catxet, nên không nucleaza nào được tạo ra. 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. Do đó, tiếp theo gen nucleaza ở trạng thái “tắt” và nucleaza không được sản sinh thêm và quá trình sửa chữa dừng lại. Phương thức này có thể được áp dụng để chỉnh sửa các tình trạng di truyền, bao gồm nhiều bệnh võng mạc di truyền như LCA10 gây ra bởi các đột biến ở CEP290 và bệnh Stargardt gây ra bởi các đột biến ở ABCA4.

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 loại 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 thận mạn tính, 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 gây ra bởi các lỗi gen đơn 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, các globin β , γ , δ , hoặc ζ 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 hoặc bệnh ưa chảy máu B.

Các phối tử được sử dụng theo sáng chế thường được tổ 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, các tác nhân kháng khuẩn và diệt nấm, tác nhân đẳng trương và tác nhân trì hoãn sự hấp thụ, và các chất tương tự, thường được dùng trong lĩnh vực dược. Các dược phẩm có thể ở dạng viên nén, viên tròn, viên nang, viên dẹt, và dạng tương tự, và được bào chế 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 dạng 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 biểu hiện ở mức điều hòa protein có hoạt tính trị liệu được mã hóa bởi gen đích. Phương pháp này bao gồm việc dùng cho bệnh nhân dược phẩm chứa phối tử đối với aptame, khi bệnh nhân đã từng được dùng vật truyền tái tổ hợp chứa gen đích, khi gen đích chứa catxet điều hòa gen theo sáng chế mà tạo ra khả năng điều hòa sự biểu hiện của gen đích nhờ phối tử của aptame này thông qua việc tiếp cận một hoặc nhiều tín hiệu polyadenyl hóa. Việc dùng phối tử làm tăng mức độ biểu hiện của protein có tác dụng điều trị bệnh.

Vật phẩm và kit

Sáng chế còn đề xuất các kit hoặc vật phẩm để dùng trong các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo cách khía cạnh, các kit này chứa các chế phẩm theo sáng chế (ví

dụ, đối với các chế phẩm để phân phối vật truyền chứa gen đích chứa catxet điều hòa gen) trong bao gói thích hợp. Việc bao gói thích hợp cho các chế 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, 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 cũng có thể được tiệt trùng và/hoặc đậy kín.

Sáng chế còn đề xuất kit chứa các chế phẩm theo sáng chế và có thể còn bao gồm hướng dẫn về các phương pháp sử dụng chế phẩm này, như cách sử 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 khác được mong muốn dưới góc độ thương mại và góc độ của người tiêu dùng, bao gồm các dung dịch đệm khác, các chất pha loãng, các bộ lọc, kim, kim tiêm, và gói cài xen với hướng dẫn về cách thực hiện việc dùng thuốc, bao gồm phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này chẳng hạn. Ví dụ, theo một số phương án, kit chứa rAAV để biểu hiện gen đích chứa catxet điều hòa gen theo sáng chế, chất mang được dùng thích hợp để tiêm, và một hoặc nhiều trong số: dung dịch đệm, chất pha loãng, bộ lọc, kim, kim tiêm, và gói cài xen có hướng dẫn thực hiện việc 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 thẳng trình tự thông tin và sử dụng các chương trình máy tính để mua được. Hai polynucleotit hoặc hai trình tự polypeptit là “hầu như tương đồng” với nhau khi, sau khi đã được căn thẳng 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 thẳng 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 thẳng nhằm các 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 bao gồm phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR).

Thuật ngữ “polynucleotit” hoặc “axit nucleic” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ dạng polyme của các nucleotit có chiều dài bất kỳ, dù 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 dị tương đồng). Tương tự, trình tự của tế bào (ví dụ, gen hoặc phần của nó) mà được kết hợp vào vật truyền virus là trình tự nucleotit dị tương đồng xét theo vật truyền.

Được hiểu và kỳ vọng rằng các biến dị theo các nguyên lý của sáng chế 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 kỹ hơn 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. Điều hòa sự biểu hiện của gen đích bằng cách điều biến gián tiếp qua aptame khả năng tiếp cận yếu tố tín hiệu polyA là AATAAA

Quy trình thử nghiệm:

Các cấu trúc plasmit: gen EGFP ở vật truyền pEGFP-C1 (do Clontech cung cấp) được thể bằng của trình tự mã hóa gen luxiferaza của con đom đóm để tạo ra vật truyền pFLuc-SV40 mà chứa trình tự tín hiệu polyadenyl hóa sớm SV40. Một phân đoạn ADN chứa các trình tự cho aptame xpt-guanin, cấu trúc vòng thân tác động và các trình tự polyA sớm SV40 được tổng hợp (IDT). Các phân đoạn ADN tổng hợp được được tiêu bằng các enzym cắt giới

hạn HpaI và MluI và được tách dòng vào pFLuc-SV40 được tiêu bằng HpaI và MluI. các trình tự cấu trúc được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN (do Genewiz cung cấp).

Chuyển nhiễm và xử lý phôi tử aptame: $3,5 \times 10^4$ 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; 1,4 μ l) được bổ sung vào 50 μ l 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, 50 μ l chất phản ứng chuyển nhiễm đã pha loãng được bổ sung vào ADN, được trộn, và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 phút. Cuối cùng, 7 μ l dung dịch này được bổ sung vào lỗ chứa tế bào trong đĩa loại 96 lỗ. Bốn giờ sau khi chuyển nhiễm, môi trường được hút ra, và môi trường mới được bổ sung vào với (i) DMSO (0,5%) hoặc 500 μ M guanosin; hoặc (ii) NaOH (2mM) làm dung môi đối chứng hoặc 500 μ M guanin. Mức độ cảm ứng xoắn cuộn được thể hiện ở dạng thương số của hoạt tính của luxiferaza thu được khi có phôi tử aptame chia cho trị số thu được khi không có phôi tử aptame.

Thử nghiệm luxiferaza của con đom đóm đối với các tế bào đã được nuôi cấy: Hai mươi tư giờ sau khi thay đổi 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, 100 μ l, ở nhiệt độ trong phòng) được bổ sung vào, và các đĩa này cho phép để lại ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian ít nhất là 5 phút. Sau đó, dung lượng của lỗ được trộn bằng 50 μ l nghiền tán nhỏ, và mỗi mẫu 20 μ l được trộn với 20 μ l 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 ở dạng đơn vị sáng tương đối trung bình (RLU) $\pm$ S.D.

Chuyển nhiễm và đo huỳnh quang GFP: $3,5 \times 10^4$ tế bào HEK 293 được cấy vào đĩa đáy bằng loại 96 lỗ 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; 1,4 μ l) được bổ sung vào 50 μ l môi trường opti-mem I (do Life Technologies cung cấp), và được để yên trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, 50 μ l chất phản ứng chuyển nhiễm đã pha loãng được bổ sung vào ADN, được trộn, và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 phút. Cuối cùng, 7 μ l dung dịch này được bổ sung vào lỗ chứa tế bào trong đĩa loại 96 lỗ. Cường độ huỳnh quang của GFP được đo bằng đầu đọc đĩa Tecan,

bằng cách sử dụng bước sóng kích thích 484nm, bước sóng phát xạ 510nm và chiều rộng dải kích thích 5nm. Cường độ huỳnh quang của GFP được thể hiện ở dạng trị số được tạo ra bởi các cấu trúc GFP bị trừ đi trị số được tạo ra bởi các tế bào không chuyển nhiễm.

Kết quả:

Đuôi đã được polyadenyl hóa ở đầu 3' của ARN thông tin có vai trò quan trọng ở tính ổn định của ARN thông tin, xuất nhân và hiệu quả dịch nghĩa. Để điều hòa quy trình polyadenyl hóa tiền-ARN thông tin và bằng cách đó điều hòa sự biểu hiện của gen đích, các chiến lược mà điều biến sự tiếp cận được các yếu tố trình tự polyadenyl hóa AATAAA (hoặc các biến thể gần của nó) hoặc yếu tố trình tự sau (DSE) giàu T hoặc GT được phát triển.

Theo một chiến lược (chiến lược 1), như được minh họa trên các hình 1a và 1b, cấu trúc vòng thân (vòng thân tác động), trong đó yếu tố trình tự tín hiệu polyadenyl hóa AATAAA được gắn vào thân của cấu trúc tạo nên vòng thân (vòng thân tác động). Đầu tận cùng 3' của aptame được liên kết với đầu tận cùng 5' của cấu trúc tạo vòng thân này, bởi nhánh thân chung mà chứa trình tự hỗ trợ cho một phần của nhánh thân aptame 5' và hỗ trợ cho một phần của nhánh thân 3' của vòng thân tác động (ví dụ, xem các hình 1a và 1b). Ở cấu hình này, khi không có phối tử aptame, cấu trúc vòng thân càng hóa yếu tố AATAAA, nhờ đó chặn quá trình polyadenyl hóa và sự biểu hiện gen. Tuy nhiên, khi có phối tử aptame, việc liên kết aptame/phối tử binding khiến hình thành thân aptame P1, nhờ đó phá vỡ cấu trúc vòng thân, mà dẫn đến mức độ giải phóng yếu tố AATAAA khỏi bị càng hóa và sự biểu hiện gen tiếp theo. Do đó, cấu hình này của các yếu tố di truyền tạo nên công tắc ribo bật đáp ứng phối tử aptame.

Chiến lược này được thử nghiệm bằng cách sử dụng aptame xpt-guanin với trình tự polyA sớm SV40, trong đó trình tự trước của yếu tố AATAAA ở 3' UTR của SV40 được thể hiện là không thể thiếu được đối với quá trình polyadenyl hóa. Bằng cách áp dụng chiến lược này, 4 cấu trúc, ATA_Gua_1 đến 4 (SEQ ID NO: 1 đến 4), được tạo ra mỗi cấu trúc có cùng một trình tự aptame xpt-guanin được liên kết với đầu tận cùng 5' của cấu trúc vòng thân và yếu tố trình tự AATAAA được gắn vào thân của cấu trúc vòng thân. các tác giả sáng chế giải thích rằng chiều dài và thành phần trình tự đối với thân của cấu trúc vòng thân có thể tác động đến tính ổn định của cấu trúc vòng thân, do đó mức độ phổ biến của yếu tố AATAAA đã bị càng hóa để biểu hiện gen. Do đó, các thân lần lượt gồm 9, 10, 12 và 14 cặp bazơ (bp) ở từng cấu trúc được tạo ra. Thân aptame P1 là 8bp. Như được thể hiện trên hình 1c, khi không có phối tử aptame guanosin, hoạt tính của luxiferaza là gần như tương tự từ tất cả các cấu trúc,

và thấp hơn cấu trúc đối chứng pFLuc-SV40 (dữ liệu không được thể hiện), biểu thị yếu tố AATAAA bị càng hóa bởi cấu trúc vòng thân. Sau khi xử lý bằng guanosin, từng cấu trúc thể hiện hoạt tính của luxiferaza cao hơn so với các mẫu đã được xử lý bằng DMSO (đối chứng), với ATA_Gua_1 tạo ra mức cảm ứng 6,7 lần.

Các cấu trúc này được thử nghiệm tiếp bằng cách sử dụng guanine làm phối tử aptame. Như được thể hiện trên hình 1d, khi không có xử lý bằng guanine, mức biểu hiện gốc của cấu trúc ATA_Gua_1 đến 4 bị giảm, trong đó ATA_Gua_4 có mức biểu hiện gốc thấp nhất (16% của vật truyền đối chứng pFLuc). Sau khi được xử lý bằng guanine, mức biểu hiện luxiferaza được tăng so với các mẫu không có guanine, tạo ra mức cảm ứng khoảng 2,5 lần đối với tất cả các cấu trúc.

Các cấu trúc công tắc ribo này (chiến lược 1) còn được sử dụng để điều hòa sự biểu hiện GFP. Các cấu trúc ATA_Gua_2 và 4, mà có mức biểu hiện gốc tương đối thấp hơn ở gen luxiferaza (các hình 1c, 1d), được sử dụng để tạo ra các cấu trúc pEGFP_ATA_Gua_2 và 4. Như được thể hiện trên hình 1e, khi không có xử lý bằng guanine, mức độ biểu hiện GFP bị giảm khi được so với cấu trúc pEGFP-C1. Việc xử lý bằng guanine khiến tăng mức độ biểu hiện GFP 1,5 và 1,6 lần (lần lượt đối với các cấu trúc ATA_Gua_2 và ATA_Gua_4). Tuy nhiên, cấu trúc đối chứng không có hiện tượng tăng mức độ biểu hiện GFP đáp lại xử lý bằng guanine.

Dữ liệu này cho thấy rằng công tắc ribo bật của động vật có vú đáp ứng phối tử có tác dụng điều hòa sự biểu hiện của gen đích bằng cách điều biến mức độ tiếp cận được yếu tố trình tự tín hiệu polyadenyl hóa ở cấu trúc vòng thân thông qua aptame liền kề. Mức độ cảm ứng gấp nếp có thể được cải thiện bằng cách làm giảm mức độ biểu hiện gốc và làm tăng mức độ biểu hiện gen đích cảm ứng của cấu trúc thông qua việc tối ưu hóa chiều dài và trình tự của thân aptame P1 và thân ở cấu trúc vòng thân tác động. Ở cấu hình được thử nghiệm này của các yếu tố di truyền, aptame guanine và trình tự polyA sớm SV40 được sử dụng. các chiến lược tương tự có thể được áp dụng để tạo ra các công tắc ribo bằng cách sử dụng các aptame khác nhau trong việc điều biến các trình tự polyA khác nhau kể cả các trình tự polyA tổng hợp.

Ví dụ 2. Điều biến sự biểu hiện của gen đích bằng polyadenyl hóa gián tiếp qua aptame/phối tử thông qua khả năng tiếp cận yếu tố trình tự sau.

Các quy trình thử nghiệm: như được bộc lộ trong Ví dụ 1.

Kết quả:

Chiến lược khác (chiến lược 2) được phát triển để điều biến quá trình polyadenyl hóa thông qua điều biến mức độ tiếp cận yếu tố trình tự sau giàu T hoặc GT (DSE). Theo chiến lược này, như được minh họa trên Hình 2a, cấu trúc vòng thân được tạo ra, trong đó trình tự DSE được gắn vào thân của cấu trúc vòng thân. Trình tự aptame được liên kết với đầu tận cùng 3' của cấu trúc vòng thân này, tiếp theo là trình tự bổ trợ của nhánh 3' của cấu trúc vòng thân. Ở cấu hình này, khi không có phối tử aptame, cấu trúc vòng thân càng hóa trình tự DSE, ức chế quá trình polyadenyl hóa và bằng cách đó chặn sự biểu hiện gen. Tuy nhiên, khi có phối tử aptame, việc liên kết aptame/phối tử khiến hình thành thân aptame P1, phá vỡ cấu trúc vòng thân tác động và giải phóng trình tự DSE khỏi bị càng hóa, và cho phép biểu hiện gen. Do đó, tương tự như chiến lược thể hiện ở Ví dụ 1, cấu hình này của các yếu tố di truyền tạo ra công tắc ribo bật đáp ứng phối tử aptame.

Chiến lược này được thử nghiệm bằng cách sử dụng aptame xpt-guanin với trình tự polyA sớm SV40, trong đó trình tự DSE, cùng với yếu tố AATAAA ở 3' UTR của SV40, được thể hiện là chịu trách nhiệm về việc polyadenyl hóa tiền-ARN thông tin. Bằng cách áp dụng chiến lược này, 4 cấu trúc, DSE_Gua_1 đến 4 (SEQ ID NO: 5 đến 8), được tạo ra mỗi cấu trúc có cùng một trình tự aptame xpt-guanin được liên kết với đầu tận cùng 3' của cấu trúc vòng thân trong đó trình tự DSE gắn vào thân của cấu trúc vòng thân. Các tác giả sáng chế giải thích rằng chiều dài và thành phần trình tự đối với thân của cấu trúc vòng thân có thể tác động đến tính ổn định của cấu trúc vòng thân, do đó đến mức độ sẵn có của trình tự DSE đã được càng hóa để biểu hiện gen. Do đó, các thân 9, 10, 12 và 14 cặp bazơ (bp) lần lượt được tạo ra ở từng cấu trúc trong số các cấu trúc này. Thân aptame P1 cỡ 8bp hoặc 9bp được sử dụng ở các cấu trúc này. Như được thể hiện trên hình 2b, khi không có phối tử aptame guanosin, hoạt tính của luxiferaza là gần như tương tự từ các cấu trúc DSE_Gua_1 đến 3, trong đó DSE_Gua_4 là thấp nhất, thấp hơn cấu trúc đối chứng pFLuc-SV40 (dữ liệu không được thể hiện), biểu thị rằng yếu tố DSE được càng hóa bởi cấu trúc vòng thân khi không có aptame phối tử. Trong khi đó, sau khi xử lý bằng guanosin, mỗi cấu trúc thể hiện hoạt tính luxiferaza cao hơn so với các mẫu đã được xử lý bằng DMSO, trong đó DSE_Gua_2, chẳng hạn, gây cảm ứng 3,7 lần.

Các cấu trúc này còn được thử nghiệm bằng cách sử dụng guanin làm phối tử aptame. Như được thể hiện trên hình 2c, khi không có xử lý bằng guanin, hoạt tính của luxiferaza bị giảm đến khoảng 68% đối với cấu trúc DSE_Gua_1 đến 3, và 80% đối với cấu trúc DSE_Gua_4, khi so với cấu trúc đối chứng pFLuc. Khi có guanin, mức độ biểu hiện luxiferaza được làm tăng khoảng 2,4 lần đối với tất cả các cấu trúc khi được so sánh với các

mẫu không xử lý bằng guanin. Cảm ứng gấp nếp có thể được cải thiện hơn nữa bằng cách làm giảm mức độ biểu hiện gốc và làm tăng mức độ biểu hiện gen được cảm ứng của cấu trúc thông qua việc tối ưu hóa chiều dài và trình tự của thân trong cấu trúc vòng thân, cũng như đối với thân aptame P1. Các dữ liệu này còn thể hiện sự tạo ra công tắc ribo bật của động vật có vú đáp ứng phối tử aptame mà điều hòa sự biểu hiện gen thông qua việc điều biến mức độ tiếp cận được yếu tố trình tự polyadenyl hóa thông qua aptame. Ở cấu hình được thử nghiệm này của các yếu tố di truyền, aptame guanin và trình tự polyA sớm SV40 được sử dụng. Các chiến lược tương tự có thể được áp dụng để tạo ra các công tắc ribo chứa các aptame khác nhau trong việc điều biến các trình tự polyA khác nhau, kể cả các trình tự polyA tổng hợp.

Ví dụ 3. Sử dụng guanin aptame để điều biến mức độ tiếp cận được của các yếu tố trình tự polyA tổng hợp ở 3'UTR

Quy trình thử nghiệm:

Dựng cấu trúc plasmid: các phân đoạn ADN chứa các trình tự cho polyA tổng hợp (SPA) (Levitt, N. *et al.*, *Definition of an efficient synthetic poly(A) site*, *Genes & Development*. 1989; 3:1019-1025, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), hoặc SPA từ pGLuc-Basic_2 (NEB), trong bản mô tả này được gọi là mtSPA, hoặc aptame xpt-guanin, cấu trúc vòng thân và các trình tự polyA tổng hợp, được tổng hợp (IDT). Các phân đoạn ADN tổng hợp được được tiêu bằng các enzym cắt giới hạn XhoI và NheI và được tách dòng vào cấu trúc Con8 đã được tiêu bằng XhoI và XbaI để tạo ra Con8-SPA (SEQ ID NO: 9), SPA_ATA_Gua (SEQ ID NO: 10), SPA_DSE_Gua (SEQ ID NO: 11), mtCon8-SPA (SEQ ID NO: 12) và mtSPA_ATA_Gua (SEQ ID NO: 13). Các trình tự cấu trúc được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN (do Genewiz cung cấp).

Chuyển nhiễm, xử lý phối tử aptame và thử nghiệm luxiferaza đối với các tế bào nuôi cấy: như được bộc lộ trong Ví dụ 1.

Kết quả:

Việc điều hòa sự biểu hiện của gen đích thông qua việc điều biến khả năng tiếp cận của trình tự polyA SV40 thông qua aptame được thể hiện ở Ví dụ 1 và Ví dụ 2. Quá trình polyadenyl hóa được điều biến bởi aptame, cũng được thử nghiệm bằng cách sử dụng trình tự polyA tổng hợp (SPA). Bằng cách áp dụng cùng một chiến lược như được thể hiện ở Ví dụ 1, cấu trúc SPA_ATA_Gua được tạo ra với trình tự aptame xpt-guanin được liên kết với đầu tận cùng 5' của cấu trúc vòng thân và yếu tố trình tự AATAAA của trình tự polyA tổng hợp được gắn vào thân của cấu trúc vòng thân. Cấu trúc SPA_DSE_Gua cũng được tạo ra bằng cách áp

dụng cùng cách thức đó như được thể hiện ở Ví dụ 2. Như được thể hiện trên hình 3, khi không có xử lý bằng gguanine thì việc liên kết cấu trúc vòng thân và aptame xpt-guanin không làm giảm hoạt tính của luxiferaza ở cấu trúc SPA_ATA_Gua, ám chỉ sự càng hóa không hiệu quả ở vòng thân của yếu tố trình tự AATAAA của trình tự polyA tổng hợp. Để nhằm đến vấn đề này, trình tự SPA khác (mtSPA) được sử dụng, mà có khác biệt 2nt, nhưng thể hiện tính chức năng tương tự khi được so sánh với Con8-SPA. Để củng cố thân, 2 cặp bazơ GC được bổ sung vào thân, cùng với 7nt của trình tự polyA và trình tự hỗ trợ của nó, thân 9bp được tạo ra. Với cấu trúc mtSPA_ATA_Gua này, mức biểu hiện gốc của hoạt tính của luxiferaza bị giảm khi được so sánh với mtCon8-SPA khi không có xử lý bằng guanin. Trong khi đó, khi có xử lý bằng guanin, hoạt tính của luxiferaza được điều tiết tăng nhẹ đến 1,7 lần khi được so sánh với các mẫu không xử lý bằng guanin. Với cấu trúc SPA_DSE_Gua, aptame xpt-guanin trình tự được liên kết với đầu tận cùng 3' của cấu trúc vòng thân với trình tự DSE được gắn vào thân của cấu trúc vòng thân. Như được thể hiện trên hình 3, xử lý bằng guanin được điều tiết tăng hoạt tính của luxiferaza của cấu trúc SPA_DSE_Gua đến 1,9 lần khi được so sánh với các mẫu không xử lý bằng guanin. Các kết quả này thể hiện khả năng điều hòa mức độ biểu hiện của gen đích bằng cách điều biến mức độ tiếp cận các yếu tố trình tự polyA.

Ví dụ 4. Điều biến trình tự của vòng của cấu trúc vòng thân để nâng cao khả năng điều hòa của công tắc ribo trên cơ sở polyA

Quy trình thử nghiệm: như được bộc lộ trong Ví dụ 1.

Kết quả:

Với tất cả các cấu trúc mà có aptame và các cấu trúc vòng thân được liên kết với các trình tự polyA ở các Ví dụ 1 và 2, mức biểu hiện gốc của luxiferaza bị giảm đến 20% đến 45% so với vật truyền đối chứng. Mặc dù mức độ biểu hiện của gen đích được cảm ứng tối đa đạt 80% cấu trúc đối chứng, mức độ biểu hiện gốc khiến mức độ cảm ứng gấp nếp thấp hơn. Để làm giảm mức biểu hiện gốc, các cấu trúc vòng thân có thể được tăng cường hoặc được làm ổn định để càng hóa hoặc phong bế một cách hiệu quả các yếu tố trình tự AATAAA hoặc DSE khi không có liên kết với aptame/phối tử. Để tăng cường mức độ ổn định của cấu trúc vòng thân, tác động của thành phần trình tự của vòng của cấu trúc vòng thân đến mức biểu hiện gốc của gen luxiferaza được thử. Trình tự GAAA của vòng ở ATA_Gua_1 được thay thế bằng trình tự của vòng ổn định hơn TTCG (V.P. Antao, S. Y. Lai and I. Tinoco, *A thermodynamic study of unusually stable RNA and DNA hairpins. Nucleic Acids Research.*

1991; 19(21):5901-5905), tạo ra cấu trúc Stbl_ATA_Gua_1 (SEQ ID NO: 14). Như được thể hiện trên hình 4, so với ATA_Gua_1, Stbl_ATA_Gua_1 biểu hiện hoạt tính của luxiferaza thấp hơn khi không có xử lý bằng guanin, ám chỉ mức độ càn hóa tốt hơn tín hiệu AATAAA. Trong khi đó, khi có xử lý bằng guanin, hoạt tính của luxiferaza đã được cảm ứng cho Stbl_ATA_Gua_1 là tương tự như ATA_Gua_1, do đó tạo ra số lần cảm ứng cao hơn. Trái lại, cấu trúc chứa vòng GAAT, gaat_ATA_Gua_1 (SEQ ID NO: 15), biểu hiện mức độ luxiferaza gốc cao hơn ATA_Gua_1 hoặc stbl_ATA_Gua_1, tạo ra mức độ cảm ứng thấp hơn một chút so với hai cấu trúc này. Các kết quả này cho thấy rằng có thể đạt được sự điều hòa gen đích nghiêm ngặt hơn thông qua việc cải biến cấu trúc vòng thân.

Ví dụ 5. Điều biến đồng thời mức độ tiếp cận cả AATAAA và DSE của trình tự polyA ở 3' UTR.

Quy trình thử nghiệm:

Trình tự chứa các công tắc ATA_Gua_1 và DSE_Gua_1 được tổng hợp và tách dòng vào vật truyền pFLuc đã được tiêu bằng HpaI và MluI để tạo ra cấu trúc ATA_DSE_Gua (SEQ ID NO: 16).

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

Kết quả:

Chiến lược thứ ba để điều hòa sự biểu hiện của gen đích (chiến lược 3), như được minh họa trên Hình 5a, được phát triển bằng cách kết hợp chiến lược 1 và chiến lược 2 bằng cách đó đồng thời điều biến mức độ tiếp cận cả hai trình tự AATAAA và DSE. Ở cấu trúc này, khi không có phối tử aptame, cả hai trình tự AATAAA và DSE được càn hóa bằng cấu trúc vòng thân, do đó sự biểu hiện gen bị chặn. Từng cấu trúc vòng thân được liên kết với trình tự aptame mà có thể đáp ứng với cùng một phân tử phối tử hoặc các phân tử phối tử khác nhau. Việc phong bế đồng thời cả hai trình tự polyA thiết yếu có thể làm giảm mức độ gốc của sự biểu hiện gen khi không có phối tử. Khi có phối tử aptame, sự liên kết aptame/phối tử tạo điều kiện thuận lợi cho sự hình thành của thân aptame P1, phá vỡ các cấu trúc vòng thân và giải phóng cả hai trình tự AATAAA và DSE khỏi bị càn hóa. Ở cấu trúc này, gen có thể biểu hiện một cách hiệu quả chỉ khi phối tử cho cả hai aptame này đều có mặt, có tiềm năng cho phép điều hòa nghiêm ngặt hơn sự biểu hiện của gen đích.

Thực vậy, như được thể hiện trên hình 5b, khi không có xử lý bằng guanin, việc càn hóa cả hai trình tự AATAAA và DSE thông qua các cấu trúc vòng thân (ATA_DSE_Gua) làm giảm tiếp mức độ biểu hiện luxiferaza đến 20% cấu trúc đối chứng pFLuc, trong khi ATA_Gua_1 và DSE_Gua_1 bị giảm lần lượt 45% và 35%. Khi có xử lý bằng guanin, hoạt tính của luxiferaza được khôi phục khoảng 2,1 lần ở mẫu ATA_DSE_Gua khi được so sánh với các mẫu không được xử lý, biểu thị sự điều hòa gen nghiêm ngặt hơn.

Ví dụ 6. Sử dụng kết hợp công tắc ribo trên cơ sở polyA và công tắc ribo thứ hai để nâng cao khả năng điều hòa gen đích

Quy trình thử nghiệm:

Catxet công tắc ribo G15 (xem các ví dụ 5 và 8 và SEQ ID NO: 46 của WO2016/126747, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) hoặc catxet đối chứng không có aptame được tách dòng vào pFLuc để tạo ra pFLuc-G15 hoặc pFLuc-Con1, bằng cách áp dụng chiến lược tách dòng Golden Gate. Để tạo ra cấu trúc pFLuc-G15_ATA_Gua, phân đoạn chứa aptame guanin, các trình tự của cấu trúc vòng thân và SV40 polyA được giải phóng khỏi cấu trúc ATA_Gua_1 nhờ tiêu bằng HpaI và MluI và được tách dòng vào cấu trúc pFLuc-G15 đã được tiêu bằng cùng các enzym cắt giới hạn đó.

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

Kết quả:

Các cấu trúc biểu hiện chứa các công tắc ribo ATA_Gua và DSE_Gua có mức độ biểu hiện gốc của gen đích. Việc sử dụng kết hợp các công tắc này với công tắc thứ hai nối tiếp có thể siết chặt sự biểu hiện gốc và nhờ đó nâng cao khả năng điều hòa gen.

Để thể hiện điều này, công tắc ribo G15 được kết hợp với công tắc ribo trên cơ sở polyA. Công tắc ribo G15 là dựa trên cơ sở cách ghép nối luân phiên được điều biến bởi aptame xpt-guanin và có mức biểu hiện gốc, mà làm giảm mức độ cảm ứng gấp nếp đáp lại việc xử lý bằng guanin phối tử aptame. Để làm giảm mức độ biểu hiện gốc so với cấu trúc pFLuc-G15, trình tự polyA được thay thế bằng ATA_Gua_1, tạo ra cấu trúc pFLuc-G15-ATA_Gua (hình 6a). Như được thể hiện trên hình 6b, khi không có phối tử aptame (guanin), mức biểu hiện gốc của luxiferaza của pFLuc-G15 giảm đáng kể khi được so sánh với cấu trúc đối chứng pFLuc-Con1. pFLuc-G15-ATA_Gua, cấu trúc với công tắc kép, làm giảm tiếp mức biểu hiện gốc khi được so sánh với pFLuc-G15. Khi có xử lý bằng guanin, mức độ hoạt tính của luxiferaza được cảm ứng thấp hơn một chút so với pFLuc-G15, nhưng giống như

hoạt tính của luxiferaza được cảm ứng từ cấu trúc ATA_Gua_1, tạo ra mức độ cảm ứng gấp nếp cao hơn so với cả cấu trúc ATA_Gua_1 và cấu trúc pFLuc-G15 (hình 6b).

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 cao hơn. Các aptame ở công tắc kép này có thể là các aptame giống nhau hoặc khác nhau mà liên kết với các phối tử giống nhau hoặc khác nhau như được thể hiện ở đây, hoặc các aptame đáp ứng với các phối tử khác nhau.

Ví dụ 7. Sử dụng aptame adenin để điều biến mức độ tiếp cận yếu tố trình tự polyA AATAAA ở 3'UTR

Quy trình thử nghiệm:

Dựng cấu trúc plasmid: 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), cấu trúc vòng thân và các trình tự polyA sớm SV40 được tổng hợp (IDT). Các phân đoạn ADN tổng hợp được được tiêu bằng các enzym cắt giới hạn HpaI và MluI và đã được tách dòng vào pFLuc-SV40 đã được tiêu bằng HpaI và MluI. Các trình tự cấu trúc được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN (do Genewiz cung cấp).

Chuyển nhiễm và thử nghiệm luxiferaza của 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) hoặc 1mM adenin (do Calbiochem cung cấp) được bổ sung vào. Mức độ cảm ứng xoắn cuộn 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. Theo cùng một chiến lược như được thể hiện ở Ví dụ 1, cấu trúc vòng thân (SL) (vòng TTCG ổn định) được cài xen vào, trong đó yếu tố trình tự AATAAA được gắn vào thân 9bp của cấu trúc SL. Vào đầu tận cùng 5' của cấu trúc SL này, trình tự bổ trợ của nhánh 5' của cấu trúc SL, tiếp theo là trình tự ydhl-A aptame adenin được cài xen vào ở 3' UTR, tạo ra cấu trúc ATA_Ydhl (SEQ ID NO: 17). Ở cấu trúc này, chiều dài của thân ydhl aptame P1 là 10 cặp bazơ. Như được thể hiện trên hình 7, khi không có xử lý bằng adenin, cấu trúc ATA_ydhl biểu hiện mức luxiferaza giảm, khoảng 52% cấu trúc pFLuc đối chứng,

có lẽ thông qua việc phong tỏa tiếp cận yếu tố trình tự AATAAA. Khi có adenin, mức độ biểu hiện luxiferaza được nâng cao khi được so sánh với các mẫu không được xử lý bằng adenin, đến khoảng 82% cấu trúc pFLuc đối chứng khi có xử lý bằng adenin. Việc xử lý bằng adenin làm tăng hoạt tính của luxiferaza 2,5 lần ở cấu trúc đối chứng thông qua cơ chế không liên quan đến aptame. Tuy nhiên, cấu trúc ATA_ydhl làm tăng 4,0 lần mức độ biểu hiện luxiferaza, biểu thị tác dụng đặc hiệu đối với adenin/aptame.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Catxet polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện của gen đích chứa ít nhất một công tắc ribo, trong đó công tắc ribo chứa vòng thân tác động và aptame, trong đó thân tác động chứa trình tự polyadenyl hóa, trong đó aptame và vòng thân tác động được liên kết bởi nhánh thân chung theo cách khác chứa trình tự mà hỗ trợ cho nhánh không chung của thân aptame này và cho nhánh không chung của vòng thân tác động, trong đó mức độ biểu hiện gen đích tăng khi có phối tử mà liên kết aptame, và trong đó trình tự polyadenyl hóa chứa tín hiệu polyadenyl hóa chứa AATAAA hoặc ATTAA, hoặc yếu tố sau.
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 phần của nhánh thân chung theo cách khác mà hỗ trợ cho trình tự ở thân aptame và cho trình tự ở vòng thân tác động gồm 4 đến 8 nucleotit, 5 đến 7 nucleotit, 5 nucleotit, hoặc 6 nucleotit.
4. Catxet polynucleotit theo điểm 1, trong đó thân aptame gồm 6 đến 12 cặp bazơ, 7 đến 10 cặp bazơ, 8 cặp bazơ, hoặc 9 cặp bazơ.
5. Catxet polynucleotit theo điểm 1, trong đó thân của vòng thân tác động gồm 4 đến 24 cặp bazơ, 5 đến 20 cặp bazơ, 9 đến 14 cặp bazơ, 9 cặp bazơ, 10 cặp bazơ, 11 cặp bazơ hoặc 12 cặp bazơ.
6. Catxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó vòng thân tác động nằm ở vị trí 3' của aptame sao cho nhánh thân chung theo cách khác chứa toàn bộ hoặc một phần của nhánh thân aptame 3' và toàn bộ hoặc một phần của nhánh 5' của thân tác động.
7. Catxet polynucleotit theo điểm 6, trong đó trình tự polyadenyl hóa là tín hiệu polyadenyl hóa AATAAA hoặc ATTAA.
8. Catxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó vòng thân tác động nằm ở vị trí 5' của aptame sao cho nhánh thân chung theo cách khác chứa toàn bộ hoặc một phần của nhánh thân aptame 5' và toàn bộ hoặc một phần của nhánh 3' của thân tác động.
9. Catxet polynucleotit theo điểm 8, trong đó trình tự polyadenyl hóa là yếu tố sau (DSE).
10. Catxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 chứa hai công tắc ribo, trong đó vòng thân tác động của công tắc ribo thứ nhất chứa toàn bộ hoặc một phần của

tín hiệu polyadenyl hóa AATAAA hoặc ATTAAA và vòng thân tác động của công tắc ribo thứ hai chứa toàn bộ hoặc một phần của yếu tố sau (DSE).

11. Catxet polynucleotit theo điểm 10, trong đó mỗi công tắc trong số hai công tắc ribo chứa aptame mà liên kết với cùng một phối tử.
12. Catxet polynucleotit theo điểm 10, trong đó hai công tắc ribo chứa các aptame khác nhau mà liên kết với các phối tử khác nhau.
13. Phương pháp *in vitro* hoặc *ex vivo* nhằm điều biến sự biểu hiện của gen đích bao gồm các bước:
 - a. cài xen một hoặc nhiều catxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 vào vùng 3' chưa được dịch mã 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 aptame với lượng hữu hiệu để làm tăng mức độ biểu hiện của gen đích.
14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó phối tử là phân tử nhỏ.
15. Phương pháp theo điểm 13, trong đó vòng thân tác động nằm ở vị trí 3' của aptame sao cho nhánh thân chung theo cách khác chứa toàn bộ hoặc một phần của nhánh thân aptame 3' và toàn bộ hoặc một phần của nhánh 5' của thân tác động.
16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó trình tự polyadenyl hóa là tín hiệu polyadenyl hóa AATAAA hoặc ATTAAA.
17. Phương pháp theo điểm 13, trong đó vòng thân tác động nằm ở vị trí 5' của aptame sao cho nhánh thân chung theo cách khác chứa toàn bộ hoặc một phần của nhánh thân aptame 5' và toàn bộ hoặc một phần của nhánh 3' của thân tác động.
18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó trình tự polyadenyl hóa là yếu tố sau (DSE).
19. Phương pháp theo điểm 13 hoặc điểm 14, trong đó hai công tắc ribo được cài xen vào 3' UTR của gen đích, trong đó vòng thân tác động của công tắc ribo thứ nhất chứa toàn bộ hoặc một phần của tín hiệu polyadenyl hóa AATAAA hoặc ATTAAA và vòng thân tác động của công tắc ribo thứ hai chứa toàn bộ hoặc một phần của yếu tố sau (DSE).
20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó mỗi công tắc ribo trong số hai công tắc ribo chứa aptame mà liên kết với cùng một phối tử.
21. Phương pháp theo điểm 19, trong đó hai công tắc ribo chứa các aptame khác nhau mà

liên kết các phối tử khác nhau.

22. Phương pháp theo điểm 19, trong đó hai hoặc nhiều catxet polynucleotit chứa cùng một aptame.
23. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 22, trong đó gen đích chứa catxet polynucleotit được tích hợp vào vật truyền để biểu hiện gen đích.
24. Phương pháp của theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 22, trong đó gen đích còn chứa catxet điều hòa gen mà điều biến sự biểu hiện của gen đích bằng cách điều hòa cách ghép nối khác gián tiếp qua aptame.
25. Phương pháp theo điểm 23, trong đó vật truyền là vật truyền virus.
26. Phương pháp theo điểm 25, trong đó vật truyền virus được chọn từ nhóm bao gồm vật truyền adenovirus, vật truyền virus kết hợp adeno, và vật truyền lentivirus.
27. Vật truyền chứa gen đích mà chứa catxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12.
28. Vật truyền theo điểm 27, trong đó vật truyền là vật truyền virus.
29. Vật truyền theo điểm 28, trong đó vật truyền virus được chọn từ nhóm bao gồm vật truyền adenovirus, vật truyền virus kết hợp adeno, và vật truyền lentivirus.
30. Vật truyền theo điểm 27, trong đó gen đích còn chứa catxet điều hòa gen mà điều biến sự biểu hiện của gen đích bằng cách điều hòa cách ghép nối khác gián tiếp qua aptame.
31. Tác nhân để sử dụng trong việc điều trị ung thư, rối loạn miễn dịch, bệnh chuyển hóa, hiện tượng tạo mạch máu ở mắt, bệnh thoái hóa điểm vàng thể khô, bệnh đái tháo đường typ I, bệnh đái tháo đường typ II, hội chứng chuyển hóa, rối loạn sinh trưởng hoặc thiếu hụt hormon sinh trưởng, chứng thiếu máu do bệnh thận mạn tính, chứng thiếu máu do loạn sản tủy, chứng thiếu máu do hóa trị ung thư, chứng xơ nang, bệnh ưa chảy máu, loạn dưỡng cơ, chứng thiếu máu vùng biển, bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm, bệnh ưa chảy máu A hoặc bệnh ưa chảy máu B, trong đó tác nhân chứa catxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, hoặc vật truyền theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 27 đến 30.
32. Tác nhân để sử dụng trong việc điều biến biểu hiện gen đích, trong đó tác nhân chứa catxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, hoặc vật truyền theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 27 đến 30.

33. Thuốc chứa catxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 12, hoặc vật truyền theo điểm bất kỳ trong số các điểm 27 đến 30.
34. Dược phẩm chứa catxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 12, hoặc vật truyền theo điểm bất kỳ trong số các điểm 27 đến 30 và chất mang dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> MeiraGTx UK II Limited
Guo, Xuecui
Han, Joonhee
Zhong, Zhaojing
- <120> CATXET POLYNUCLEOTIT, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU BIẾN SỰ BIỂU HIỆN GEN ĐÍCH BẰNG CÁCH SỬ DỤNG CATXET POLYNUCLEOTIT VÀ VẬT TRUYỀN CHỨA CATXET POLYNUCLEOTIT
- <130> 162027.48676
- <150> US 62/461,689
<151> 2017-02-21
- <160> 17
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
<211> 332
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
- <220>
<223> Cấu trúc tổng hợp
- <400> 1
aaggccaaga agggcggaag gatcgccgtg taagccatac cacatttgta gaggttttac
60

ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg
120

ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atggttataa ataaagcaat agcatcacia
180

atttctaaag gtataatcgc gtggatatgg cacgcaagtt tctaccgggc accgtaaattg
240

tccgactacc tttatttcga aagaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt
300

ttgtccaaac tcatcaatgt atcttaacgc gt
332
- <210> 2
<211> 333
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2

aaggccaaga agggcggaag gatcgccgtg taagccatac cacatttgta gaggttttac
60

ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg
120

ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcacao
180

atttcacata aagcataatc gcgtggatat ggcacgcaag tttctaccgg gcaccgtaaa
240

tgtccgactg ctttatttcg aaagaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagttgtgg
300

tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttaacg cgt
333

<210> 3

<211> 335

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3

aaggccaaga agggcggaag gatcgccgtg taagccatac cacatttgta gaggttttac
60

ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg
120

ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcacao
180

atttaataaa gataatcgcg tggatatggc acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaatgt
240

ccgactcttt atttgtgcga aagcacaoat aaagcatttt tttcaactgca ttctagttgt
300

ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttaa cgcgt
335

<210> 4

<211> 337

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

aaggccaaga agggcggaag gatcgccgtg taagccatac cacatttgta gaggttttac
60

ttgcttttaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg
120

ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atggttatac ataaagcaat agcatcacia
180

attttaaagc aataatcgcg tggatatggc acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaatgt
240

ccgacttgct ttatttggtc gaaagcacia ataaagcatt ttttctactg cattctagtt
300

gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt aacgcgt
337

<210> 5

<211> 331

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 5

aaggccaaga agggcggaag gatcgccgtg taagccatac cacatttgta gaggttttac
60

ttgcttttaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg
120

ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atggttatac ataaagcaat agcatcacia
180

atttcacaaa taaagcattt ttttctactg attctagttg tggtttgtcc gaaaggacia
240

accataatcg cgtggatatg gcacgcaagt ttctaccggg caccgtaaat gtccgactgg
300

tttgtaaact catcaatgta tcttaacgcg t
331

<210> 6

<211> 332
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6
 aaggccaaga agggcggaag gatcgccgtg taagccatac cacatttgta gaggttttac
 60

ttgctttaaa aaacctccca cacctccccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg
 120

ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atgggttaca ataaagcaat agcatcacia
 180

atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg tggtttgtcc gaaaggacaa
 240

accaataatc gcgtggatat ggcacgcaag tttctaccgg gcaccgtaaa tgtccgactt
 300

ggtttgaaac tcatcaatgt atcttaacgc gt
 332

<210> 7
 <211> 335
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7
 aaggccaaga agggcggaag gatcgccgtg taagccatac cacatttgta gaggttttac
 60

ttgctttaaa aaacctccca cacctccccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg
 120

ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atgggttaca ataaagcaat agcatcacia
 180

atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg tggtttgtcc gaaaggacaa
 240

accacaataa tcgctggat atggcacgca agtttctacc gggcacgta aatgtccgac
 300

ttgtggttta aactcatcaa tgtatcttaa cgcgt
 335

<210> 8
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8
 aaggccaaga agggcggaag gatcgccgtg taagccatac cacatttgta gaggttttac
 60

ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg
 120

ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atgggttaca ataaagcaat agcatcaca
 180

atttcacaaa taaagcattt ttttcaactgc attctagtgtg tgggttgtcc gaaaggacaa
 240

accacaacat aatcgcggtg atatggcacg caagtttcta ccgggcaccg taaatgtccg
 300

actgttgtgg aaactcatca atgtatctta acgcgt
 336

<210> 9
 <211> 158
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 9
 aaggccaaga agggcggaag gatcgccgtg taaggatcca agcttatcga taccgtcgac
 60

ctcgagggcc cagatctgcg gccgcaataa aagatcttta ttttcattag atctgtgtgt
 120

tggttttttg tgtgtctaga aataattctt actgtcat
 158

<210> 10
 <211> 228
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

aaggccaaga agggcggaag gatcgccgtg taaggatcca agcttatcga taccgtcgac
60

ctcgagggcc cagatctgcg gcaaaaggta taatcgcggtg gatatggcac gcaagtttct
120

accgggcacc gtaaagtgtc gactaccttt tattggaaac aataaaagat ctttatatttc
180

attagatctg tgtgttggtt ttttgtgtgt ctagaaataa ttcttact
228

<210> 11

<211> 228

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 11

aaggccaaga agggcggaag gatcgccgtg taaggatcca agcttatcga taccgtcgac
60

ctcgagggcc cagatctgcg gccgcaataa aagatcttta ttttcattag atctgtgtgt
120

tggttttttg tgtgtcgaaa gacacacaat ataatcgcggt ggatatggca cgcaagtttc
180

taccgggcac cgtaaagtgc cgactattgt gtggaaataa ttcttact
228

<210> 12

<211> 153

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

aaggccaaga agggcggaag gatcgccgtg taaggatcca agcttatcga taccgtcgac
60

ctcgagggcc cagatctgcg gccgcaataa aatatcttta ttttcattac atctgtgtgt
120

tggttttttg tgtgtctaga aataattctt act
153

<210> 13
<211> 229
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13
aaggccaaga agggcggaaa gatcgccgtg taaggatcca agcttatcga tacggtcgac
60

ctcgagggcc cagatctgcg gaaaaggtat aatcgcggtg atatggcacg caagtttcta
120

ccgggcaccg taaatgtccg actacctttt attgcgaaag caataaaata tctttatttt
180

cattacatct gtgtgttggg tttttgtgtg tctagaaata attcttact
229

<210> 14
<211> 332
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14
aaggccaaga agggcggaaa gatcgccgtg taagccatac cacatttgta gaggttttac
60

ttgcttttaa aaacctcca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg
120

ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atggttaca ataaagcaat agcatcacia
180

atttctaaag gtataatcgc gtggatatgg cacgcaagtt tctaccgggc accgtaaatg
240

tccgactacc tttatttctt cggaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt
300

ttgtccaaac tcataatgt atcttaacgc gt
332

<210> 15
 <211> 332
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15
 aaggccaaga agggcggaag gatcgccgtg taagccatac cacatttgta gaggttttac
 60

ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg
 120

ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcacia
 180

atttctaaag gtataatcgc gtggatatgg cacgcaagtt tctaccgggc accgtaaatg
 240

tccgactacc tttatttcga atgaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt
 300

ttgtccaaac tcatcaatgt atcttaacgc gt
 332

<210> 16
 <211> 407
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16
 aaggccaaga agggcggaag gatcgccgtg taagccatac cacatttgta gaggttttac
 60

ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg
 120

ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcacia
 180

atttctaaag gtataatcgc gtggatatgg cacgcaagtt tctaccgggc accgtaaatg
 240

tccgactacc tttatttcga aagaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt
 300

ttgtccgaaa ggacaaacca taatcgcggtg gatatggcac gcaagtttct accgggcacc
 360

gtaaatgtcc gactggtttg taaactcatc aatgtatctt aacgcgt
407

<210> 17
<211> 334
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 17
aaggccaaga agggcggaaa gatcgccgtg taagccatac cacatttgta gaggttttac
60

ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg
120

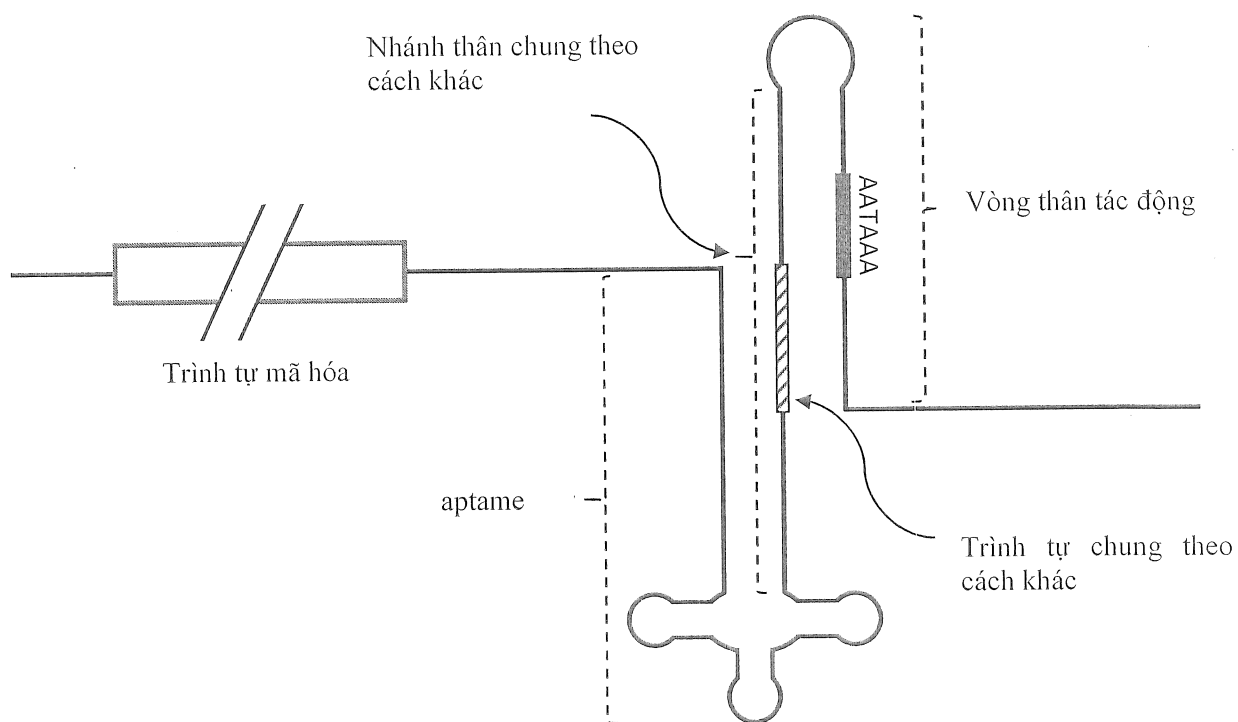
ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat agcatcacia
180

atttcaataa aggtataacc tcaataatat ggtttgaggg tgtctaccag gaaccgtaaa
240

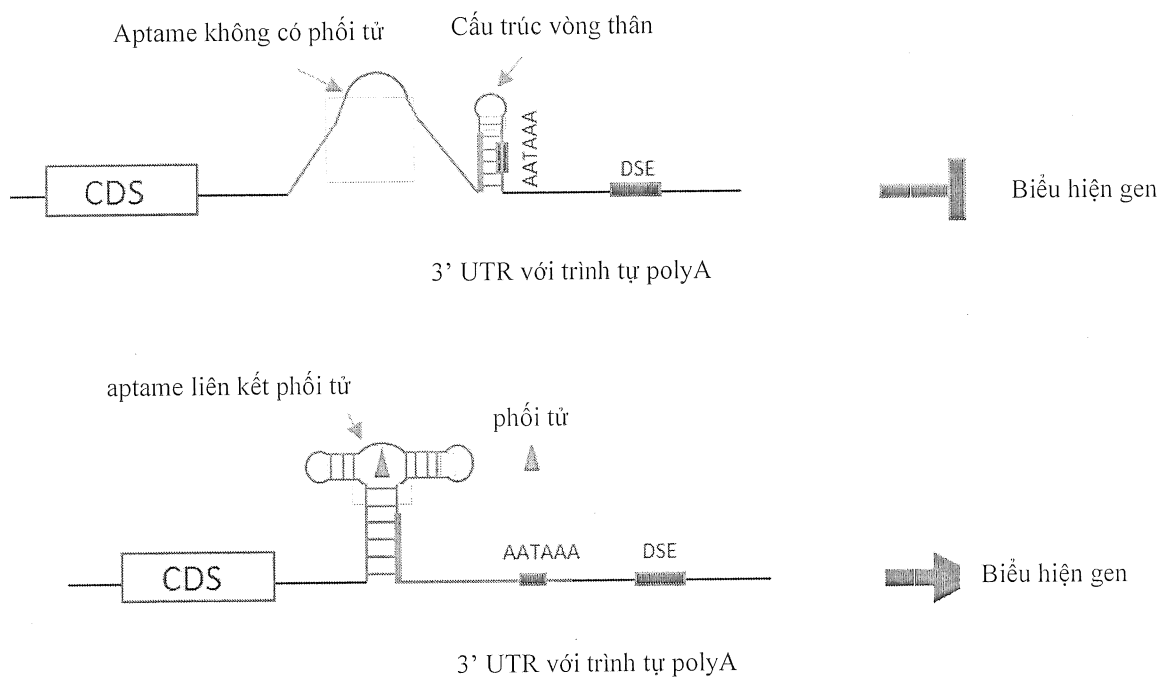
atcctgatta cctttatttc ttcggaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg
300

gtttgtccaa actcatcaat gtatcttaac gcgt
334

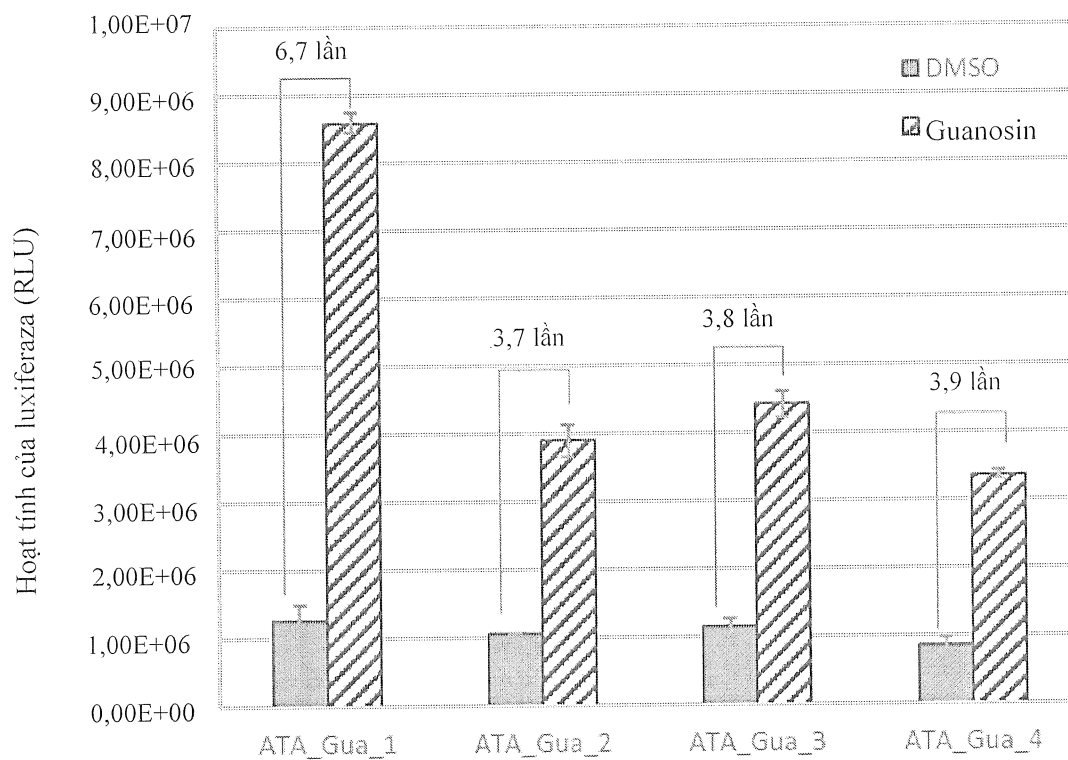
Hình 1a



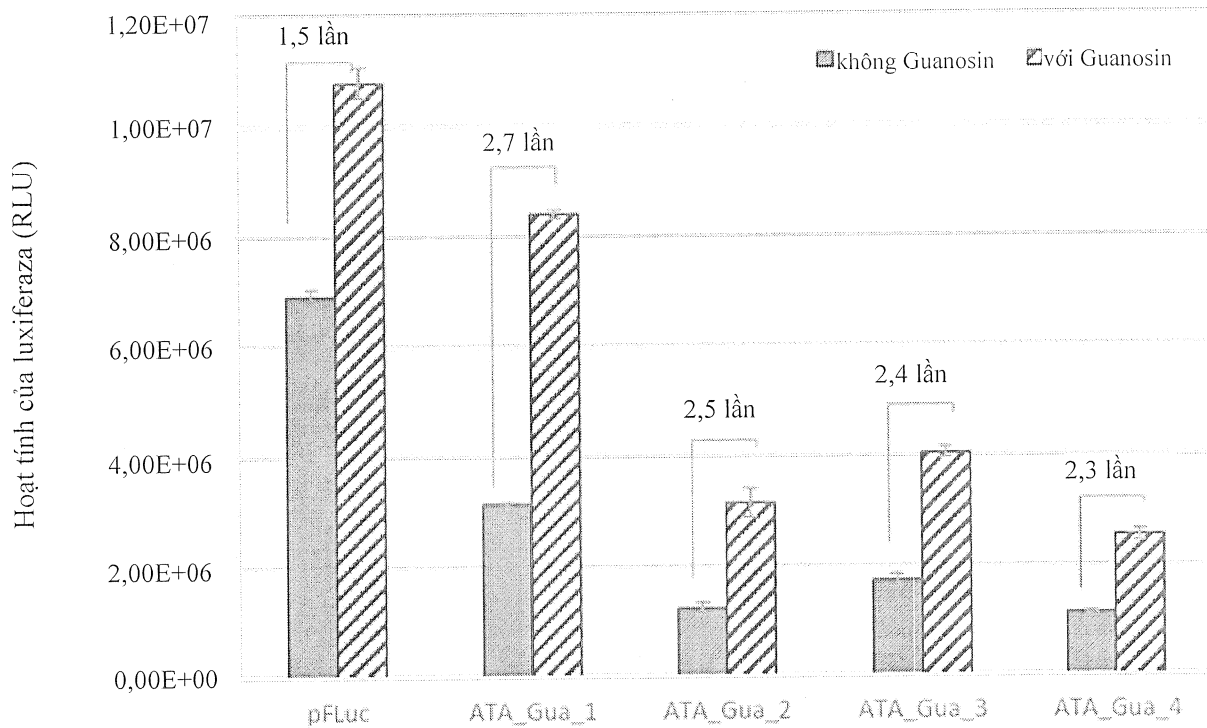
Hình 1b



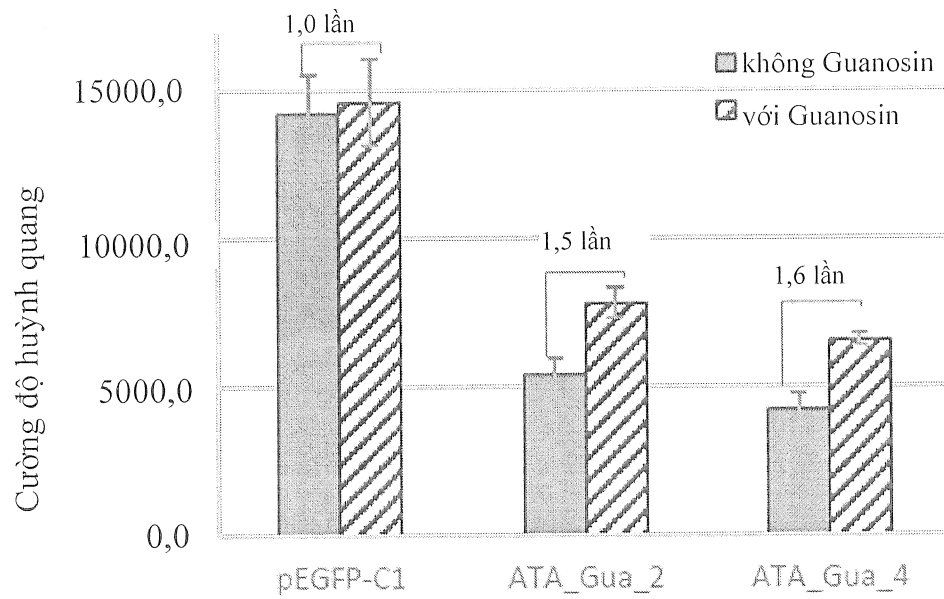
Hình 1c



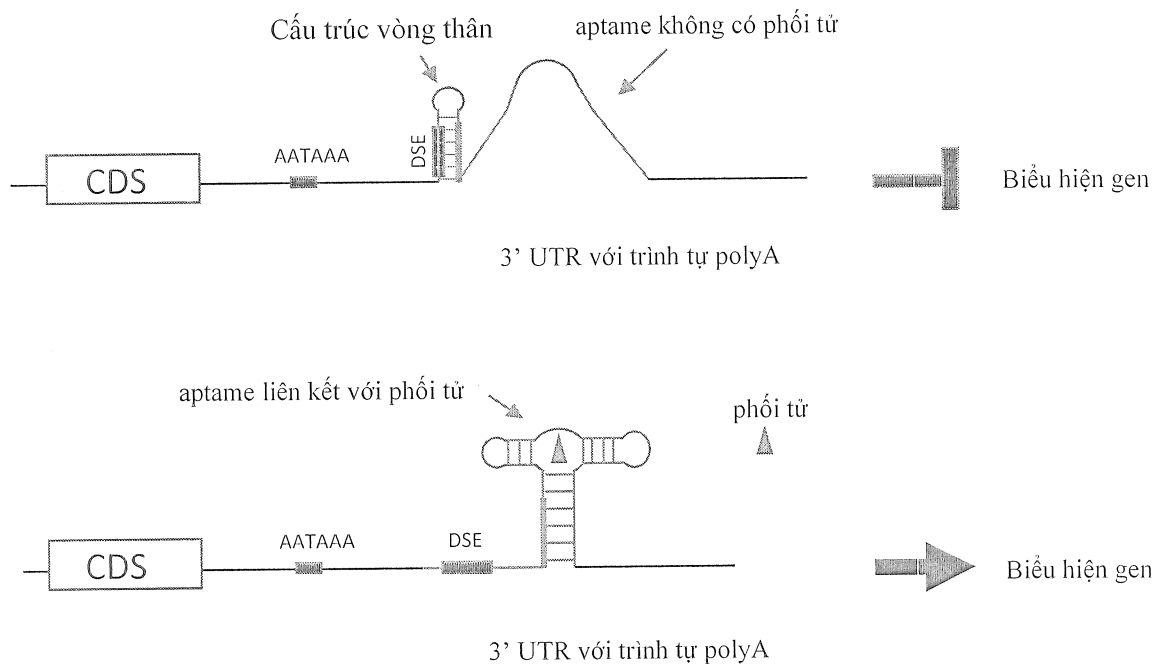
Hình 1d



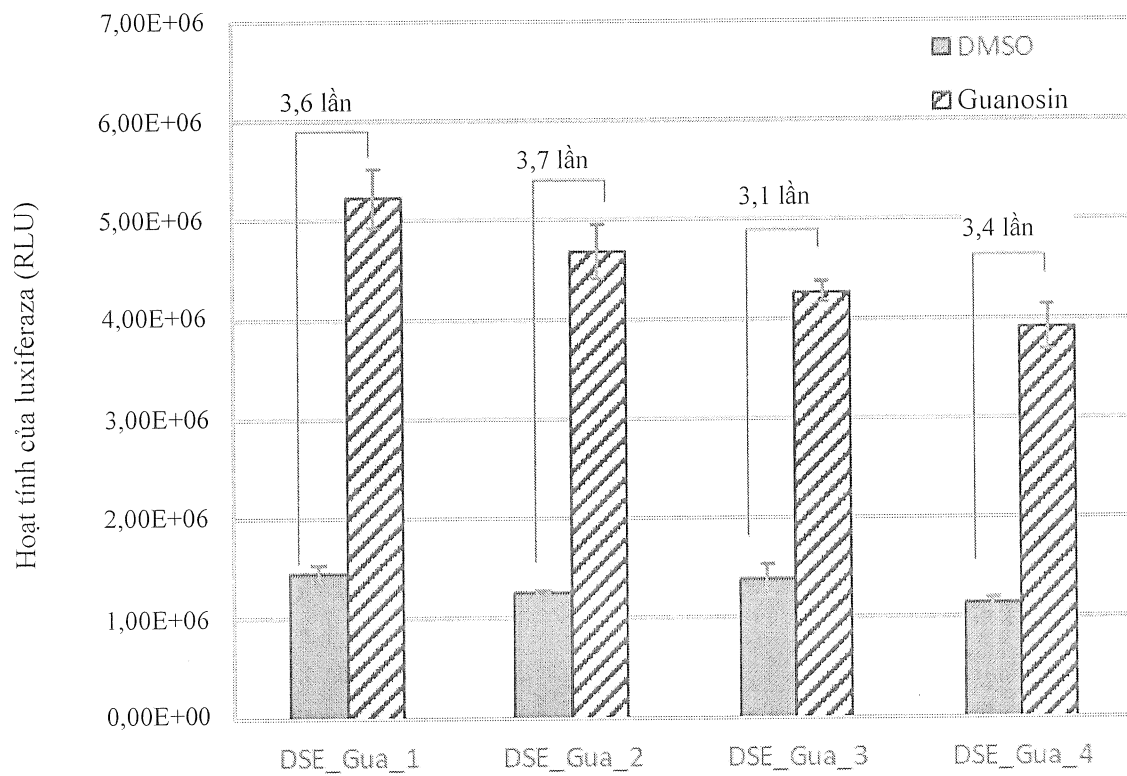
Hình 1e



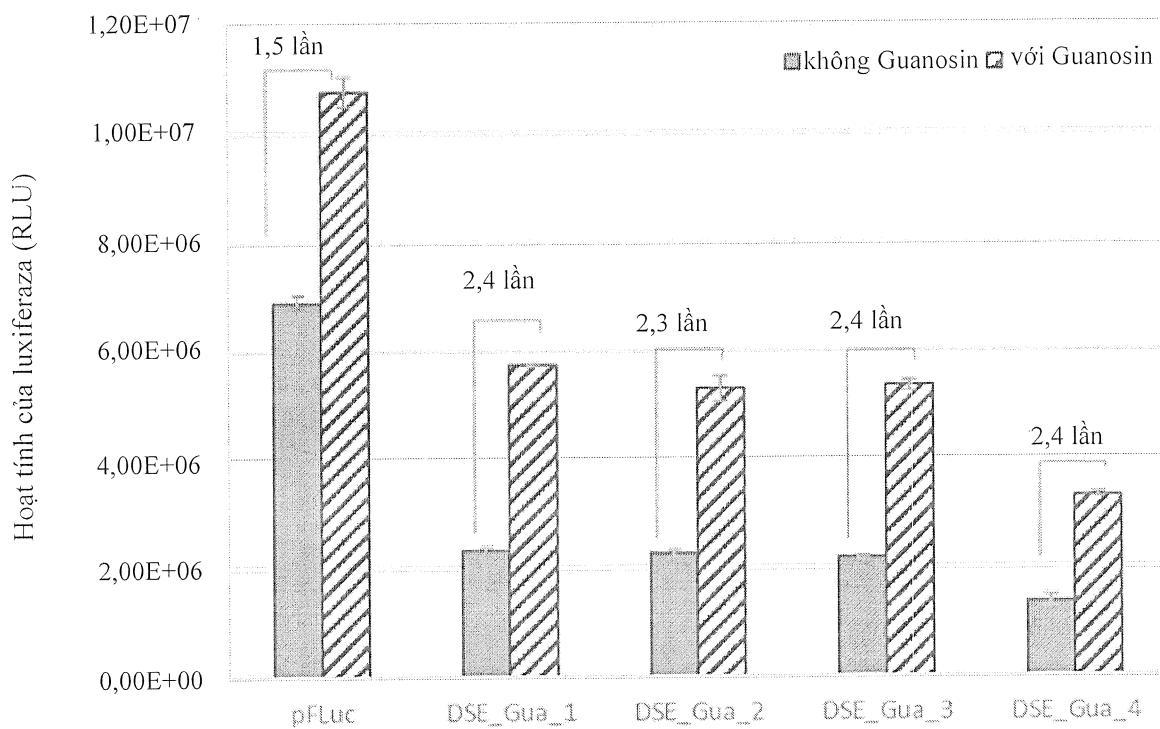
Hình 2a



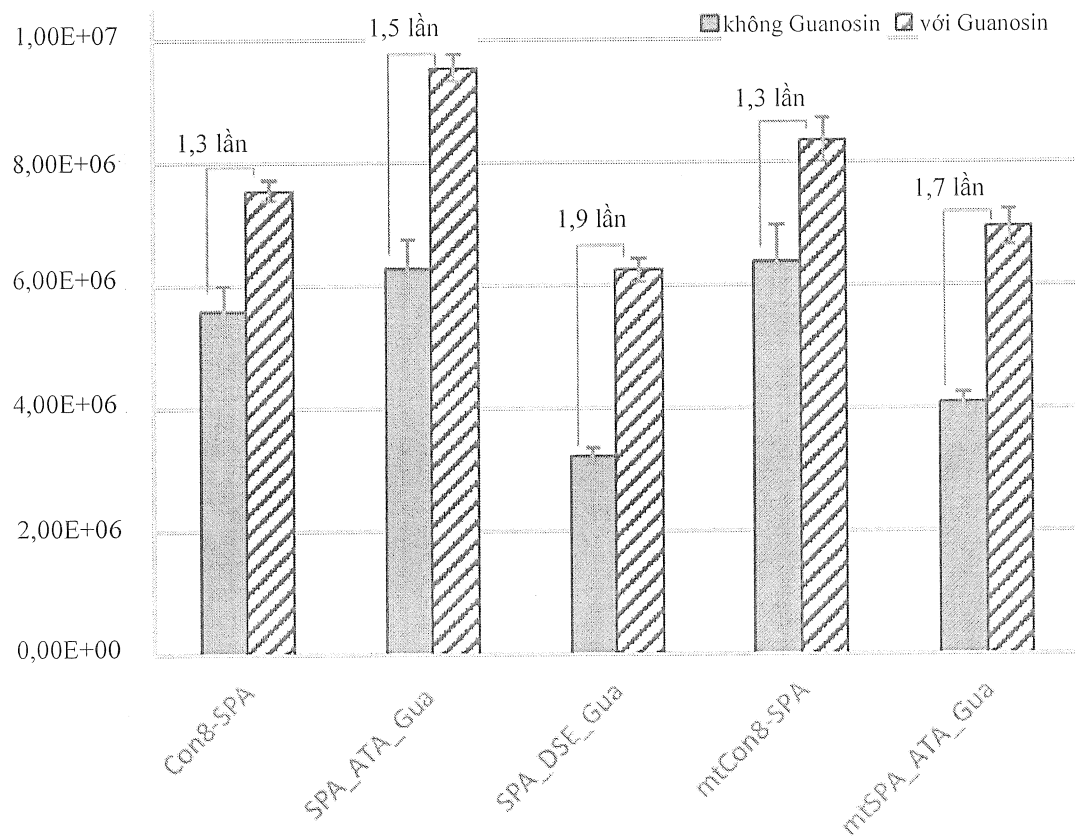
Hình 2b



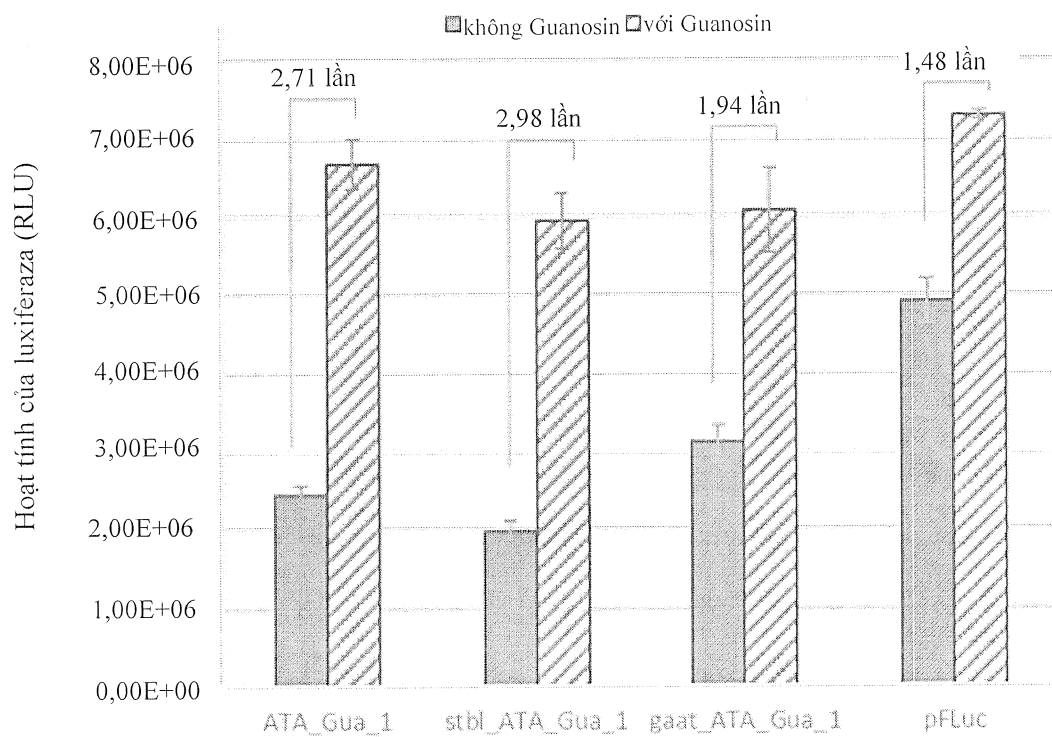
Hình 2c



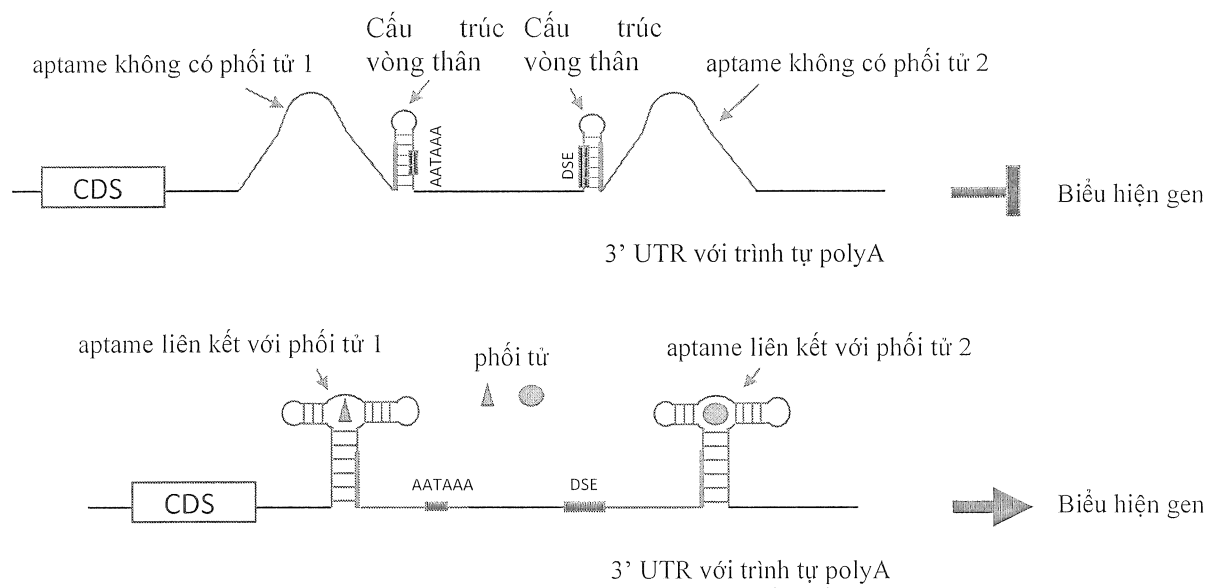
Hình 3



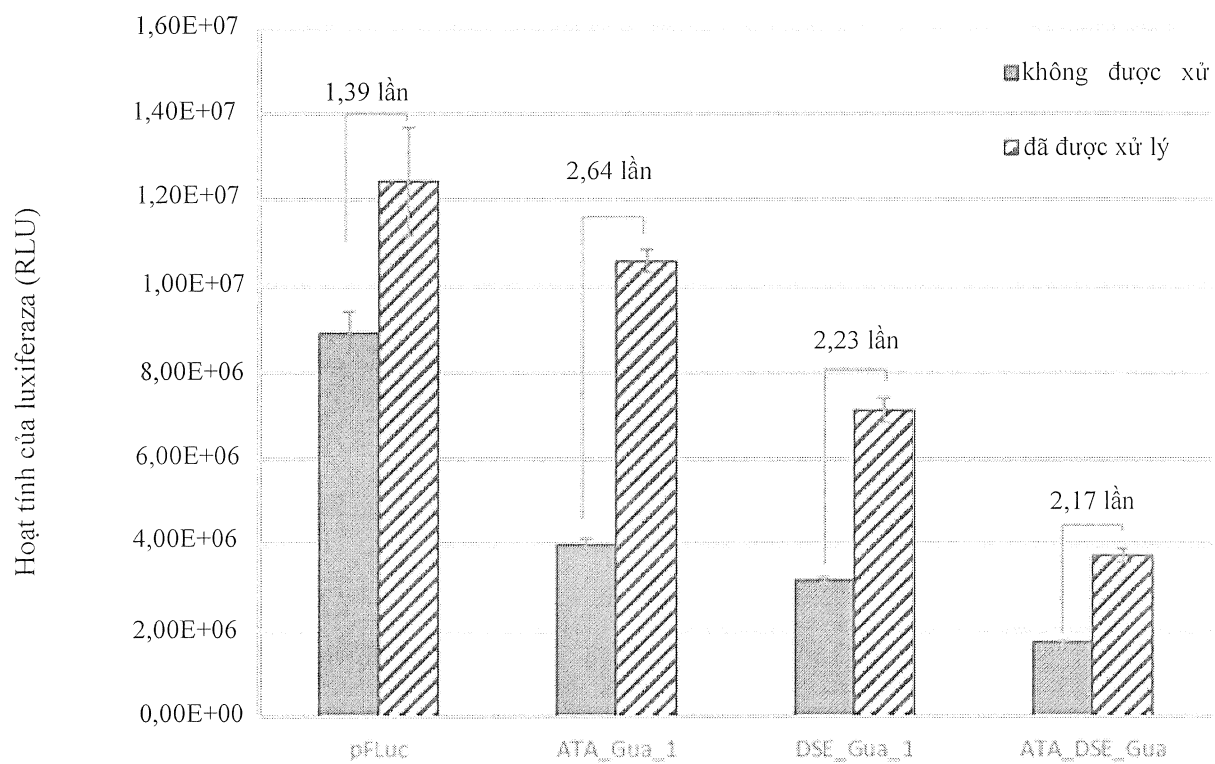
Hình 4



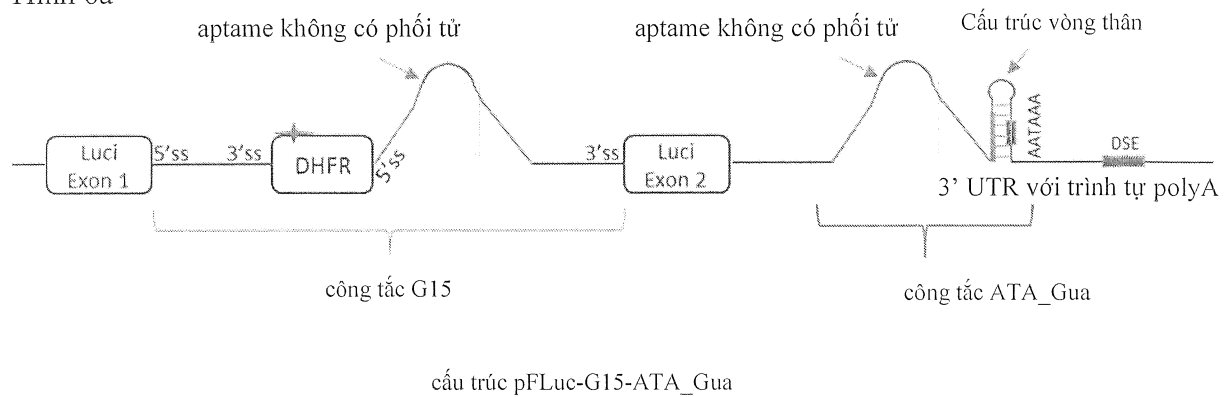
Hình 5a



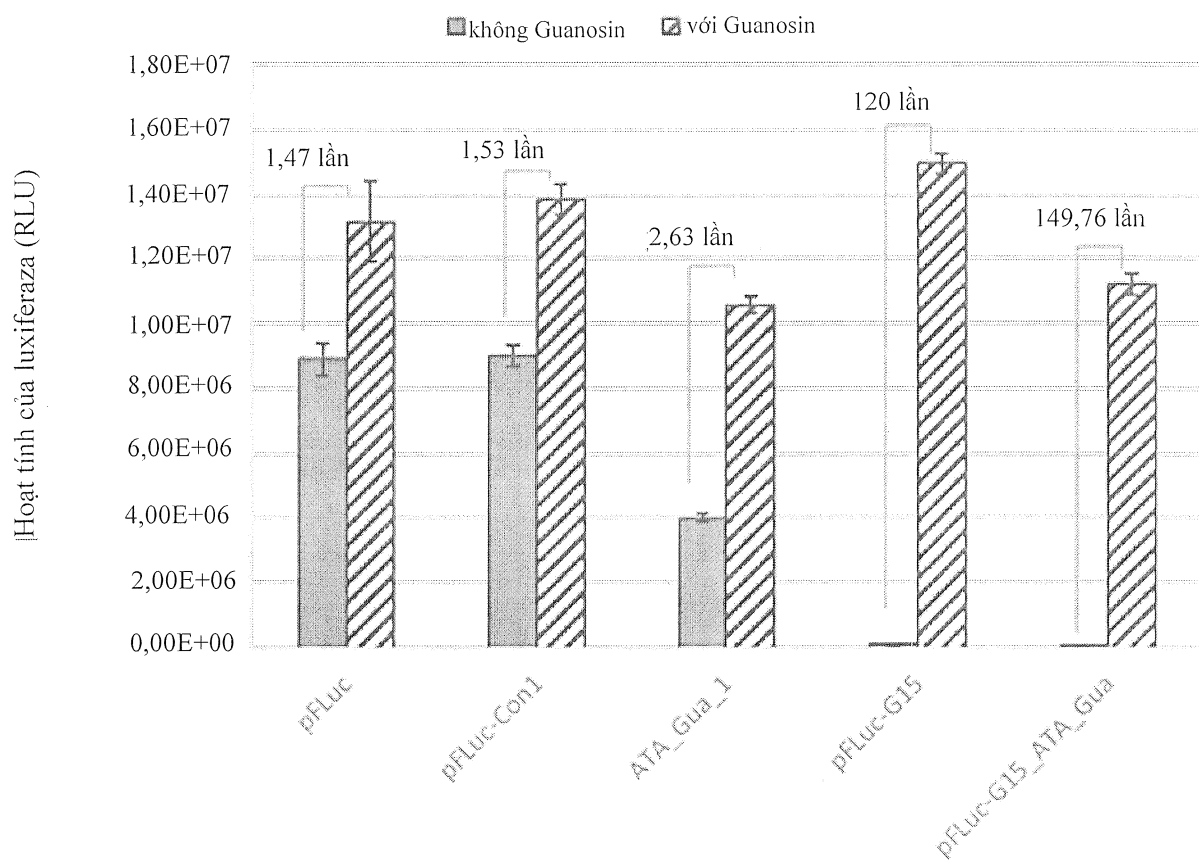
Hình 5b



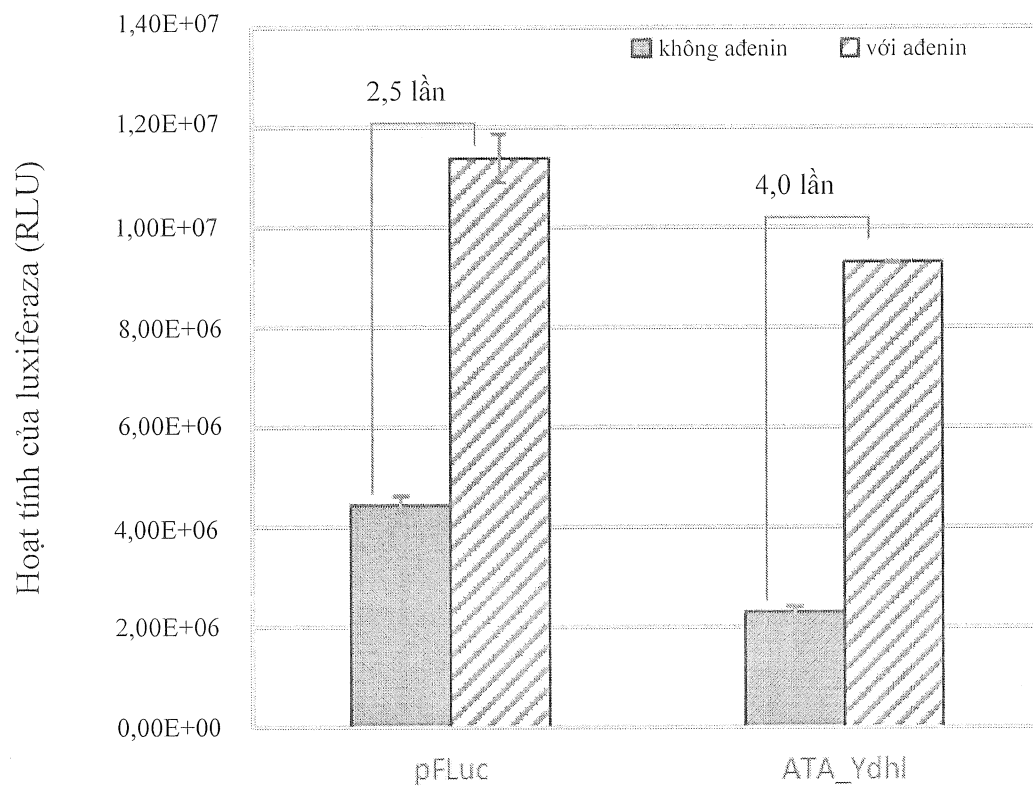
Hình 6a



Hình 6b



Hình 7



Hinh 8

ATA_Gua_1 (SEQ ID NO: 1):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccac
 acctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttggttaacttggtttattgcagettataatggttacaaataaagcaatagcat
 cacaaatttc~~taaaggataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgac~~~~tacctttatttcgaaagaaata~~
~~aagcattttttt~~actgcattctagtgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

ATA_Gua_2 (SEQ ID NO: 2):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccac
 acctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttggttaacttggtttattgcagettataatggttacaaataaagcaatagcat
 cacaaatttcac~~ataaagcataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgac~~~~tgcctttatttcgaaagaaat~~
~~aaagcattttttt~~actgcattctagtgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

ATA_Gua_3 (SEQ ID NO: 3):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccac
 acctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttggttaacttggtttattgcagettataatggttacaaataaagcaatagcat
 cacaaattt~~aataaagataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgac~~~~tctttatttgcgaaagcaciaa~~
~~ataaagcattttttt~~actgcattctagtgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

ATA_Gua_4 (SEQ ID NO: 4):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccac
 acctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttggttaacttggtttattgcagettataatggttacaaataaagcaatagcat
 cacaaattt~~taaagcataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgac~~~~ttgcctttatttgcgaaagcac~~
~~aaataaagcattttttt~~actgcattctagtgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

DSE_Gua_1 (SEQ ID NO: 5):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccac
 acctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttggttaacttggtttattgcagettataatggttacaaataaagcaatagcat
 cacaaatttcacaaataaagcatttttttactgcattctagtgtggttt~~gtccgaaaggacaaaccataatcgcggtggatatggcacgcaa~~
~~gtttctaccgggcaccgtaaatgtccgac~~~~tggtttgtaaactcatcaatgtatcttaacgcgt~~

DSE_Gua_2 (SEQ ID NO: 6):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccac
 acctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttggttaacttggtttattgcagettataatggttacaaataaagcaatagcat
 cacaaatttcacaaataaagcatttttttactgcattctagtgtggttt~~gtccgaaaggacaaaccataatcgcggtggatatggcacgcaa~~
~~agtttctaccgggcaccgtaaatgtccgac~~~~tggtttgtaaactcatcaatgtatcttaacgcgt~~

DSE_Gua_3 (SEQ ID NO: 7):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccac
acctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcat
cacaaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagttgtgtgtgtccgaaaggacaaaccacataatcgcggtggatatggcag
caagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactgtgtgttaactcatcaatgtatcttaacgcgt

DSE_Gua_4 (SEQ ID NO: 8):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccac
acctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcat
cacaaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagttgtgtgtgtccgaaaggacaaaccacataatcgcggtggatatggca
cgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactgtgtgtgaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

Hinh 8 (continued).

Con8-SPA (SEQ ID NO: 9):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcatccaagcttatcgataccgtcgacctcgagg
gcccagatctcgggccgcaataaaagatctttattttcattagatctgtgtgtgtgtgtgtgtctagaataattcttactgcat

SPA_ATA_Gua (SEQ ID NO: 10):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcatccaagcttatcgataccgtcgacctcgagg
gcccagatctcgggcaaaaggtataatcgcggtggatatggcagcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacctttattgg
aaacaataaaagatctttattttcattagatctgtgtgtgtgtgtgtgtctagaataattcttact

SPA_DSE_Gua (SEQ ID NO: 11):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcatccaagcttatcgataccgtcgacctcgagg
gcccagatctcgggccgcaataaaagatctttattttcattagatctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgaaagacacacataatcgcg
ggatatggcagcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactallgtgtggaaataattcttact

mtCon8-SPA (SEQ ID NO: 12):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcatccaagcttatcgataccgtcgacctcgagg
gcccagatctcgggccgcaataaaatattttattttcattacatctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtctagaataattcttact

mtSPA_ATA_Gua (SEQ ID NO: 13):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcatccaagcttatcgataccgtcgacctcgagg
gcccagatctcgggaaaaggtataatcgcggtggatatggcagcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacctttattgg
aaagcaataaaatattttattttcattacatctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtctagaataattcttact

Stbl_ATA_GUA_1 (SEQ ID NO: 14):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattttagaggttttacttgctttaa
 aaacctccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaataa
 agcaatagcatcacaaatttctaaaggtataategcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactaccttta
 ttcttcgggaaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

gaat_ATA_Gua_1 (SEQ ID NO: 15):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattttagaggttttacttgctttaa
 aaacctccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaataa
 agcaatagcatcacaaatttctaaaggtataategcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactaccttta
 ttctgaatgaaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

ATA_DSE_Gua (SEQ ID NO: 16):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattttagaggttttacttgctttaa
 aaacctccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaataa
 agcaatagcatcacaaatttctaaaggtataategcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactaccttta
 ttctgaaagaaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtccgaaaggacaaaccataatcgcggtggatatggcacgcaag
 ttctaccgggcaccgtaaatgtccgactggttgttaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

ATA_ydhl (SEQ ID NO: 17):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgccataccacattttagaggttttacttgctttaa
 aaacctccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaataa
 agcaatagcatcacaaatttcaataaaggtataacctcaataatggtttgaggggtgtctaccaggaaccgtaaaaatcctgattaccttt
 atttcttcgggaaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt