



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0043802

(51)⁷ A61K 48/00; C12N 15/86; C07H 21/04 (13) B

(21) 1-2018-03851

(22) 02/02/2017

(86) PCT/US2017/016279 02/02/2017

(87) WO 2017/136591 10/08/2017

(30) 62/290,200 02/02/2016 US

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/12/2018 369A

(73) MEIRAGTX UK II LIMITED (GB)

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

(72) VOLLES, Michael, J. (US); DANOS, Olivier, F. (FR); GUO, Xuecui (CA).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CẤU TRÚC POLYNUCLEOTIT ĐỂ ĐIỀU HÒA SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÍCH
VÀ PHƯƠNG PHÁP IN VITRO ĐIỀU HÒA SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÍCH

(21) 1-2018-03851

(57) Sáng chế đề xuất các cấu trúc polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện gen bằng cách điều biến dựa vào aptame sự ức chế quá trình polyadenyl hóa qua trung gian U1 ribonucleoprotein nhân nhỏ (snRNP) và phương pháp sử dụng các cấu trúc này để điều hòa sự biểu hiện gen đáp ứng với sự có mặt hoặc vắng mặt của phối tử liên kết với aptame này. Cấu trúc polynucleotit chứa vị trí liên kết U1 trong trường hợp công tắc ribo chứa vùng tác động và aptame sao cho khi aptame liên kết với phối tử, sự biểu hiện gen đích xảy ra.

LĨNH VỰC KỸ THUẬT ĐƯỢC ĐỀ CẬP

Sáng chế đề xuất các cấu trúc polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện gen bằng cách điều biến dựa vào aptame tác dụng ức chế quá trình polyadenyl hóa qua trung gian U1 snRNP và phương pháp sử dụng các cấu trúc này để điều hòa sự biểu hiện gen đáp ứng với sự có mặt hoặc vắng mặt của phối tử liên kết với aptame này. Cấu trúc polynucleotit chứa vị trí liên kết U1 trong trường hợp công tắc ribo chứa vùng tác động và aptame sao cho khi aptame liên kết với phối tử, sự biểu hiện gen đích xảy ra.

TÌNH TRẠNG KỸ THUẬT CỦA SÁNG CHẾ

Các ARN thông tin (mARN) trong tế bào nhân chuẩn được sản sinh ra từ các bản sao tiền mARN bằng cách xử lý sau phiên mã mở rộng, bao gồm gắt mũ đầu 5', loại bỏ các intron bằng cách cắt nối, và cắt đầu 3' và polyadenyl hóa. Quá trình cắt nối được thực hiện bởi spliceosome, phức hợp ARN-protein lớn chứa chủ yếu ribonucleoprotein nhân nhỏ (snRNP). Spliceosome chiếm ưu thế (typ U2) bao gồm U1, U2, U4, U6 và U5 snRNP, trong khi đó spliceosome typ U12 kém phong phú hơn nhiều bao gồm U11, U12, U4atac, U6atac và U5 snRNP.

Đầu 3' của hầu như toàn bộ các mARN nhân chuẩn chứa đuôi poly(A)— polyme đồng nhất chứa từ 20 đến 250 gốc adenosin. Đuôi poly(A) được bổ sung vào tiền mARN trong nhân bằng cách cắt và polyadenyl hóa, quá trình được xúc tác bởi phức hợp lớn của các protein. Ở động vật có xương sống, việc bổ sung đuôi poly(A) phụ thuộc vào hai yếu tố ARN tác động cis, trình tự polyadenyl hóa AAUAAA được bảo tồn cao được phát hiện ngược dòng vị trí polyadenyl hóa và yếu tố giàu GU được bảo tồn kém được phát hiện xuôi dòng. Việc bổ sung đuôi poly(A) vào mARN bảo vệ nó khỏi sự thoái biến, ngoài các chức năng khác.

U1 snRNP đã được chỉ ra là có hoạt động độc lập với sự cắt nối trong việc xử lý tiền mARN bằng cách ức chế việc xử lý đầu 3' của tiền mARN, ức chế tín hiệu polyadenyl hóa intron nhằm, và đảm bảo khả năng định hướng trình tự khởi động. Ví dụ, Fortes et al. (PNAS, 100:8264-69, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), đưa từ một đến ba vị trí liên kết U1 vào 3' UTR dẫn đến sự biểu hiện gen chỉ thị giảm.

BẢN CHẤT KỸ THUẬT CỦA SÁNG CHẾ

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất caxet polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện của gen đích chứa công tắc ribo, trong đó công tắc ribo này chứa vùng tác động và aptame, trong đó vùng tác động chứa vị trí liên kết U1 snRNP và trình tự bổ sung cho vị trí liên kết U1 snRNP này. Trong một phương án, aptame này liên kết với phối tử phân tử nhỏ.

Trong một phương án, trình tự tác động chứa, ngoài vị trí liên kết U1 snRNP và trình tự bổ sung cho vị trí liên kết U1 snRNP này, trình tự bổ sung mà có khả năng tạo ra thân khi aptame liên kết với phối tử. Trong một phương án, vùng tác động chứa trình tự tạo thân dài từ 9 đến 11 cặp bazơ. Trong một phương án, vùng tác động chứa trình tự tạo thân có một hoặc nhiều bazơ bất cặp nhằm trong thân này.

Trong một phương án, vị trí liên kết U1 snRNP là từ 8 đến 10 nucleotit. Trong một phương án, vị trí liên kết U1 snRNP chứa trình tự CAGGTAAG. Trong một phương án, vị trí liên kết U1 snRNP được chọn từ nhóm bao gồm CAGGTAAGTA, CAGGTAAGT, và CAGGTAAG.

Trong một phương án, caxet polynucleotit chứa hai hoặc nhiều công tắc ribo, trong đó mỗi công tắc ribo chứa vùng tác động và aptame, trong đó vùng tác động chứa vị trí liên kết U1 snRNP và trình tự bổ sung cho vị trí liên kết U1 snRNP này. Trong một phương án, mỗi trong số hai hoặc nhiều công tắc ribo này chứa aptame liên kết với cùng một phối tử. Trong một phương án, hai hoặc nhiều công tắc ribo chứa nhiều aptame khác nhau liên kết với nhiều phối tử khác nhau.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều hòa sự biểu hiện của gen đích bao gồm:

- (a) gắn xen một hoặc nhiều caxet polynucleotit được mô tả trên đây vào 3' UTR của gen đích,
- (b) đưa gen đích chứa caxet polynucleotit vào tế bào, và
- (c) cho tế bào tiếp xúc với phối tử liên kết đặc hiệu với aptame với lượng hữu hiệu để làm tăng sự biểu hiện của gen đích.

Trong một phương án, phối tử này là phân tử nhỏ.

Trong một phương án, caxet polynucleotit này được gắn xen vào vị trí khoảng 87 và/hoặc khoảng 140 nucleotit 5' của tín hiệu polyadenyl hóa. Trong một phương án, caxet polynucleotit được gắn xen vào một hoặc nhiều vị trí trong các vị trí khoảng 74, khoảng 110, hoặc khoảng 149 nucleotit 5' của tín hiệu polyadenyl hóa.

Trong một phương án, hai hoặc nhiều caxet polynucleotit được gắn xen vào 3' UTR của gen đích. Trong một phương án, hai hoặc nhiều caxet polynucleotit này chứa nhiều aptame khác nhau liên kết đặc hiệu với nhiều phối tử phân tử nhỏ khác nhau. Trong một phương án, hai hoặc nhiều caxet polynucleotit chứa cùng một aptame. Trong một phương án, hai hoặc nhiều caxet polynucleotit được gắn xen vào nhiều vị trí khác nhau của 3' UTR của gen đích.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất gen đích chứa caxet polynucleotit đã mô tả trên đây được đưa vào vector để biểu hiện gen đích. Trong một phương án, vector này là vector virus. Trong một phương án, vector virus này được chọn từ nhóm bao gồm vector adenovirus, vector virus liên hợp adeno, và vector lentivirus.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vector chứa gen đích mang caxet polynucleotit được mô tả ở đây. Trong một phương án, vector này là vector virus. Trong một phương án, vector virus này được chọn từ nhóm bao gồm vector adenovirus, vector virus liên hợp adeno, và vector lentivirus.

MÔ TẢ VẮN TẮT CÁC HÌNH VẼ

Fig. 1a-1b. Vị trí liên kết U1 trong 3' UTR ức chế sự biểu hiện gen đích (luciferaza).

Fig. 1a. Sơ đồ gắn xen trình tự liên kết U1 vào 3' UTR ở vị trí khác trong vector pRL-SV40. Các trình tự liên kết U1 liên ứng kiểu hoang và đột biến được liệt kê.

Fig. 1b. Kết quả của thử nghiệm Renilla luciferaza. Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp bằng các cấu trúc đã được chỉ ra chứa, ở nhiều vị trí khác nhau trong 3' UTR, trình tự liên kết U1 liên ứng hoặc trình tự đột biến. Các kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD (n=3), và số lần giảm được tính bằng tỉ số giữa hoạt tính luciferaza từ cấu trúc đột biến với hoạt tính luciferaza từ cấu trúc kiểu hoang.

Fig. 2a-2b. Tác động của độ dài của trình tự liên kết U1 trong 3' UTR đối với tác dụng ức chế sự biểu hiện gen.

Fig. 2a. Trình tự có độ dài đầy đủ và trình tự bị cắt của các vị trí liên kết U1 được gắn xen vào vị trí -87 trong 3' UTR.

Fig. 2b. Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp bằng các cấu trúc đã được chỉ ra chứa các trình tự liên kết U1 có độ dài đầy đủ hoặc bị cắt được gắn xen vào vị trí -87 và hoạt tính luciferaza được xác định.

Fig. 3a-3b. Tác động của cấu trúc vòng thân ở vị trí U1 trong 3' UTR đối với sự biểu hiện gen.

Fig. 3a. Trình tự của cấu trúc vòng thân gắn vị trí liên kết U1 vào thân. Các đột biến được tạo ra để tạo ra thân bị gãy (được thể hiện bên phải).

Fig. 3b. Kết quả của thử nghiệm hoạt tính luciferaza chỉ ra rằng cấu trúc vòng thân cách ly vị trí liên kết U1 làm triệt tiêu hoàn toàn tác dụng ức chế sự biểu hiện gen do sự cản trở của U1.

Fig. 4a-4c. Sử dụng theophyllin aptame để điều biến sự cản trở của U1 trong 3' UTR của gen đích.

Fig. 4a. Sơ đồ thể hiện sự cản trở của U1 được điều biến bằng aptame trong 3' UTR và sự biểu hiện gen. Khi vắng mặt phối tử aptame (panen trên cùng), vị trí U1 được gắn xen vào 3' UTR là sẵn sàng cho sự liên kết U1 snRNP và cản trở quá trình polyadenyl hóa qua trung gian U1, do đó ức chế sự biểu hiện gen đích. Khi có mặt phối tử aptame (panen dưới), liên kết aptame/phối tử dẫn đến sự tạo thành thân mà cách ly vị trí liên kết U1 khỏi sự liên kết U1 snRNP. Sự cản trở quá trình polyadenyl hóa qua trung gian U1 bị triệt tiêu, gây ra sự biểu hiện gen đích.

Fig. 4b. Trình tự của thân vùng tác động mà cách ly vị trí liên kết U1 và nối với theophyllin aptame, được tạo ra bởi sự cắt liên tiếp thân kẹp tóc và thân dưới của theophyllin aptame. Được thể hiện là các trình tự thân cho các cấu trúc U1 theo_1, 8 và 9. Theophyllin được thể hiện bằng ▲.

Fig. 4c. Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp bằng các cấu trúc đã chỉ ra, và được xử lý bằng hoặc không được xử lý bằng 3 mM theophyllin. Số lần tăng do cảm ứng được tính bằng tỉ số của giá trị hoạt tính luciferaza thu được từ các tế bào được xử lý bằng theophyllin với hoạt tính luciferaza thu được từ các tế bào không được xử lý.

Fig. 5a-5c. Tối ưu hóa trình tự thân vùng tác động để tăng cường khả năng điều hòa khả năng tiếp cận vị trí U1.

Fig. 5a. Các trình tự thân của U1_theo_8 và U1_theo_9, với các đột biến liên tiếp được liệt kê bên cạnh nucleotit tương ứng. Các đột biến liên tiếp tạo ra sự bắt cặp nhầm trong thân vùng tác động.

Fig. 5b. Tổng số 9 cấu trúc được tạo ra nhờ việc gây đột biến liên tiếp U1_theo_8 và mỗi cấu trúc được chuyển nạp vào các tế bào HEK 293. Các tế bào chuyển nạp được xử lý hoặc không được xử lý bằng 3 mM theophyllin và hoạt tính luciferaza được đo. Các kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD, và số lần tăng do cảm ứng được chỉ ra cho các cấu trúc U1_theo_8 đến U1_8_5.

Fig. 5c. Tổng số 8 cấu trúc được tạo ra nhờ việc gây đột biến liên tiếp U1_theo_9 và mỗi cấu trúc được chuyển nạp vào các tế bào HEK 293. Các tế bào chuyển nạp được xử lý hoặc không được xử lý bằng 3 mM theophyllin và hoạt tính luciferaza được đo. Các kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD.

Fig. 6a-6b. Tác động của các công tắc ribo U1_theo bội trong 3' UTR đối với tác dụng điều hòa sự biểu hiện gen đích.

Fig. 6a. Sơ đồ thể hiện 4 bản sao của U1_theo_8_1 trong 3' UTR của gen đích (luciferaza).

Fig. 6b. HEK 293 được chuyển nạp bằng các cấu trúc đã được chỉ ra, và được xử lý bằng theophyllin ở nhiều nồng độ khác nhau. Bốn bản sao của U1_theo_8_1 trong 3' UTR gây ra sự cảm ứng làm tăng 4,3 lần hoạt tính luciferaza ở nồng độ 6 mM.

Fig. 7a-7c. Sử dụng guanin aptame để điều hòa sự cản trở của U1.

Fig. 7a. Sơ đồ chỉ ra trình tự U1_Gua ở vị trí khác trong 3' UTR chứa tín hiệu poly(A) sớm SV40.

Fig. 7b. Sơ đồ thể hiện trình tự thân vùng tác động trong công tắc U1_Gua mà cách ly vị trí U1 (khi có mặt phối tử guanin) và nối với guanin aptame. Guanin được thể hiện bằng ●.

Fig. 7c. Guanin aptame điều hòa tác dụng cản trở quá trình polyadenyl hóa của U1 đáp ứng với việc xử lý bằng guanin. Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp bằng các cấu

trúc đã được chỉ ra. Các cấu trúc chứa vị trí U1 đột biến và trình tự bổ sung của nó được sử dụng làm đối chứng. Các kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD, số lần tăng do cảm ứng được thể hiện cho mỗi cấu trúc.

Fig. 8. Công tắc ribo U1_Gua hoạt động trong trường hợp của trình tự polyA globin beta người.

MÔ TẢ CHI TIẾT SÁNG CHẾ

Sáng chế đề xuất các cấu trúc polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện gen bằng cách điều biến dựa vào aptame sự ức chế quá trình polyadenyl hóa qua trung gian U1 snRNP và phương pháp sử dụng các cấu trúc này để điều hòa sự biểu hiện gen đáp ứng với sự có mặt hoặc vắng mặt của phối tử liên kết với aptame này. Cấu trúc polynucleotit này chứa ít nhất một công tắc ribo chứa vùng tác động và vùng cảm biến. Vùng tác động chứa vị trí liên kết U1 snRNP và trình tự bổ sung cho vị trí liên kết U1 snRNP này sao cho hai trình tự này có khả năng tạo ra thân mà cách ly vị trí liên kết U1 snRNP do đó ngăn cản sự liên kết của U1 snRNP. Vùng tác động có thể chứa trình tự khác và phần bổ sung của nó nhờ đó thân vùng tác động dài hơn so với vị trí liên kết U1 snRNP và trình tự bổ sung của nó. Vùng cảm biến chứa trình tự ARN liên kết với phối tử, và đáp ứng với sự liên kết này, làm thay đổi cấu hình của vùng tác động. Trong một phương án, vùng cảm biến chứa aptame. Khi phối tử aptame không có mặt, vùng tác động không tạo ra thân. Vị trí liên kết U1 snRNP là sẵn sàng và được liên kết bởi U1 snRNP, mà ức chế quá trình polyadenyl hóa của mARN. Khi phối tử aptame có mặt, nó liên kết với aptame làm cho vùng tác động tạo ra thân, ngăn cản U1 snRNP liên kết với vị trí liên kết U1. U1 snRNP không được huy động đến 3' UTR của mARN gen đích và quá trình polyadenyl hóa thông tin xảy ra.

Caxet polynucleotit điều hòa gen đề cập đến cấu trúc ADN tái tổ hợp mà, khi được kết hợp vào ADN của gen đích trong 3' UTR, tạo ra khả năng điều hòa sự biểu hiện của gen đích bằng cách ức chế quá trình polyadenyl hóa bởi U1 snRNP qua trung gian aptame/phối tử. Như được sử dụng ở đây, cấu trúc hoặc caxet polynucleotit là axit nucleic (ví dụ, ADN hoặc ARN) chứa các yếu tố thu được từ nhiều nguồn khác nhau (ví dụ, các sinh vật khác nhau, các gen khác nhau từ cùng một sinh vật, và tương tự). Caxet polynucleotit này chứa công tắc ribo. Công tắc ribo trong ngữ cảnh sáng chế chứa vùng cảm biến (ví dụ, aptame) và vùng tác động cùng chịu trách nhiệm về việc cảm biến sự có mặt của phối tử mà liên kết với vùng cảm biến và làm thay đổi hình dạng của vùng tác

động chứa vị trí liên kết U1 snRNP và trình tự bổ sung cho vị trí liên kết U1 snRNP này. Trong một phương án, sự biểu hiện của gen đích được tăng cường khi phối tử aptame có mặt và bị giảm khi phối tử này vắng mặt.

Công tắc ribo

Thuật ngữ “công tắc ribo” như được sử dụng ở đây đề cập đến đoạn điều hòa của polynucleotit ARN. Công tắc ribo trong ngữ cảnh theo sáng chế chứa vùng cảm biến (ví dụ, aptame) và vùng tác động mà cùng chịu trách nhiệm về việc cảm biến sự có mặt của phối tử (ví dụ, phân tử nhỏ) và điều hòa khả năng tiếp cận vị trí liên kết U1 snRNP nằm trong vùng tác động. Trong một phương án, công tắc ribo là tái tổ hợp, sử dụng polynucleotit từ hai hoặc nhiều nguồn. Thuật ngữ “tổng hợp” như được sử dụng ở đây trong ngữ cảnh của công tắc ribo đề cập đến công tắc ribo không xuất hiện tự nhiên. Trong một phương án, vùng cảm biến và vùng tác động được nối bằng cầu nối polynucleotit. Trong một phương án, cầu nối polynucleotit tạo ra thân ARN (nghĩa là, vùng polynucleotit ARN là chuỗi kép).

Vùng tác động

Vùng tác động của công tắc ribo chứa trình tự ARN mà, đáp ứng với phối tử liên kết với vùng cảm biến (ví dụ, aptame), tạo ra cấu trúc thân (vùng chuỗi kép) mà làm giảm khả năng tiếp cận của vị trí liên kết U1 snRNP với U1 snRNP. Vùng tác động chứa vị trí liên kết U1 snRNP và trình tự bổ sung cho vị trí liên kết U1 snRNP này. Khi aptame liên kết với phối tử của nó, vùng tác động tạo ra thân và do đó cách ly vị trí liên kết U1 snRNP khỏi sự liên kết với U1 snRNP. Trong một số điều kiện nhất định (ví dụ, khi aptame không được liên kết với phối tử của nó), vùng tác động nằm trong ngữ cảnh tạo ra sự tiếp cận với vị trí liên kết U1 snRNP, cho phép U1 snRNP liên kết với mARN và ức chế quá trình polyadenyl hóa dẫn đến sự thoái hóa của thông tin này.

Vị trí liên kết U1 snRNP có thể là trình tự polynucleotit bất kỳ có khả năng liên kết với U1 snRNP, do đó huy động U1 snRNP đến 3' UTR của gen đích và ức chế quá trình polyadenyl hóa của thông tin gen đích. Trong một phương án, vị trí liên kết U1 snRNP (còn được gọi ở đây là “vị trí liên kết U1” hoặc “vị trí U1”) là vị trí liên ứng CAGGTAAGTA (CAGGUAAGUA khi ở trong mRNA). Trong một số phương án, vị trí liên kết U1 snRNP là biến thể của trình tự liên ứng này, bao gồm các trình tự được lấy làm ví dụ mà ngắn hơn hoặc có một hoặc nhiều nucleotit được thay đổi so với trình tự liên ứng

này. Trong một phương án, vị trí liên kết U1 snRNP chứa trình tự CAGGTAAG. Trong một số phương án, vị trí liên kết này được mã hóa bởi trình tự được chọn từ CAGGTAAGTA, CAGGTAAGT, và CAGGTAAG. Vị trí liên kết U1 snRNP có thể là vị trí cắt nối 5' bất kỳ từ gen, ví dụ, vị trí cắt nối 5' từ DHFR exon 2 của người (*xem Ví dụ 7 và 8*).

Phần thân của vùng tác động nên có độ dài (và hàm lượng GC) đủ để ức chế U1 snRNP liên kết với vị trí liên kết U1 snRNP khi phối tử liên kết với aptame, đồng thời cho phép tiếp cận với vị trí liên kết U1 snRNP khi phối tử này không có mặt với các lượng đủ. Trong nhiều phương án của sáng chế, phần thân của vùng tác động chứa trình tự thân khác ngoài vị trí liên kết U1 snRNP và trình tự bổ sung của nó. Trong nhiều phương án của sáng chế, trình tự thân khác này chứa trình tự từ thân aptame. Độ dài và trình tự của phần thân này có thể được biến đổi bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết để xác định các thân cho phép sự biểu hiện nền chấp nhận được của gen đích khi phối tử không có mặt và các mức biểu hiện chấp nhận được của gen đích khi phối tử này có mặt. Nếu thân này là, ví dụ, quá dài nó có thể cản trở sự tiếp cận với vị trí liên kết U1 snRNP khi có mặt hoặc vắng mặt phối tử. Nếu thân là quá ngắn, nó không thể tạo ra thân ổn định có khả năng cách ly vị trí liên kết U1 snRNP, trong trường hợp đó U1 snRNP sẽ liên kết và ức chế sự polyadenyl hóa của thông tin (dẫn đến sự thoái biến của của mRNA gen đích) khi có mặt hoặc vắng mặt phối tử. Trong một phương án, tổng chiều dài của thân vùng tác động nằm trong khoảng từ 7 cặp bazơ đến khoảng 20 cặp bazơ. Trong một số phương án, chiều dài của thân nằm trong khoảng từ 8 cặp bazơ đến khoảng 11 cặp bazơ. Trong một số phương án, chiều dài của thân là từ 8 cặp bazơ đến 11 cặp bazơ. Ngoài độ dài của thân, hàm lượng cặp bazơ GC của thân có thể được thay đổi để làm biến đổi độ ổn định của thân.

Trong một số phương án, thân vùng tác động chứa một hoặc nhiều nucleotit bị bất cặp nhằm mà không tạo cặp bazơ với phần bổ sung của thân vùng tác động.

Aptame/Phối tử

Trong một phương án, vùng cảm biến chứa aptame. Thuật ngữ “aptame” như được sử dụng ở đây đề cập đến polynucleotit ARN liên kết đặc hiệu với phối tử. Thuật ngữ “phối tử” đề cập đến phân tử được liên kết đặc hiệu bởi aptame. Trong một phương án, phối tử này là phân tử có khối lượng phân tử thấp (nhỏ hơn khoảng 1.000 Dalton) bao gồm, ví dụ, lipid, monosacarit, phân tử truyền tin thứ hai, đồng yếu tố, ion kim loại, các sản phẩm tự

nhiên và các sản phẩm chuyển hóa khác, các axit nucleic, cũng như hầu hết các dược chất. Trong một phương án, phối tử này là polynucleotit có hai hoặc nhiều bazơ nucleotit.

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

Các phối tử aptame cũng có thể là các thành phần nội bào mà gia tăng đáng kể trong các tình trạng sinh lý/bệnh lý cụ thể, như biến nạp gây ung thư – các phối tử này có thể bao gồm các phân tử truyền tin thứ hai như GTP hoặc GDP, canxi; axit béo, hoặc các axit béo bị chuyển hóa nhằm như 13-HODE trong bệnh 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 axit amin; các chất chuyển hóa trong con đường đường phân mà thường có mức nồng độ cao hơn trong tế bào ung thư hoặc trong tế bào bình thường ở các bệnh chuyển hóa; và các phân tử liên quan đến bệnh ung thư như Ras hoặc protein Ras đột biến, EGFR đột biến ở bệnh ung thư phổi, indoleamin-2,3-dioxygenaza (IDO) ở nhiều loại bệnh ung thư. Các phối tử nội sinh bao gồm các chất chuyển hóa progesteron ở bệnh ung thư vú như được mô tả 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 có mức nồng độ tăng do các đột biến trong các enzym chuyển hóa chính ở bệnh ung thư thận như lactat, glutathion, kynurenin như được mô tả bởi Minton, DR and Nanus, DM (Nature Reviews, Urology, Vol. 12, 2005, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Các aptame có vùng liên kết có khả năng tạo ra các phức hợp với phân tử đích dự kiến (nghĩa là, phối tử). Tính đặc hiệu của liên kết này có thể được xác định về hằng số phân ly tương đối (K_d) của aptame với phối tử của nó so với hằng số phân ly của aptame với các phân tử không liên quan. Do đó, phối tử là phân tử liên kết với aptame với ái lực lớn hơn so với phân tử không liên quan. Thông thường, K_d cho aptame với phối tử của nó nhỏ hơn ít nhất là khoảng 10 lần so với K_d cho aptame với phân tử không liên quan. Trong các phương án khác, K_d nhỏ hơn ít nhất là khoảng 20 lần, nhỏ hơn ít nhất là khoảng 50 lần, nhỏ hơn ít nhất là khoảng 100 lần, và nhỏ hơn ít nhất là khoảng 200 lần. Aptame

thường có độ dài nằm trong khoảng từ 15 đến khoảng 200 nucleotit. Thông thường hơn, aptame có độ dài nằm trong khoảng từ 30 đến khoảng 100 nucleotit.

Aptame mà có thể được đưa vào làm một phần của công tắc ribo có thể là aptame xuất hiện tự nhiên, hoặc các biến thể của chúng, hoặc các aptame được thiết kế từ đầu và/hoặc được sàng lọc qua quá trình tiến hóa hệ thống của các phối tử bằng cách làm giàu theo hàm số mũ (SELEX) hoặc phương pháp sàng lọc khác. Ví dụ về các aptame liên kết với các phối tử phân tử nhỏ bao gồm, nhưng không giới hạn ở theophyllin, dopamin, sulforhodamine B, cellobiose, kanamycin A, lividomycin, tobramycin, neomycin B, viomycin, chloramphenicol, streptomycin, xytokin, các phân tử bề mặt tế bào, và các chất chuyển hóa. Để xem lại về các aptame nhận biết các phân tử nhỏ, *xem, ví dụ*, Famulok, Science 9:324-9 (1999) và McKeague, M. & DeRosa, M.C. J. Nuc. Ac. 2012 (cả hai tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Trong một phương án khác, aptame này là polynucleotit bổ sung.

Các phương pháp nhận diện aptame/phối tử

Trong một phương án, aptame này được thiết kế để liên kết với một phối tử phân tử nhỏ cụ thể. Các phương pháp thiết kế và chọn lọc aptame liên kết với các phối tử cụ thể được mô tả trong 62/370,599, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các phương pháp khác để sàng lọc aptame bao gồm, ví dụ, SELEX. Các phương pháp thiết kế aptame liên kết chọn lọc với phân tử nhỏ bằng cách sử dụng SELEX được mô tả trong, ví dụ, Patent Mỹ số 5,475,096, 5,270,163, và Abdullah Ozer, et al. Nuc. Ac. 2014, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các biến đổi của quá trình SELEX được mô tả trong Patent Mỹ số 5,580,737 và 5,567,588, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các kỹ thuật chọn lọc để nhận diện các aptame thường bao gồm tạo ra nguồn lớn gồm các phân tử ADN hoặc ARN có độ dài mong muốn chứa vùng được ngẫu nhiên hóa hoặc được gây đột biến. Ví dụ, nguồn oligonucleotit để chọn lọc aptame có thể chứa vùng bao gồm 20-100 nucleotit được ngẫu nhiên hóa được gắn bên sườn bởi các vùng có trình tự xác định dài khoảng 15-25 nucleotit và hữu ích cho sự liên kết của các đoạn môi PCR. Nguồn oligonucleotit được khuếch đại bằng cách sử dụng các kỹ thuật PCR chuẩn, hoặc các phương pháp khác cho phép khuếch đại các trình tự axit nucleic đã chọn. Nguồn ADN này có thể được sao chép *in vitro* để tạo ra nguồn bản sao ARN khi aptame ARN được mong muốn. Sau đó nguồn oligonucleotit ARN hoặc ADN được đưa vào quá trình chọn

lọc dựa vào khả năng liên kết đặc hiệu với phối tử mong muốn của chúng. Các kỹ thuật chọn lọc bao gồm, ví dụ, kỹ thuật sắc ký ái lực, mặc dù quy trình bất kỳ cho phép chọn lọc các axit nucleic dựa vào khả năng liên kết đặc hiệu với một phân tử khác của chúng có thể được sử dụng. Các kỹ thuật chọn lọc để nhận diện các aptame liên kết với các phân tử nhỏ và hoạt động trong tế bào có thể bao gồm các phương pháp sàng lọc dựa vào tế bào. Trong trường hợp sắc ký ái lực, oligonucleotit được tiếp xúc với phối tử đích đã được bất động trên chất nền trong cột hoặc trên các hạt từ. Tốt hơn, nếu oligonucleotit này được chọn lọc để liên kết với phối tử khi có mặt các nồng độ muối, nhiệt độ, và các điều kiện khác mà mô phỏng các điều kiện sinh lý bình thường. Oligonucleotit trong nguồn mà liên kết với phối tử được giữ lại trên cột hoặc hạt này, và các trình tự không liên kết được rửa đi. Sau đó các oligonucleotit đã liên kết với phối tử được khuếch đại (sau khi phiên mã đảo nếu các bản sao ARN được sử dụng) bằng kỹ thuật PCR (thường là sau khi rửa giải). Quy trình chọn lọc này được lặp lại trên các trình tự đã được lựa chọn với tổng số từ khoảng ba đến mười vòng lặp lại của quy trình chọn lọc. Sau đó các oligonucleotit thu được được khuếch đại, tách dòng, và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình chuẩn để nhận diện các trình tự của các oligonucleotit có khả năng liên kết với phối tử đích. Khi trình tự aptame đã được nhận diện, aptame này có thể được tối ưu hóa thêm bằng cách thực hiện các vòng chọn lọc bổ sung bắt đầu từ nguồn oligonucleotit chứa trình tự aptame được gây đột biến.

Kỹ thuật sàng lọc aptame *in vivo* có thể được sử dụng sau một hoặc nhiều vòng sàng lọc *in vitro* (ví dụ, SELEX). Ví dụ, König, J. et al. (RNA. 2007, 13(4):614–622, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) mô tả sự kết hợp SELEX và hệ thống lai ba ở nấm men để chọn lọc aptame trên *in vivo*.

Gen đích

Caxet điều hòa gen theo sáng chế là thiết kế có thể được sử dụng để điều hòa sự biểu hiện của gen đích bất kỳ mà có thể được biểu hiện trong tế bào đích, mô hoặc sinh vật đích. Thuật ngữ “gen đích” đề cập đến polynucleotit được đưa vào trong tế bào và có khả năng được sao chép thành ARN và được dịch mã và/hoặc được biểu hiện trong các điều kiện thích hợp. Ngoài ra, gen đích là nội sinh với tế bào đích và caxet điều hòa gen theo sáng chế được đặt trong gen đích này (ví dụ, trong 5' hoặc 3' UTR của gen đích nội sinh). Ví dụ về gen đích là polynucleotit mã hóa polypeptit điều trị. Trong một phương án khác, gen đích này mã hóa ARN như miARN, rARN, ARN không mã hóa nhỏ hoặc dài, ARN

kẹp tóc ngắn (shARN) và các ARN điều hòa khác bất kỳ. Trong một phương án, gen đích là ngoại sinh với tế bào mà trong đó cấu trúc ADN tái tổ hợp cần được sao chép. Trong một phương án, gen đích là nội sinh với tế bào mà trong đó cấu trúc ADN tái tổ hợp cần được sao chép.

Gen đích theo sáng chế có thể là gen mã hóa protein, hoặc trình tự mã hóa ARN không mã hóa protein. Ví dụ, gen đích có thể là gen mã hóa protein cấu trúc, enzym, protein truyền tín hiệu tế bào, protein ty thể, protein ngón tay kẽm, hormon, protein vận chuyển, yếu tố sinh trưởng, xytokin, protein nội bào, protein ngoại bào, protein xuyên màng, protein tế bào chất, protein nhân, protein thụ thể, protein liên kết ARN, protein liên kết ADN, yếu tố phiên mã, bộ máy dịch mã, protein kênh, protein vận động, phân tử kết dính tế bào, protein ty thể, enzym chuyển hóa, kinaza, phosphataza, các yếu tố trao đổi, protein chaperon, và các yếu tố điều biến của bất kỳ trong số chúng. Trong nhiều phương án, gen đích này mã hóa erythropoietin (Epo), hormon tăng trưởng người (hGH), các nucleaza tác động tương tự yếu tố hoạt hóa phiên mã (TALEN), insulin người, protein liên hợp CRISPR 9 (cas9), hoặc globulin miễn dịch (hoặc một phần của nó), bao gồm, ví dụ, kháng thể điều trị.

Cấu trúc biểu hiện

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng vector tái tổ hợp để đưa vào tế bào đích polynucleotit mã hóa gen đích và chứa casset điều hòa gen được mô tả ở đây. Trong nhiều phương án, cấu trúc ADN tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm các yếu tố ADN bổ sung bao gồm các đoạn ADN chuẩn bị cho sự sao chép của ADN trong tế bào chủ và sự biểu hiện của gen đích trong tế bào đó ở các mức thích hợp. Người có hiểu biết trung bình hiểu rõ là các trình tự kiểm soát biểu hiện (trình tự khởi động, trình tự tăng cường, và tương tự) được lựa chọn dựa vào khả năng tăng cường sự biểu hiện của gen đích trong tế bào đích của nó. “Vector” có nghĩa là plasmit tái tổ hợp, nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (YAC), nhiễm sắc thể mini, dẫn xuất plasmit vòng nhỏ ADN hoặc virus (chứa trình tự thu được từ virus) mà chứa polynucleotit cần được phân phối vào tế bào chủ, *in vitro* hoặc *in vivo*. Trong một phương án, vector tái tổ hợp này là vector virus hoặc tổ hợp của nhiều vector virus.

Các vector virus để biểu hiện gen đích qua trung gian aptame trong tế bào đích, mô hoặc sinh vật đích đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm các vector

adenovirut (AV), vector virut liên hợp adeno (AAV), vector retrovirut và vector lentivirut, và các vector Herpes simplex typ 1 (HSV1).

Các vector adenovirut bao gồm, ví dụ, các vector dựa trên adenovirut người typ 2 và adenovirut người typ 5 mà đã bị làm cho khiếm khuyết về khả năng sao chép do các đột biến mất đoạn ở các vùng E1 và E3. Caxet phiên mã này có thể được gắn xen vào vùng E1, tạo ra vector AV bị mất đoạn E1/E3 tái tổ hợp. Các vector adenovirut còn bao gồm vector adenovirut hiệu năng cao phụ thuộc trợ giúp (còn được gọi là vector hiệu năng cao, "yếu" hoặc "phá hủy bên trong"), mà không chứa các trình tự mã hóa virut. Các vector này, chứa các yếu tố tác động cis cần thiết cho sự đóng gói và sao chép ADN virut, chủ yếu là các trình tự lặp đoạn cuối ngược chiều (ITR) và tín hiệu đóng gói (Ψ). Bộ gen vector AV phụ thuộc trợ giúp này có khả năng mang từ vài trăm cặp bazơ đến xấp xỉ 36 kb ADN ngoại lai.

Các vector virut liên hợp adeno tái tổ hợp "rAAV" bao gồm vector bất kỳ thu được từ typ huyết thanh virut liên hợp adeno bất kỳ, bao gồm, không giới hạn ở, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-7 và AAV-8, AAV-9, AAV-10, và tương tự. Các vector rAAV có thể có một hoặc nhiều gen kiểu hoang AAV bị mất đoạn toàn bộ hoặc một phần, tốt hơn là các gen Rep và/hoặc Cap, nhưng vẫn giữ được các trình tự ITR chức năng bên sườn. Các trình tự ITR chức năng được giữ lại để phục hồi, sao chép, đóng gói và tích hợp vào nhiễm sắc thể tiềm năng của bộ gen AAV. Các ITR không cần phải là các trình tự nucleotit kiểu hoang, và có thể được biến đổi (ví dụ, bằng cách gắn xen, làm mất đoạn, hoặc thay thế nucleotit) miễn là các trình tự này giúp phục hồi chức năng, sao chép và đóng gói.

Ngoài ra, các hệ thống khác như vector lentivirut có thể được sử dụng trong nhiều phương án theo sáng chế. Các hệ thống dựa trên lentivirut có thể gây biến nạp các tế bào không phân chia cũng như các tế bào phân chia làm cho chúng trở nên hữu ích cho các ứng dụng gắn đích, ví dụ, các tế bào không phân chia của CNS. Các vector lentivirut thu được từ virut gây suy giảm miễn dịch ở người và, tương tự virut đó, tích hợp vào bộ gen chủ tạo ra khả năng biểu hiện gen dài hạn.

Polynucleotit, bao gồm các plasmit, YAC, nhiễm sắc thể mini và các dẫn xuất plasmit vòng nhỏ, mang gen đích chứa caxet điều hòa gen cũng có thể được đưa vào tế bào hoặc sinh vật bằng các hệ thống vector không phải virut sử dụng, ví dụ, lipit cation hóa,

polyme, hoặc cả hai dưới dạng chất mang. Các hệ thống polyme poly-L-lysin (PLL) và polyme polyetylenimin (PEI) liên hợp cũng có thể được sử dụng để phân phối vector này vào tế bào. Các phương pháp khác để phân phối vector này vào tế bào bao gồm kỹ thuật tiêm thủy động học và phương pháp xung điện và sử dụng siêu âm, cho cả môi trường nuôi cấy tế bào và cho các sinh vật. Để xem lại về các hệ phân phối virus và không phải virus để phân phối gen xem Nayerossadat, N. et al. (Adv Biomed Res. 2012; 1:27; được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Phương pháp điều hòa sự biểu hiện gen đích

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều hòa sự biểu hiện của gen đích (ví dụ, gen điều trị), bằng cách (a) gắn xen caxet điều hòa gen theo sáng chế vào 3' UTR của gen đích; (b) đưa gen đích chứa caxet điều hòa gen vào trong tế bào; và (c) cho tế bào tiếp xúc với phối tử liên kết với aptame. Trong một phương án, phối tử này là phân tử nhỏ. Theo nhiều khía cạnh, sự biểu hiện của gen đích trong các tế bào đích tạo ra đặc điểm mong muốn cho tế bào mà trong đó nó được đưa vào, hoặc theo cách khác, dẫn đến hiệu quả điều trị mong muốn.

Trong một phương án, một hoặc nhiều caxet điều hòa gen được gắn xen vào vùng 3' không dịch mã của gen đích. Trong một phương án, một caxet điều hòa gen duy nhất được gắn xen vào 3' UTR của gen đích. Trong các phương án khác 2, 3, 4, hoặc nhiều caxet điều hòa gen được gắn xen vào gen đích. Trong một phương án, hai caxet điều hòa gen được gắn xen vào gen đích. Khi nhiều caxet điều hòa gen được gắn xen vào gen đích, chúng có thể chứa cùng một aptame sao cho một phối tử duy nhất có thể được sử dụng để điều hòa sự phân cắt ribonucleaza của nhiều caxet này và do đó điều hòa sự biểu hiện gen đích. Trong các phương án khác, nhiều caxet điều hòa gen được gắn xen vào gen đích, mỗi caxet này có thể chứa một aptame khác nhau do đó sự tiếp xúc với nhiều phối tử phân tử nhỏ khác nhau điều hòa sự biểu hiện gen đích. Trong các phương án khác, nhiều caxet điều hòa gen được gắn xen vào gen đích, mỗi caxet này chứa nhiều trình tự cơ chất ribonucleaza khác nhau. Điều này có thể là hữu ích trong việc làm giảm sự tái tổ hợp và cải thiện tính dễ dàng kết hợp vào các vector virus.

Caxet polynucleotit theo sáng chế là hữu hiệu trong việc điều hòa sự biểu hiện gen đích khi caxet polynucleotit này được đặt vào 3' UTR của gen đích ở vị trí bất kỳ ngược dòng (5') của tín hiệu polyadenyl hóa (ví dụ, AATAAA). Caxet polynucleotit cũng là hữu

hiệu trong việc điều hòa sự biểu hiện gen đích bằng cách cản trở quá trình polyadenyl hóa khi nhiều trình tự tín hiệu poly(A) khác nhau có mặt, ví dụ, các tín hiệu poly(A) sớm SV40 so với muộn SV40 (*xem, ví dụ, các ví dụ 4-6, 8*). Trong một phương án, ít nhất một caxet polynucleotit theo sáng chế được gắn xen vào vị trí khoảng 87 hoặc khoảng 140 nucleotit 5' của trình tự polyadenyl hóa. Trong một phương án, caxet polynucleotit theo sáng chế được gắn xen ở, hoặc gần, cả hai vị trí. Trong các phương án khác, caxet polynucleotit được gắn xen vào một hoặc nhiều vị trí trong số các vị trí khoảng 74, khoảng 110, hoặc khoảng 149 nucleotit 5' của tín hiệu polyadenyl hóa.

Caxet 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. Trong một phương án, caxet polynucleotit theo sáng chế được sử dụng kết hợp với caxet điều hòa gen mà điều hòa sự biểu hiện gen đích bằng cách điều hòa sự cắt nối có chọn lọc qua trung gian aptame như được mô tả trong WO 2016/126747, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Phương pháp điều trị và các dược phẩm

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất phương pháp điều hòa mức nồng độ protein điều trị được phân phối bằng liệu pháp gen. Trong phương án này, “gen đích” có thể mã hóa protein điều trị. “Gen đích” này có thể mã hóa protein mà là nội sinh hoặc ngoại sinh với tế bào này.

Trình tự gen điều trị chứa caxet điều hòa với công tắc ribo được điều khiển bằng aptame được phân phối đến tế bào đích *in vitro* hoặc *ex vivo*, ví dụ, bằng vector. Tính đặc hiệu tế bào của “gen đích” có thể được kiểm soát bằng trình tự khởi động hoặc các yếu tố khác trong vector này. Việc phân phối cấu trúc vector chứa gen đích và caxet polynucleotit, và sự chuyển nạp của các mô đích gây ra sự chuyển nạp ổn định của gen đích được điều hòa, thường là bước thứ nhất trong quá trình sản sinh protein điều trị.

Tuy nhiên, do sự có mặt của caxet điều hòa trong trình tự gen đích, gen đích này không được biểu hiện ở mức độ đáng kể, nghĩa là, nó ở "trạng thái tắt" khi vắng mặt phối tử đặc hiệu liên kết với aptame nằm trong công tắc ribo của caxet điều hòa này. Chỉ khi phối tử đặc hiệu aptame được sử dụng (hoặc theo cách khác có mặt với lượng đủ) sự biểu hiện gen đích mới được hoạt hóa.

Việc phân phối cấu trúc vector chứa gen đích và việc phân phối phối tử hoạt hóa thường được tách riêng về mặt thời gian. Việc phân phối phối tử hoạt hóa sẽ kiểm soát khi

nào gen đích được biểu hiện, cũng như mức độ biểu hiện protein. Phôi tử này có thể được phân phối bằng nhiều đường bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đường miệng, trong cơ (IM), trong tĩnh mạch (IV), trong mắt, hoặc khu trú.

Việc xác định thời gian phân phối phôi tử sẽ phụ thuộc vào yêu cầu hoạt hóa của gen đích. Ví dụ, nếu protein điều trị được mã hóa bởi gen đích được đòi hỏi hằng định, phôi tử phân tử nhỏ sử dụng bằng đường miệng có thể được phân phối hàng ngày, hoặc nhiều lần một ngày, để đảm bảo sự hoạt hóa liên tục gen đích, và do đó đảm bảo sự biểu hiện liên tục của protein điều trị này. Nếu gen đích có tác dụng kéo dài, phôi tử cảm ứng có thể được sử dụng với liều ít thường xuyên hơn.

Sáng chế cho phép sự biểu hiện gen chuyển điều trị được kiểm soát theo thời gian, theo cách được quyết định bởi việc sử dụng liều theo thời gian của phôi tử đặc hiệu với aptame trong công tắc ribo của caxet polynucleotit điều hòa. Sự biểu hiện gen chuyển điều trị được tăng cường chỉ khi sử dụng phôi tử, làm tăng tính an toàn của việc điều trị bằng liệu pháp gen bằng cách cho phép gen đích bị tắt khi vắng mặt phôi tử.

Nhiều aptame khác nhau có thể được sử dụng để cho phép nhiều phôi tử khác nhau hoạt hóa nhiều gen đích. Trong một số phương án của sáng chế, mỗi gen điều trị chứa caxet điều hòa sẽ có aptame đặc hiệu nằm trong caxet này mà sẽ được hoạt hóa bằng phân tử nhỏ đặc hiệu. Điều này có nghĩa là mỗi gen điều trị có thể được hoạt hóa chỉ bằng phôi tử đặc hiệu với aptame nằm bên trong nó. Trong các phương án này, mỗi phôi tử sẽ chỉ hoạt hóa một gen điều trị. Điều này cho phép khả năng là một số "gen đích" khác nhau có thể được phân phối đến một cá thể và mỗi gen đích này sẽ được hoạt hóa khi phân phối phôi tử đặc hiệu đối với aptame chứa trong caxet điều hòa nằm trong mỗi gen đích này.

Sáng chế cho phép protein điều trị bất kỳ, mà gen của nó có thể được phân phối vào cơ thể (như erythropoietin (EPO) hoặc kháng thể điều trị), được sản sinh bởi cơ thể khi phôi tử hoạt hóa được phân phối. Phương pháp phân phối protein điều trị này có thể thay thế quy trình sản xuất các protein điều trị này bên ngoài cơ thể mà sau đó được tiêm hoặc truyền, ví dụ, các kháng thể được sử dụng trong bệnh ung thư hoặc để ức chế bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn. Cơ thể mang gen đích đã được điều hòa trở thành nhà máy sản xuất sinh học, mà được bật lên khi phôi tử đặc hiệu gen được sử dụng.

Mức sử dụng liều và thời gian sử dụng liều của protein điều trị có thể là quan trọng đối với tác dụng điều trị. Ví dụ, khi phân phối AVASTIN (kháng thể kháng VEGF) cho

bệnh ung thư. Sáng chế làm tăng tính dễ dàng của việc sử dụng liệu đáp ứng với việc theo dõi mức protein điều trị và tác dụng của protein điều trị.

Trong một phương án, gen đích này có thể mã hóa nucleaza mà có thể gắn đích và biên tập trình tự ADN cụ thể. Các nucleaza này bao gồm Cas9, nucleaza chứa ngón tay kềm, hoặc TALEN. Trong trường hợp của các nucleaza này, protein nucleaza có thể được yêu cầu chỉ trong khoảng thời gian ngắn đủ để biên tập các gen đích nội sinh. Tuy nhiên, nếu gen nucleaza không được điều hòa được phân phối vào cơ thể, protein này có thể tồn tại trong suốt thời gian sống còn lại của tế bào. Trong trường hợp của các nucleaza, nguy cơ biên tập nhằm đích càng tăng khi nucleaza này tồn tại càng lâu dài. Việc điều hòa sự biểu hiện của các protein này có ưu điểm là rất an toàn. Trong trường hợp này, vectơ chứa gen đích nucleaza mang caxet điều hòa có thể được phân phối đến tế bào thích hợp trong cơ thể. Gen đích này là ở trạng thái “tắt” khi vắng mặt phối tử đặc hiệu caxet, do đó không có nucleaza nào được sản sinh ra. Chỉ khi phối tử hoạt hóa được sử dụng, nucleaza này mới được sản sinh. Khi thời gian trôi qua đủ để cho phép việc biên tập đầy đủ xảy ra, phối tử này sẽ bị thu hồi và không được sử dụng lại. Do đó, sau đó gen nucleaza là ở trạng thái “tắt” và không có nucleaza nào được sản xuất thêm và việc biên tập dừng lại. Phương pháp này có thể được sử dụng để sửa chữa các tình trạng di truyền, bao gồm nhiều bệnh vớng mắc di truyền như LCA10 bị gây ra bởi các đột biến trong CEP290 và bệnh Stargardt bị gây ra bởi các đột biến trong ABCA4.

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

Nhiều loại gen đích đặc hiệu khác nhau, cho phép điều trị nhiều loại bệnh và tình trạng cụ thể khác nhau, là thích hợp để sử dụng trong sáng chế. Ví dụ, insulin hoặc chất tương tự insulin (tốt hơn, nếu là insulin người hoặc chất tương tự insulin người) có thể được sử dụng làm gen đích để điều trị bệnh đái tháo đường typ I, bệnh đái tháo đường typ II, hoặc hội chứng chuyển hóa; hormon tăng trưởng người có thể được sử dụng làm gen

đích để điều trị cho trẻ em mắc các rối loạn tăng trưởng hoặc người trưởng thành bị thiếu hormon tăng trưởng; erythropoietin (tốt hơn, là erythropoietin người) có thể được sử dụng làm gen đích để điều trị chứng thiếu máu do bệnh thận mãn tính, chứng thiếu máu do rối loạn sinh tủy, hoặc chứng thiếu máu do hóa trị liệu ung thư.

Sáng chế có thể là đặc biệt thích hợp để điều trị các bệnh bị gây ra bởi các khiếm khuyết đơn gen như bệnh xơ hóa nang, bệnh rối loạn đông máu, bệnh loạn dưỡng cơ, bệnh tan máu bẩm sinh, hoặc bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm. Do đó, β -, γ -, δ -, hoặc ζ -globin người có thể được sử dụng làm gen đích để điều trị bệnh tan máu β hoặc chứng thiếu máu hồng cầu hình liềm; Yếu tố VIII hoặc Yếu tố IX của người có thể được sử dụng làm gen đích để điều trị bệnh rối loạn đông máu A hoặc bệnh rối loạn đông máu B.

Các phôi tử được sử dụng trong sáng chế thường được kết hợp với một hoặc nhiều chất mang được dùng để tạo thành được phẩm thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân. Các chất mang được dùng bao gồm dung môi, tá dược dính, chất pha loãng, tá dược rã, tá dược trơn, môi trường phân tán, màng bao, chất chống vi khuẩn và chống nấm, chất đẳng trương và làm chậm hấp thu, và các chất tương tự, thường được sử dụng trong lĩnh vực dược phẩm. Các dược phẩm có thể ở dạng viên nén, viên tròn, viên nang, viên ngậm dẹt, và tương tự, và được bào chế để tương thích với đường sử dụng dự kiến của chúng. Ví dụ về các đường sử dụng bao gồm ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, trong tĩnh mạch, trong da, trong mũi, dưới da, trong miệng, xông hít, qua da (khu trú), qua niêm mạc, và trực tràng.

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

Các dược phẩm có thể được sử dụng một lần mỗi ngày hoặc nhiều lần mỗi ngày (ví dụ, 2, 3, 4, 5, hoặc nhiều lần mỗi ngày). Ngoài ra, các dược phẩm có thể được sử dụng ít thường xuyên hơn một lần mỗi ngày, ví dụ, một lần mỗi 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, hoặc 14 ngày, hoặc một lần một tháng hoặc một lần mỗi vài tháng. Trong một số phương án của sáng chế, các dược phẩm có thể được sử dụng cho bệnh nhân chỉ với số lần nhỏ, ví dụ, một lần, hai lần, ba lần, v.v...

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho bệnh nhân cần sự biểu hiện tăng cường của protein điều trị được mã hóa bởi gen đích, phương pháp này bao gồm sử dụng cho bệnh nhân được phẩm chứa phối tử cho aptame, trong đó bệnh nhân này đã được sử dụng trước đó ADN tái tổ hợp chứa gen đích, trong đó gen đích này chứa caxet điều hòa gen theo sáng chế tạo ra khả năng điều hòa sự biểu hiện của gen đích bởi phối tử của aptame bằng cách cắt nối có chọn lọc tiền mARN của gen đích, nhờ đó làm tăng sự biểu hiện của protein điều trị.

Sản phẩm của quá trình sản xuất và kit

Cũng được đề xuất là các kit hoặc sản phẩm của quá trình sản xuất để sử dụng trong các phương pháp được mô tả ở đây. Theo các khía cạnh, các kit chứa các chế phẩm được mô tả ở đây (ví dụ, các chế phẩm để phân phối vector chứa gen đích mang caxet điều hòa gen) trong đồ bao gói thích hợp. Đồ bao gói thích hợp cho các chế phẩm (như các chế phẩm dùng cho mắt để tiêm) được mô tả ở đây đã được biết đến trong lĩnh vực này, và bao gồm, ví dụ, các lọ nhỏ (như các lọ nhỏ kín), bình, ống tiêm, chai, lọ, đồ bao gói dẻo (ví dụ, túi Mylar hoặc nhựa kín), và tương tự. Các sản phẩm của quá trình sản xuất có thể còn được tiệt trùng và/hoặc bịt kín.

Sáng chế cũng đề xuất kit chứa các chế phẩm được mô tả ở đây và có thể bao gồm thêm (các) hướng dẫn về các phương pháp sử dụng chế phẩm này, như các ứng dụng đã mô tả ở đây. Các kit được mô tả ở đây có thể bao gồm thêm các nguyên liệu khác có thể được mong muốn về phương diện thương mại và người sử dụng, bao gồm các dung dịch đệm, chất pha loãng khác, thiết bị lọc, kim tiêm, xylanh và tờ hướng dẫn sử dụng với các hướng dẫn để thực hiện việc sử dụng, bao gồm ví dụ, các phương pháp bất kỳ được mô tả ở đây. Ví dụ, trong một số phương án, kit này chứa rAAV để biểu hiện gen đích chứa caxet điều hòa gen theo sáng chế, chất mang được dụng thích hợp để tiêm, và một hoặc nhiều trong số: dung dịch đệm, chất pha loãng, thiết bị lọc, kim tiêm, xylanh, và tờ hướng dẫn sử dụng với các hướng dẫn để thực hiện việc tiêm. Trong một số phương án, kit này là thích hợp để tiêm trong ổ mắt, tiêm trong cơ, tiêm trong tĩnh mạch và tương tự.

“Sự tương đồng” và “tương đồng” như được sử dụng ở đây đề cập đến tỉ lệ phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự polynucleotit hoặc giữa hai trình tự polypeptit. Sự tương ứng giữa một trình tự với một trình tự khác có thể được xác định bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, sự tương đồng có thể được xác định bằng cách so sánh trực tiếp

hai phân tử polypeptit bằng cách sắp xếp thẳng hàng thông tin trình tự và sử dụng các chương trình máy tính dễ dàng sẵn có. Hai trình tự polynucleotit hoặc hai trình tự polypeptit là "gần như tương đồng" với nhau nếu, sau khi được sắp xếp thẳng hàng tối ưu với các gắn xen hoặc mất đoạn thích hợp, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, và ít nhất khoảng 95% nucleotit hoặc axit amin, tương ứng, bắt cặp trên độ dài xác định của các phân tử này, như được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp trên đây.

“Tỉ lệ phần trăm đồng nhất trình tự” đối với trình tự polypeptit hoặc axit nucleic tham chiếu được xác định là tỉ lệ phần trăm các gốc axit amin hoặc nucleotit trong trình tự ứng viên là giống với các gốc axit amin hoặc nucleotit trong trình tự polypeptit hoặc axit nucleic tham chiếu, sau khi sắp xếp thẳng hàng các trình tự này và đưa vào các khoảng trống, nếu cần, để đạt được tỉ lệ phần trăm đồng nhất trình tự tối đa. Việc sắp xếp thẳng hàng nhằm mục đích xác định tỉ lệ phần trăm đồng nhất trình tự axit amin hoặc axit nucleic có thể đạt được theo nhiều cách đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách sử dụng chương trình phần mềm máy tính sẵn có công khai bao gồm phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR).

Thuật ngữ "polynucleotit" hoặc "axit nucleic" như được sử dụng ở đây đề cập đến dạng polyme của nucleotit có độ dài bất kỳ, cả ribonucleotit hoặc deoxyribonucleotit. Do đó, thuật ngữ này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ARN hoặc ADN chuỗi đơn, chuỗi kép hoặc nhiều chuỗi, ADN bộ gen, cADN, thể lai ADN-ARN, hoặc polyme chứa bazơ purin và pyrimidin, hoặc các bazơ nucleotit tự nhiên, được biến đổi hóa học hoặc hóa sinh, không tự nhiên, hoặc được tạo dẫn xuất khác.

“Khác loại” hoặc “ngoại sinh” có nghĩa là thu được từ thực thể khác biệt về kiểu gen so với phần còn lại của thực thể mà nó được so sánh với hoặc trong đó nó được đưa vào hoặc được kết hợp vào. Ví dụ, một polynucleotit được đưa bằng các kỹ thuật thao tác di truyền vào một loại tế bào khác là polynucleotit khác loại (và, khi được biểu hiện, có thể mã hóa polypeptit khác loại). Tương tự, trình tự tế bào (ví dụ, gen hoặc một phần của nó) mà được đưa vào vector virus là trình tự nucleotit khác loại đối với vector này.

Bảng dưới đây chứa danh mục các trình tự ADN của các cấu trúc được mô tả ở đây cũng như các trình tự khác như đã mô tả. Vị trí liên kết U1 và trình tự đột biến của nó được thể hiện bằng các chữ cái in thường được bôi đậm màu xám; cấu trúc vòng thân (SL) được thể hiện bằng các chữ cái in thường được gạch chân; các trình tự aptame được thể hiện

bằng các chữ cái in thường được gạch chân bằng đường lượn sóng; trình tự tín hiệu poly(A) được thể hiện bằng các chữ cái in thường được gạch chân nét to, và các trình tự mã hóa các gen luciferaza được thể hiện bằng các chữ cái in hoa.

SEQ ID NO.:	Mô tả	Trình tự
1	Vị trí liên kết U1 liên ứng	CAGGTAAGTA
2	Vị trí liên kết U1 liên ứng	CATGGAACTA
3	U1-87 wt trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcgccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaggttaagtacaactagaatgcagtgaaaaaatg ctttattgtgaaatttgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaata aacaagttaacaacaac
4	U1-87 mut trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcgccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccatggaactacaactagaatgcagtgaaaaaatg ctttattgtgaaatttgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaata aacaagttaacaacaac
5	U1-140 wt trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagacaggttaagtacggccgcttcgagcagacatg ataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaa atgctttattgtgaaatttgatgctattgctttattgttaaccattataagctgca ataaacaagttaacaacaac
6	U1-140 mut trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagacatggaactagcgccgcttcgagcagacatg ataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaa atgctttattgtgaaatttgatgctattgctttattgttaaccattataagctgca ataaacaagttaacaacaac
7	2xU1-140 wt trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagacaggttaagtaaccaaacaggttaagtacggcc gcttcgagcagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaacta gaatgcagtgaaaaaatgctttattgtgaaatttgatgctattgctttattgt aaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaac
8	2xU1-140 mut trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagacatggaactaaccaaacatggaactagcgcc gcttcgagcagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaacta gaatgcagtgaaaaaatgctttattgtgaaatttgatgctattgctttattgt aaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaac
9	3xU1-140 wt trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagacaggttaagtaaccaaacaggttaagtaacaaa caggttaagtacggccgcttcgagcagacatgataagatacattgatgagttt ggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgtgaaatttgat gatgctattgctttattgttaaccattataagctgcAATAAAcaagttaaca acaac

SEQ ID NO.:	Mô tả	Trình tự
10	3xU1_140 mut trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagacatggaactaaccaacatggaactaacaaa catggaactagcggccgcttcgagcagacatgataagatacattgatgagttt ggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaattgt gatgctattgctttatttgaaccattataagctgcAATAAAcaagttaaca acaac
11	87-9 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaggtaagtaactagaatgcagtgaaaaaaatgc tttatttgtgaaattgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataa acaagttaacaacaac
12	87-8 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaggtaagcaactagaatgcagtgaaaaaaatgct ttatttgtgaaattgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaa caagttaacaacaac
13	87-7 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaggtaacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctt tatttgtgaaattgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaa caagttaacaacaac
14	87-6 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaggtaacaactagaatgcagtgaaaaaaatgcttt atttgtgaaattgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaac aagttaacaacaac
15	87-5 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaggtaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttat ttgtgaaattgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaa gtaacaacaac
16	U1 87-9 SL trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccacccaggtaagttaccgaaaggtaacttacct gggcaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaattgtgatgctat gctttatttgaaccattataagctgcaataaaccaagttaacaacaac
17	U1 87-9 SL gây trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccacccaggtaagttaccgaaaaaaacaaca aaaacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaattgtgatgctat tgctttatttgaaccattataagctgcaataaaccaagttaacaacaac
18	U1 theo_1 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccacccaggtaagttaccggcgataccagccga

SEQ ID NO.:	Mô tả	Trình tự
		<u>aaggcccttggcagcgtcggttaacttacctgggcaactagaatgcagtgaaa</u> aaaatgctttattgtgaaatttgatgctattgctttatttgaaccattataagct <u>gcaataa</u> caagttaacaacaac
19	U1_theo_2 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaa <u>accaggttaagttacggcgataccagccgaa</u> <u>aggcccttggcagcgtcgtaacttacctgggcaactagaatgcagtgaaaaa</u> aatgctttattgtgaaatttgatgctattgctttatttgaaccattataagctgc <u>aataa</u> caagttaacaacaac
20	U1_theo_3 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaa <u>accaggttaagttacggcgataccagccgaaa</u> <u>ggcccttggcagcgtgtaacttacctgggcaactagaatgcagtgaaaaaaa</u> tgctttattgtgaaatttgatgctattgctttatttgaaccattataagctgca <u>a</u> <u>taaa</u> caagttaacaacaac
21	U1_theo_4 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaa <u>accaggttaagttacggcgataccagccgaaag</u> <u>gcccttggcagcgtgtaacttacctgggcaactagaatgcagtgaaaaaaatgc</u> tttattgtgaaatttgatgctattgctttatttgaaccattataagctgca <u>ataa</u> <u>a</u> caagttaacaacaac
22	U1_theo_5 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaa <u>accaggttaagttacggcgataccagccgaaagg</u> <u>cccttggcagcgtgtaacttacctgggcaactagaatgcagtgaaaaaaatgctt</u> tattgtgaaatttgatgctattgctttatttgaaccattataagctgca <u>ataaa</u> caagttaacaacaac
23	U1_theo_6 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaa <u>accaggttaagttcgataccagccgaaaggc</u> <u>ccttggcagcgaacttacctgggcaactagaatgcagtgaaaaaaatgcttta</u> tttgtgaaatttgatgctattgctttatttgaaccattataagctgca <u>ataaa</u> ca agttaacaacaac
24	U1_theo_7 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaa <u>accaggttaagttgataccagccgaaaggcc</u> <u>cttggcagcaacttacctgggcaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttattt</u> gtgaaatttgatgctattgctttatttgaaccattataagctgca <u>ataaa</u> caag ttaacaacaac
25	U1_theo_8 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaa <u>accaggttaagttgataccagccgaaaggcc</u>

SEQ ID NO.:	Mô tả	Trình tự
		<u>cttggcagcacttacctgggcaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgt</u> <u>gaaattgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagtt</u> <u>aacaacaac</u>
26	U1_theo_9 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataccagccgaaaggccct <u>tggcagacttacctgggcaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgtga</u> <u>aattgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagttaa</u> <u>caacaac</u>
27	U1_theo_8_1 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataccagccgaaaggcc <u>cttggcagcacttacctgggcaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgt</u> <u>gaaattgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagtt</u> <u>aacaacaac</u>
28	U1_theo_8_2 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataccagccgaaaggcc <u>cttggcagcacttacctgaacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgt</u> <u>gaaattgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagtt</u> <u>aacaacaac</u>
29	U1_theo_8_3 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataccagccgaaaggcc <u>cttggcagcacttacctaacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgt</u> <u>gaaattgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagtt</u> <u>aacaacaac</u>
30	U1_theo_8_4 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataccagccgaaaggcc <u>cttggcagcacttaccaaaaacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgt</u> <u>gaaattgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagtt</u> <u>aacaacaac</u>
31	U1_theo_8_5 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataccagccgaaaggcc <u>cttggcagcacttacaaaaacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgt</u> <u>gaaattgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagtt</u> <u>aacaacaac</u>
32	U1_theo_8_6 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataccagccgaaaggcc <u>cttggcagcacttaaaaaacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgt</u> <u>gaaattgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagtt</u> <u>aacaacaac</u>

SEQ ID NO.:	Mô tả	Trình tự
33	U1_theo_8_7 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataaccagccgaaaggcc cttggcagcacttcaaaaaacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgt gaaatttgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagtt aacaacaac
34	U1_theo_8_8 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataaccagccgaaaggcc cttggcagcactacaaaaacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgt tgaaatttgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagtt aacaacaac
35	U1_theo_8_9 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataaccagccgaaaggcc cttggcagcacacaaaaacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattt gtgaaatttgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaag ttaacaacaac
36	U1_theo_9_1 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataaccagccgaaaggccct tggcagacttacctggacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttgtga aatttgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagttaa caacaac
37	U1_theo_9_2 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataaccagccgaaaggccct tggcagacttacctgaacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttgtga aatttgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagttaa caacaac
38	U1_theo_9_3 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataaccagccgaaaggccct tggcagacttacctaacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttgtga aatttgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagttaa caacaac
39	U1_theo_9_4 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcggccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataaccagccgaaaggccct tggcagacttaccaaaacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttgtga aatttgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagttaa caacaac

SEQ ID NO.:	Mô tả	Trình tự
40	U1_theo_9_5 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcgccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataaccagccgaaaggccct tggcagacttacaaaaacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttattgtga aatgtgatgctattgctttattgtaccattataagctgcaataaacaagtta caacaac
41	U1_theo_9_6 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcgccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataaccagccgaaaggccct tggcagacttaaaaaacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttattgtga aatgtgatgctattgctttattgtaccattataagctgcaataaacaagtta caacaac
41	U1_theo_9_7 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcgccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataaccagccgaaaggccct tggcagacttcaaaaaacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttattgtga aatgtgatgctattgctttattgtaccattataagctgcaataaacaagtta caacaac
43	U1_theo_9_8 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcgccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataaccagccgaaaggccct tggcagactacaaaaacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttattgtga aatgtgatgctattgctttattgtaccattataagctgcaataaacaagtta caacaac
44	4xU1_theo_8_1 trong pRL-SV40	TCAAATCGTTCGTTGAGCGAGTTCTCAAAAATG AACAATAAttctagagcgccgcttcgagcagacatgataagatacat tgatgagtttgacaaaccaaaccaggttaagtataaccagccgaaaggcc cttggcagcacttacctggacaactagaatgcagtgaaaaaagagtttgaca aaccaaaccaggttaagtataaccagccgaaaggcccttggcagcacttac ctggacaactagaatgcagtgaaaaaaatgcgagtttgacaaaccaaacc aggttaagtataaccagccgaaaggcccttggcagcacttacctggacaacta gaatgcagtgaaaaaaatgctttattgtgagagtttgacaaaccaaacc ggtaagtataaccagccgaaaggcccttggcagcacttacctggacaactag aatgcagtgaaaaaaatgctttattgtgaaattgtgatgctattgctttattgt accattataagctgcaataaacaagttaacaacaac
45	U1_Gua_1 wt trong pFLuc	TCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCC GTGTAAGccataccacattaaggtaatgtataatcgctggatatggcac gcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacattactgtagagtttac ttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaacataaaatgaatg caattgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaata gcatcacaatttcacaataaagcattttttcactgcattctagttgtggttgtc caaactcatcaatgtatcttaa

SEQ ID NO.:	Mô tả	Trình tự
46	U1_Gua_1 mut trong pFLuc	TCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCC GTGTAAgccataccacattaatggaatctataatcgcggtggatatggcac gcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactagattcctgtagaggttta cttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaat gcaattgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaat agcatcacaaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgt ccaaactcatcaatgtatcttaa
47	U1_Gua_2 wt trong pFLuc	TCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCC GTGTAAgccataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccc acacctaaggtaatgtataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccggg caccgtaaatgtccgactacattacccccctgaacctgaaacataaaatgaat gcaattgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaat agcatcacaaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgt ccaaactcatcaatgtatcttaa
48	U1_Gua_2 mut trong pFLuc	TCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCC GTGTAAgccataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccc acacctaaggaatctataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccggg caccgtaaatgtccgactagattccccctgaacctgaaacataaaatgaat gcaattgtgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaat agcatcacaaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgt ccaaactcatcaatgtatcttaa
49	U1_Gua_3 wt trong pFLuc	TCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCC GTGTAAgccataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccc acacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtaaggtaatgtat aatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgact acattactgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaata gcatcacaaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtc caaactcatcaatgtatcttaa
50	U1_Gua_3 mut trong pFLuc	TCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCC GTGTAAgccataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccc acacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtaatggaatctat aatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgact agattcctgtgttaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaata gcatcacaaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtc caaactcatcaatgtatcttaa
51	wtU1_Gua_HBG PA	TCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCC GTGTAAgcatccaagcttatcgataccgtcgacctcgaggtaattgtataa tcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactac attacggcccagatctaattcacccaccagtgcaggctgcctatcagaaagt gggtggctggtgtggctaattgccctggcccacaagtactactaagctcgtttct tgctgtccaatttctattaaaggttcctttgttcctaagtccaactactaaactgg gggatattatgaaggcccttgagcatctggattctgcctaataaaaaacatttat tttcattgcaatgatgtattt
52	mutU1_Gua_HB GPA	TCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCC GTGTAAgcatccaagcttatcgataccgtcgacctcgatggaatctataa

SEQ ID NO.:	Mô tả	Trình tự
		tcgctgggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaattgccgactac attacggcccagatctaattcaccaccagtgccaggctgcctatcagaaagt ggtggctggtgtgctaatagccctggcccacaagtatcactaagctcgctttct tgctgtccaatttctattaaaggttcctttgttcctaagccaactactaaactgg gggatattatgaagggccttgagcatctggattctgcctaataaaaaacatttat tttcattgcaatgatgtattt

Được hiểu và được dự kiến là nhiều thay đổi theo quy tắc của sáng chế được mô tả ở đây có thể được tạo ra bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và được dự định là các thay đổi này nằm trong phạm vi của sáng chế. Phần Ví dụ thực hiện sáng chế sau đây minh họa thêm cho sáng chế, nhưng không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn ở đây được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Ví dụ 1

Các tác động đối với sự biểu hiện gen đích của vị trí và số lượng bản sao của vị trí liên kết U1 trong 3' UTR

Quy trình thử nghiệm:

Các cấu trúc plasmit: oligonucleotit (oligo) chứa trình tự liên kết U1 liên ứng kiểu hoang hoặc trình tự đột biến của nó được tổng hợp (IDT). Các oligo đã tổng hợp được tách dòng vào 3' UTR của vector biểu hiện pRL-SV40 luciferaza (Promega) bằng cách sử dụng Kit tách dòng Gibson Assembly (NEB). Các cấu trúc được tinh chế (Qiagen) và được kiểm tra bằng cách giải trình tự ADN (Genewiz).

Chuyển nạp: $3,5 \times 10^4$ tế bào HEK 293 được đưa vào đĩa đáy phẳng 96 giếng một ngày trước khi chuyển nạp. ADN plasmit (500 ng) được bổ sung vào ống hoặc đĩa đáy chữ U 96 giếng. Chất phản ứng TransIT-293 (Mirus; 1,4 μ l) được bổ sung riêng vào 50 μ l môi trường Opti-mem I (Life Technologies), và được để yên trong 5 phút ở nhiệt độ phòng ("RT"). Sau đó, 50 μ l chất phản ứng chuyển nạp đã pha loãng này được bổ sung vào ADN, được trộn và ủ ở RT trong 20 phút. Cuối cùng, 7 μ l dung dịch này được bổ sung vào giếng chứa các tế bào trong đĩa 96 giếng.

Thử nghiệm Renilla luciferaza của các tế bào đã nuôi cấy: 24 giờ sau khi đổi môi trường, các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ, và được cân bằng đến RT trong vài phút trên bàn thí nghiệm, và môi trường được hút ra. Dung dịch đệm ly giải glo (Promega, 100 μ L, RT) được bổ sung vào, và các đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong ít nhất là 5 phút. Sau đó, các thành phần của giếng được trộn bằng cách nghiền 50 μ l, và 20 μ l mỗi giếng được trộn với 20 μ l chất phản ứng Renilla-glo trong đĩa 384 giếng rắn màu trắng. Mười phút sau, cường độ phát quang được đo bằng cách sử dụng máy Tecan với thời gian đọc 500 msec. Hoạt tính luciferaza được thể hiện bằng đơn vị ánh sáng tương đối trung bình (RLU) $\pm$ SD.

Kết quả:

Để xây dựng cấu trúc điều hòa gen dựa vào U1-polyadenyl hóa, trình tự liên kết U1 được gắn xen vào 3' UTR của gen chỉ thị đích. Trình tự liên kết U1 liên ứng dài 10 nucleotit ("nt") (được gọi ở đây là kiểu hoang hoặc wt) được đặt vào vị trí 87 nt (U1-87) hoặc 140 nt (U1-140) ngược dòng trình tự AATAAA poly(A) trong 3' UTR của gen luciferaza trong vectơ pRL-SV40, như được thể hiện trong Fig. 1a. Như được thể hiện trong Fig. 1b, sự gắn xen trình tự liên kết U1 đột biến 10-nt ở vị trí -87 (U1-87 mut) không có tác dụng ức chế bất kỳ đối với sự biểu hiện gen luciferaza so với sự biểu hiện từ cấu trúc pRL-SV40 không bị biến đổi. Tuy nhiên, việc gắn xen trình tự liên kết U1 kiểu hoang 10-nt ở vị trí -87 (U1-87 wt) ức chế 98% sự biểu hiện Renilla luciferaza so với hoạt tính luciferaza từ vectơ đối chứng pRL-SV40. So với cấu trúc U1-87 mut, U1-87 wt gây ra sự giảm 50 lần hoạt tính luciferaza. Tương tự, vị trí U1 đột biến ở -140 (U1-140 mut) không gây ra tác dụng ức chế sự biểu hiện gen luciferaza. Tuy nhiên, trình tự liên kết U1 kiểu hoang ở vị trí -140 (U1-140 wt) gây ra tác dụng ức chế 91% hoạt tính luciferaza, gây ra tác dụng ức chế 12 lần hoạt tính luciferaza so với U1-140 mut.

Tác dụng ức chế của 2 bản sao hoặc 3 bản sao của trình tự liên kết U1 được gắn xen ở -140 trong 3' UTR cũng được kiểm tra. Như được thể hiện trong Fig. 1b, 2 bản sao (2xU1-140 wt) hoặc 3 bản sao (3xU1-140 wt) của trình tự liên kết U1 kiểu hoang gây ra sự giảm thêm hoạt tính luciferaza so với một bản sao duy nhất của vị trí U1 ở cùng một vị trí (U1-140 wt), lần lượt gây ra tác dụng ức chế 272 lần và 462 lần, so với các cấu trúc đột biến tương ứng của chúng. Do đó, các kết quả này chỉ ra rằng nhiều bản sao của trình tự liên kết U1 có tác dụng hiệp đồng trong việc ức chế sự biểu hiện gen.

Ví dụ 2

Tác động đối với sự biểu hiện gen đích của độ dài trình tự liên kết U1 trong 3' UTR.

Quy trình thử nghiệm: như được mô tả trong Ví dụ 1.

Kết quả:

Dựa vào các kết quả được mô tả trong Ví dụ 1, tác dụng ức chế của vị trí liên kết U1 được gắn xen vào vị trí 87 nt (U1-87) ngược dòng trình tự tín hiệu polyA muộn SV40 được mô tả thêm. Để xác định độ dài tối thiểu của trình tự liên kết U1 để ức chế sự biểu hiện gen đích khi được đặt vào 3', một loạt cấu trúc chứa trình tự 3' bị cắt liên tiếp của vị trí U1, như được thể hiện trong Fig. 2a. Như được thể hiện trong Fig. 2b, vị trí U1 9-nt (87-9) hoạt động tốt như vị trí U1 10-nt (U1-87). Tuy nhiên, khi trình tự liên kết U1 bị cắt đến 8 nt, tác dụng ức chế của vị trí U1 bị giảm một chút, gây ra tác dụng thấp hơn 3 lần. Khi trình tự vị trí U1 là 7 nt hoặc ngắn hơn, tác dụng ức chế có hiệu quả thấp hơn đáng kể. Các kết quả này chỉ ra rằng vị trí liên kết U1 được gắn xen vào vị trí 87 nt ngược dòng tín hiệu poly(A) muộn SV40 trong 3' UTR là hiệu quả hơn trong việc ức chế sự biểu hiện gen đích khi dài ít nhất 8 nt để huy động U1 snRNP một cách hiệu quả để ức chế sự polyadenyl hóa. Trình tự liên kết U1 9 nt được gắn xen vào vị trí 87 nt ngược dòng trình tự tín hiệu polyA muộn SV40 được chọn để mô tả thêm.

Ví dụ 3

Tác động của sự tạo thành cấu trúc bậc hai vòng thân ở vị trí U1 trong 3' UTR đối với sự biểu hiện gen

Quy trình thử nghiệm:

Các trình tự vòng thân chứa trình tự liên kết U1 9 nt kiểu hoang được tổng hợp (IDT) và được tách dòng vào vector pRL-SV40. Các trình tự cấu trúc được kiểm tra bằng cách giải trình tự ADN (Genewiz). Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp và thử nghiệm Renilla luciferaza được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 1.

Kết quả:

Để xác định tác dụng của cấu trúc kẹp tóc hoặc vòng thân đối với sự ức chế biểu hiện gen qua trung gian vị trí U1, vị trí U1 9 nt được gắn vào cấu trúc vòng thân (SL). Trong cấu trúc vòng thân này, như được thể hiện trong Fig. 3a, vị trí U1 và trình tự bổ sung của nó tạo ra thân. Trình tự đột biến được tạo ra làm đối chứng trong đó thân không được

tạo ra (SL gãy). Như được thể hiện trong Fig. 3b, việc gắn vị trí U1 9 nt vào cấu trúc vòng thân (U1 87-9 SL) triệt tiêu hoàn toàn tác dụng ức chế của vị trí U1 trong 3' UTR, trong khi đó trình tự đối chứng mà không thể tạo ra cấu trúc vòng thân (U1 87-9 SL gãy) thể hiện tác dụng rất ít đối với chức năng ức chế của vị trí U1. Các kết quả này chứng minh vị trí U1 được gắn vào cấu trúc vòng thân là không thể tiếp cận được để liên kết U1 snRNP, do đó sự biểu hiện gen không bị ức chế bởi tác dụng ức chế quá trình polyadenyl hóa qua trung gian U1 snRNP.

Ví dụ 4

Sử dụng theophyllin aptame để điều hòa sự biểu hiện gen đích bằng cách điều hòa tác dụng cản trở quá trình polyadenyl hóa của U1

Quy trình thử nghiệm:

Các oligonucleotit chứa các trình tự có độ dài đầy đủ của thân từ cấu trúc vòng thân và theophyllin aptame hoặc các trình tự đã bị cắt của thân, được tổng hợp (IDT) và được tách dòng vào vectơ pRL-SV40 bằng cách sử dụng Kit tách dòng Gibson Assembly (NEB). Các trình tự cấu trúc được kiểm tra bằng cách giải trình tự ADN (Genewiz).

Chuyển nạp và xử lý phôi tử aptame: Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp như đã mô tả trong Ví dụ 1. Bốn giờ sau khi chuyển nạp, môi trường được hút ra, và môi trường mới có hoặc không có 3 mM theophyllin được bổ sung vào. Thử nghiệm Renilla luciferaza được thực hiện từ 20 đến 24 giờ sau khi xử lý bằng theophyllin như được mô tả trong Ví dụ 1. Số lần tăng do cảm ứng được thể hiện bằng tỉ số của hoạt tính luciferaza thu được khi có mặt phôi tử aptame chia cho giá trị thu được khi vắng mặt phôi tử aptame này.

Kết quả:

Để điều hòa khả năng tiếp cận vị trí U1 trong 3' UTR của gen đích, và nhờ đó điều hòa sự biểu hiện gen đích, trình tự thân của cấu trúc aptame được liên kết trực tiếp với thân của cấu trúc vòng thân được kiểm tra trong Ví dụ 3. Trong cấu hình này, như được minh họa trong Fig. 4a, việc gắn xen trình tự aptame cản trở sự tạo thành cấu trúc thân, do đó, có thể tiếp cận vị trí U1 trong 3' UTR để liên kết U1 snRNP. Tuy nhiên, khi có mặt phôi tử aptame, sự liên kết aptame/phôi tử gây ra sự thay đổi cấu hình cấu trúc ARN, tạo thuận lợi cho sự tạo thành thân và cô lập vị trí U1 khỏi liên kết U1 snRNP trong 3' UTR.

Theophyllin aptame tổng hợp được kiểm tra trong cấu hình này bằng cách liên kết trình tự thân dưới của cấu trúc theophyllin aptame với thân của cấu trúc vòng thân, mà tạo ra thân 19 cặp bazơ như được thể hiện trong Fig. 4b. Các tác giả sáng chế nhận ra là nếu thân này là quá dài, sự tạo thành thân có thể là độc lập với sự tồn tại của trình tự aptame và xảy ra khi không có mặt phối tử aptame. Ngược lại, nếu thân này quá ngắn, ngay cả khi có mặt phối tử aptame, cấu trúc aptame ổn định không thể đạt được. Do đó, để xác định độ dài tối ưu của thân này (bao gồm thân bắt kỳ từ aptame và thân chứa vị trí liên kết U1), thân này được cắt liên tiếp nhiều lần, tạo ra 9 cấu trúc có độ dài thân thay đổi từ 19 đến 11 bp. Như được thể hiện trong Fig. 4c, với các cấu trúc U1_theo_1 đến U1_theo_6, hoạt tính luciferaza không bị ức chế đáng kể so với cấu trúc U1 87-9 khi không có mặt theophyllin, gợi ý việc cô lập vị trí U1 do tạo thành thân. Ngoài ra, không có sự tăng hoạt tính luciferaza sau khi xử lý bằng theophyllin. Tuy nhiên, trong cấu trúc 8 và 9, hoạt tính luciferaza được tăng cường sau khi xử lý bằng theophyllin, gợi ý là sự liên kết aptame/phối tử phong bế thêm khả năng tiếp cận vị trí U1, dẫn đến sự biểu hiện gen đích tăng.

Ví dụ 5

Tối ưu hóa trình tự thân để tăng cường khả năng điều hòa khả năng tiếp cận U1 do liên kết aptame/phối tử

Quy trình thử nghiệm: Như được mô tả trong Ví dụ 4.

Kết quả:

Các cấu trúc U1_theo_8 và 9 thể hiện sự tăng hoạt tính luciferaza ít sau khi xử lý bằng theophyllin. Để tăng cường thêm khả năng điều hòa khả năng tiếp cận vị trí U1 khi aptame không được liên kết bởi phối tử, cấu trúc thân được làm suy yếu bằng cách gây đột biến liên tiếp các bazơ thân, như được thể hiện trong Fig. 5a. Mặc dù, chiến lược này không làm cải thiện khả năng cảm ứng hoạt tính luciferaza từ cấu trúc U1_theo_9, như được thể hiện trong Fig. 5c, nó cải thiện khả năng điều hòa của cấu trúc U1_theo_8. Như được thể hiện trong Fig. 5b, trong một loạt 9 cấu trúc được tạo ra từ U1_theo_8, các cấu trúc U1_theo_8_1 đến 5 gây ra hoạt tính luciferaza tăng cường sau khi xử lý bằng theophyllin so với hoạt tính luciferaza khi vắng mặt phối tử aptame. Số lần tăng do cảm ứng được tăng lên so với số lần tăng do cảm ứng của cấu trúc U1_theo_8 (1,3 lần), khoảng từ 1,8 đến 2,6 lần. Do đó, tác giả sáng chế đã tạo ra được công tắc ribo tổng hợp điều hòa tác dụng cản trở sự polyadenyl hóa bởi U1 nhờ sự liên kết aptame/phối tử.

Ví dụ 6

Các tác động của công tắc ribo U1_theo bội đối với việc điều hòa sự biểu hiện gen đích

Quy trình thử nghiệm:

Các oligo chứa 4 bản sao của trình tự U1_theo_8_1 nối tiếp được tổng hợp (IDT) và được tách dòng bằng cách sử dụng chiến lược Gibson và kit tách dòng (NEB). Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp và thử nghiệm Renilla luciferaza được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 4.

Kết quả:

Cấu trúc U1_theo_8-1 gây ra sự cảm ứng làm tăng 1,8 lần sau khi xử lý bằng theophyllin, do sự biểu hiện mức nền tương đối cao của gen luciferaza. Để làm giảm sự biểu hiện mức nền của gen đích, 4 bản sao của trình tự U1_theo_8_1 được đặt theo kiểu nối tiếp trong 3' UTR, như được thể hiện trong Fig. 6a. Thực tế, như được chỉ ra trong Fig. 6b, 4 bản sao của U1-theo_8_1 đã làm giảm sự biểu hiện mức nền 83% so với một bản sao duy nhất của U1_theo_8_1. Khi xử lý bằng theophyllin, cấu trúc 4 bản sao làm tăng hoạt tính luciferaza theo cách phụ thuộc liều, tạo ra 40% hoạt tính luciferaza của vector đối chứng 87-9 SL và số lần tăng do cảm ứng tối đa là 4,3 lần ở 6 mM theophyllin. Các kết quả này chỉ ra rằng nhiều bản sao của công tắc ribo vị trí U1 nối tiếp có thể làm giảm mức biểu hiện nền của gen đích, cải thiện khả năng điều hòa gen đích. Trong cấu trúc cấu trúc này, cùng một trình tự aptame được sử dụng trong cả 4 bản sao của caxet điều hòa. Nhiều trình tự aptame khác nhau có thể được sử dụng trong mỗi bản sao của công tắc ribo.

Ví dụ 7

Sử dụng xpt-guanin aptame để điều hòa sự biểu hiện gen đích bằng cách điều hòa sự cản trở bởi U1

Quy trình thử nghiệm:

Các cấu trúc plasmit: Gen EGFP trong vector pEGFP-C1 được thay thế bằng trình tự mã hóa gen luciferaza đom đóm để tạo ra vector pFLuc chứa trình tự tín hiệu polyadenyl hóa sớm SV40. Các oligo chứa vị trí liên kết U1 kiểu hoang hoặc đột biến từ vị trí cắt nối 5' của DHFR exon 2 của người và trình tự xpt-guanin aptame được theo sau bởi trình tự bổ

sung của 7nt cuối cùng của trình tự vị trí U1 được tổng hợp (IDT) và được tách dòng vào vector pFLuc bằng cách sử dụng chiến lược tách dòng Gibson và kit tách dòng (NEB).

Chuyển nạp và xử lý phối tử aptame: Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp như đã mô tả trong Ví dụ 1. Bốn giờ sau khi chuyển nạp, môi trường được hút ra, và môi trường mới có hoặc không có 500 μ M guanin được bổ sung vào.

Thử nghiệm luciferaza đom đóm của các tế bào đã nuôi cấy: Hai mươi tư giờ sau khi đổi môi trường, các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ, và được cân bằng đến RT trong vài phút trên bàn thí nghiệm, sau đó được hút ra. Dung dịch đệm ly giải glo (Promega, 100 μ L, RT) được bổ sung vào, và các đĩa được để yên ở RT trong ít nhất là 5 phút. Sau đó, các thành phần của giếng được trộn bằng cách nghiền 50 μ L, và 20 μ L mỗi mẫu được trộn với 20 μ L chất phản ứng glo sáng (Promega) đã được pha loãng đến 10% trong đệm ly giải glo. 96 giếng được đặt cách nhau trên đĩa trắng đục 384 giếng. Sau khi ủ 5 phút ở RT, sự phát quang được đo bằng cách sử dụng máy Tecan với thời gian đọc 500 mSec. Hoạt tính luciferaza được thể hiện bằng đơn vị ánh sáng tương đối trung bình (RLU) $\pm$ S.D.

Kết quả:

Việc sử dụng cặp aptame/phối tử bổ sung, aptame tổng hợp hoặc tự nhiên, trong cấu trúc điều hòa gen, dựa vào sự cản trở U1, được kiểm tra bằng cách gắn xen vị trí U1 10 nt, vị trí cắt nối 5' từ DHFR exon 2, được liên kết với xpt-guanin aptame vào nhiều vị trí khác nhau trong vector pRLuc, như được thể hiện trong Fig. 7a. Ở vị trí U1 10 nt này, chỉ 7 nt cuối cùng được thiết kế thành cặp bazơ với trình tự bổ sung của nó nằm ở đầu 3' của trình tự xpt-guanin aptame, như được thể hiện trong Fig. 7b. Cấu hình trình tự này được tạo ra nhờ sự cắt liên tiếp trình tự thân nối thân aptame P1 và thân được tạo ra bởi vị trí U1 và trình tự bổ sung của nó, và chứng minh khoảng động học cao trong công tắc ribo aptame dựa vào sự cắt nối có chọn lọc. Trong thử nghiệm này, tác giả sáng chế đặt cấu hình trình tự này ở vị trí 149 nt, 110 nt hoặc 74 nt ngược dòng trình tự tín hiệu poly(A) sớm SV40 trong vùng 3' UTR, tạo ra các cấu trúc U1_Guan_1, 2 và 3. Thêm vào đó, vị trí U1 đột biến được tạo ra dưới dạng trình tự đối chứng. Như được thể hiện trong Fig. 7c, khi xử lý bằng guanin, hoạt tính luciferaza tăng 2,4, 2,0 và 1,7 lần lần lượt từ các cấu trúc U1_Gua_1, 2, và 3.

Ví dụ 8

Sự cản trở U1 được điều hòa bởi aptame là không đặc hiệu trình tự polyA

Quy trình thử nghiệm:

Các cấu trúc plasmid: Trình tự polyadenyl hóa sớm SV40 được thay thế bằng trình tự beta globin polyA người trong vector pFLuc để tạo ra pFLuc_HBGPA. Các oligo chứa vị trí liên kết U1 kiểu hoang hoặc đột biến từ vị trí cắt nối 5' của DHFR exon 2 của người và trình tự xpt-guanin aptame được theo sau bởi trình tự bổ sung của 7nt cuối cùng của trình tự vị trí U1 được tổng hợp (IDT) và được tách dòng vào vector pFLuc_HBGPA bằng cách sử dụng chiến lược tách dòng Gibson và kit tách dòng (NEB).

Chuyển nạp và thử nghiệm luciferaza là như đã mô tả trong Ví dụ 7.

Kết quả:

Các tác giả sáng chế đã chứng minh sự cản trở quá trình polyadenyl hóa bởi U1 được điều hòa bằng aptame trong ngữ cảnh trình tự polyA muộn SV40 hoặc trình tự polyA sớm SV40, như được thể hiện trong Ví dụ 4-6. Ngoài ra, để chứng minh sự cản trở U1 được điều hòa bởi aptame, do đó sự biểu hiện gen đích không bị giới hạn vào các trình tự polyA SV40, tác giả sáng chế kiểm tra sự cản trở U1 được điều hòa bởi guanin aptame trong ngữ cảnh trình tự polyA từ gen beta globin người. Như được thể hiện trong Fig. 8, khi xử lý bằng guanin, hoạt tính luciferaza tăng 2,1 lần từ cấu trúc wtU1_Gua_HBGPA. Ngược lại, mutU1_Gua_HBGPA không cảm ứng hoạt tính luciferaza so với các mẫu không được xử lý. Các kết quả này chứng minh là sự cản trở U1 được điều hòa bằng aptame là không đặc hiệu trình tự polyA.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cấu trúc polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện của gen đích đáp ứng với sự có mặt hoặc vắng mặt của phối tử chứa trình tự polynucleotit có trình tự mã hóa gen đích và vùng 3' không dịch mã (UTR) chứa tín hiệu polyadenyl hóa, và công tắc ribo, trong đó công tắc ribo này chứa vùng tác động và aptame, trong đó vùng tác động chứa trình tự tạo thân có vị trí liên kết U1 snRNP và trình tự bổ sung cho vị trí liên kết U1 snRNP này, trong đó công tắc ribo nằm trong 3' UTR của gen đích 5' của tín hiệu polyadenyl hóa, trong đó sự biểu hiện của gen đích tăng lên khi có mặt phối tử liên kết với aptame và trong đó sự biểu hiện của gen đích bị giảm khi phối tử này bị thu hồi.
2. Cấu trúc polynucleotit theo điểm 1, trong đó aptame này liên kết với phối tử phân tử nhỏ.
3. Cấu trúc polynucleotit theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó vùng tác động chứa trình tự bổ sung có khả năng tạo ra thân khi aptame liên kết với phối tử.
4. Cấu trúc polynucleotit theo điểm 3, trong đó vùng tác động chứa trình tự tạo thân dài từ 9 đến 11 cặp bazơ.
5. Cấu trúc polynucleotit theo điểm 4, trong đó vùng tác động chứa trình tự tạo thân có một hoặc nhiều bazơ bất cặp nhằm trong thân này.
6. Cấu trúc polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó vị trí liên kết U1 snRNP dài từ 8 đến 10 nucleotit.
7. Cấu trúc polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó vị trí liên kết U1 snRNP chứa trình tự CAGGTAAG.
8. Cấu trúc polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó vị trí liên kết U1 snRNP được chọn từ nhóm bao gồm CAGGTAAGTA, CAGGTAAGT, và CAGGTAAG.
9. Cấu trúc polynucleotit theo điểm 1, trong đó cấu trúc polynucleotit này chứa hai hoặc nhiều công tắc ribo nằm trong 3' UTR của gen đích, trong đó mỗi công tắc ribo chứa vùng tác động và aptame, trong đó vùng tác động chứa vị trí liên kết U1 snRNP và trình tự bổ sung cho vị trí liên kết U1 snRNP này.
10. Cấu trúc polynucleotit theo điểm 9, trong đó mỗi công tắc ribo trong hai hoặc nhiều công tắc ribo này chứa aptame liên kết với cùng một phối tử.
11. Cấu trúc polynucleotit theo điểm 9, trong đó hai hoặc nhiều công tắc ribo này chứa

nhiều aptame khác nhau liên kết với nhiều phối tử khác nhau.

12. Phương pháp *in vitro* điều hòa sự biểu hiện của gen đích đáp ứng với sự có mặt hoặc vắng mặt của phối tử, bao gồm bước

- a. đưa cấu trúc polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11 vào tế bào, và
- b. cho tế bào tiếp xúc với phối tử liên kết đặc hiệu với aptame với lượng hữu hiệu để làm tăng sự biểu hiện của gen đích.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó phối tử này là phân tử nhỏ.

14. Phương pháp theo điểm 12 hoặc điểm 13, trong đó công tắc ribo được gắn xen vào vị trí khoảng 87 hoặc khoảng 140 nucleotit 5' của tín hiệu polyadenyl hóa.

15. Phương pháp theo điểm 12 hoặc điểm 13, trong đó công tắc ribo được gắn xen vào vị trí khoảng 74, khoảng 110 hoặc khoảng 149 nucleotit 5' của tín hiệu polyadenyl hóa.

16. Phương pháp theo điểm 12 hoặc điểm 13, trong đó cấu trúc polynucleotit chứa hai hoặc nhiều công tắc ribo nằm trong 3' UTR của gen đích, trong đó mỗi công tắc ribo chứa vùng tác động và aptame, trong đó vùng tác động này chứa vị trí liên kết U1 snRNP và trình tự bổ sung cho vị trí liên kết U1 snRNP này.

17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó hai hoặc nhiều công tắc ribo chứa nhiều aptame khác nhau liên kết đặc hiệu với các phối tử phân tử nhỏ khác nhau.

18. Phương pháp theo điểm 16, trong đó hai hoặc nhiều công tắc ribo chứa cùng một aptame.

19. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 18, trong đó hai hoặc nhiều công tắc ribo được gắn xen vào nhiều vị trí khác nhau của 3' UTR của gen đích.

20. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 12 đến 19, trong đó gen đích chứa công tắc ribo được đưa vào vector để biểu hiện gen đích.

21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó vector này là vector virus.

22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó vector virus được chọn từ nhóm bao gồm vector adenovirus, vector virus liên hợp adeno, và vector lentivirus.

23. Vector chứa cấu trúc polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.

24. Vector theo điểm 23, trong đó vector này là vector virus.

25. Vector theo điểm 24, trong đó vector virus này được chọn từ nhóm bao gồm vector adenovirus, vector virus liên hợp adeno, và vector lentivirus.

1/12

Fig. 1a

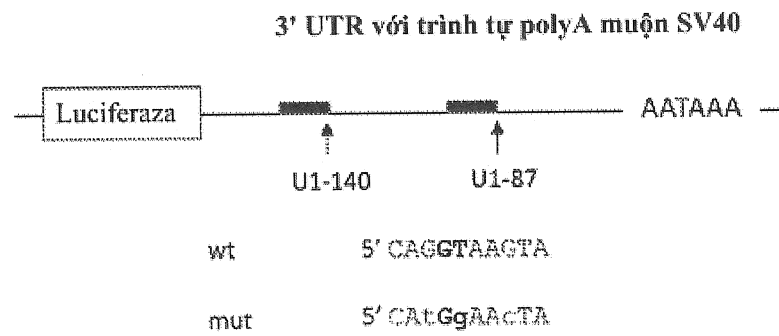
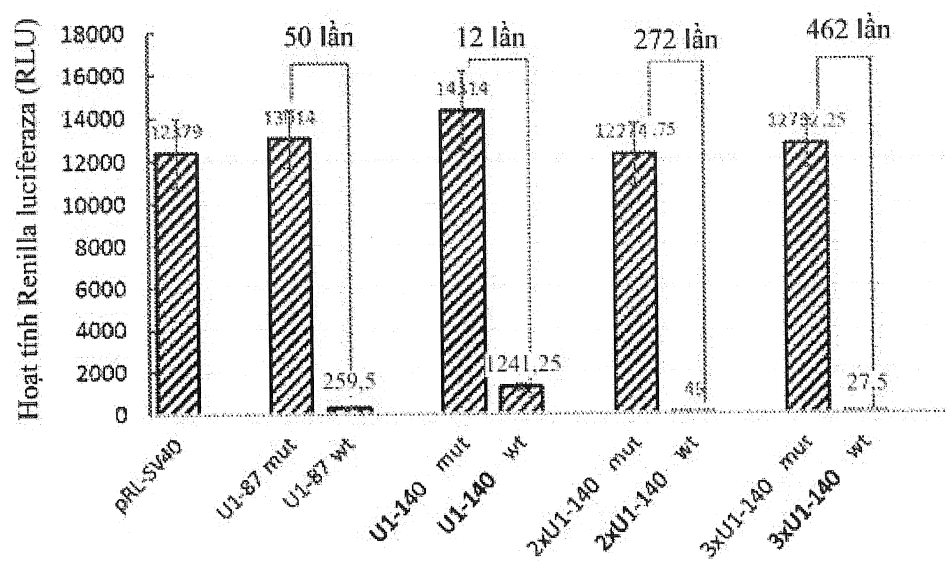


Fig. 1b



2/12

Cấu trúc	Trình tự	Độ dài (nt)
U1-87	5' CAGGTAAGTA 3'	10
87-9	5' CAGGTAAGT 3'	9
87-8	5' CAGGTAAG 3'	8
87-7	5' CAGGTAA 3'	7
87-6	5' CAGGTA 3'	6
87-5	5' CAGGT 3'	5

↓
Mất đoạn liên tiếp

FIG. 2a

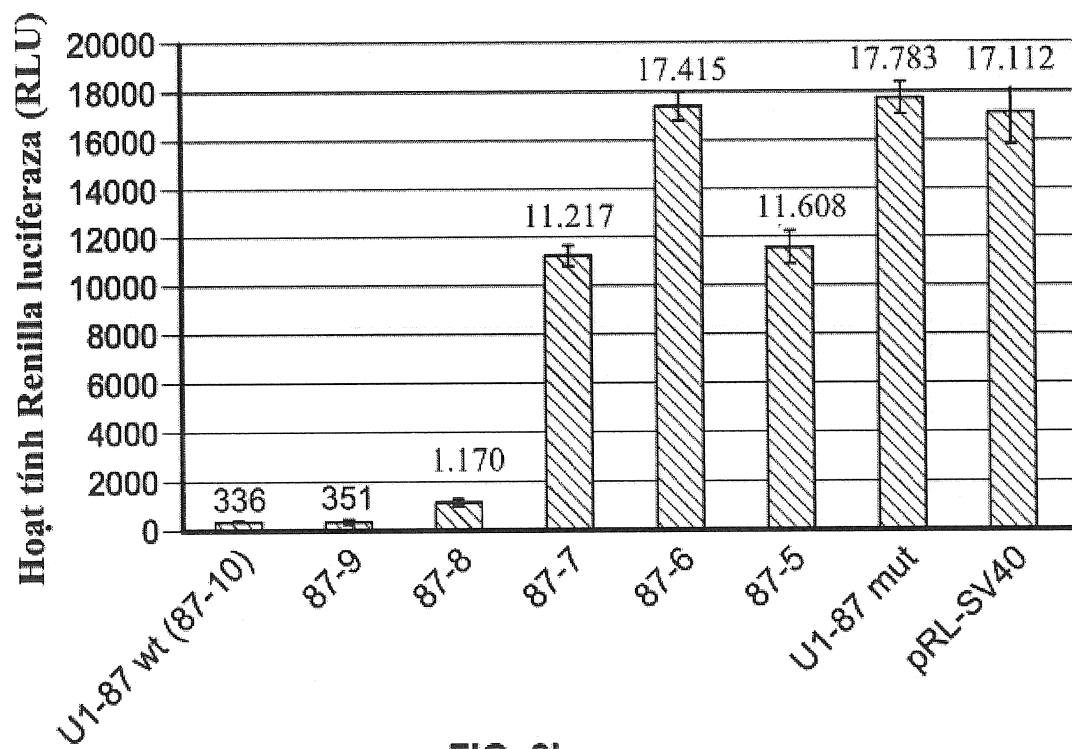


FIG. 2b

3/12

Fig. 3a

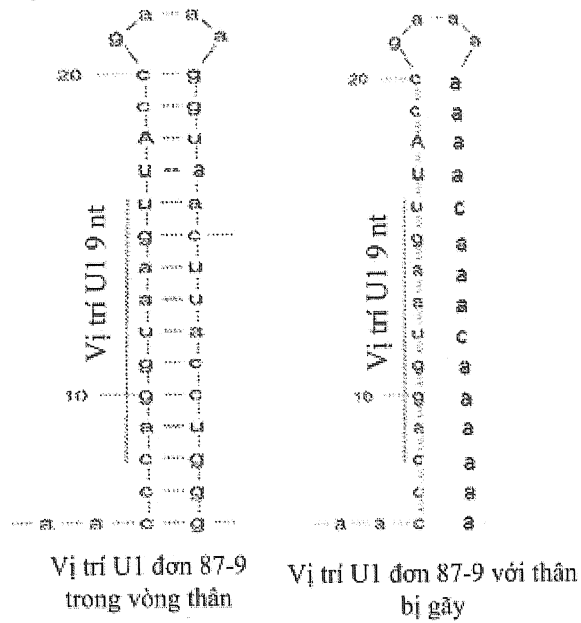
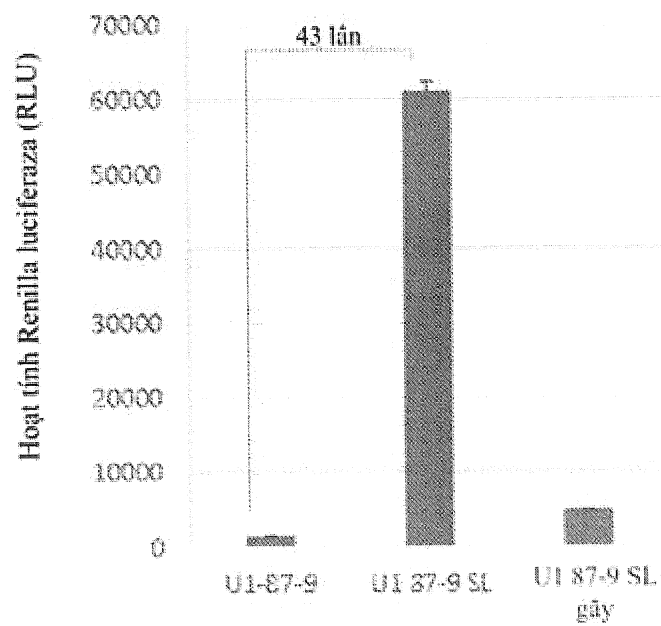


Fig. 3b



4/12

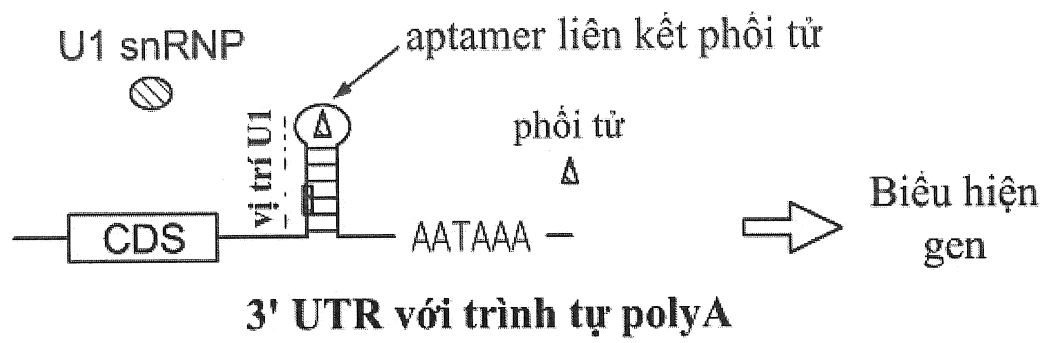
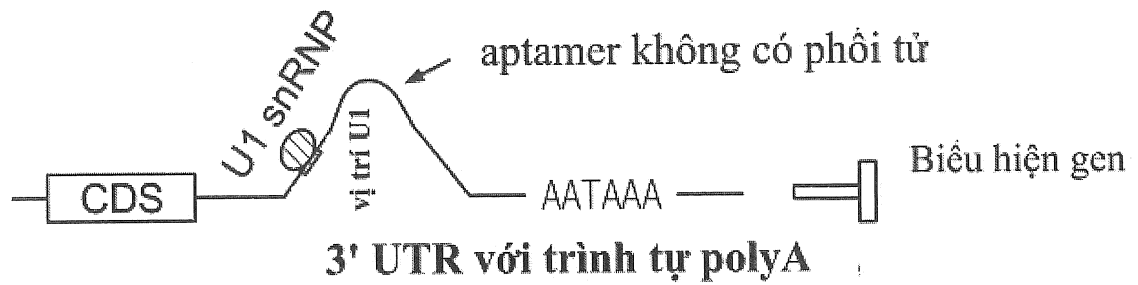


FIG. 4a

5/12

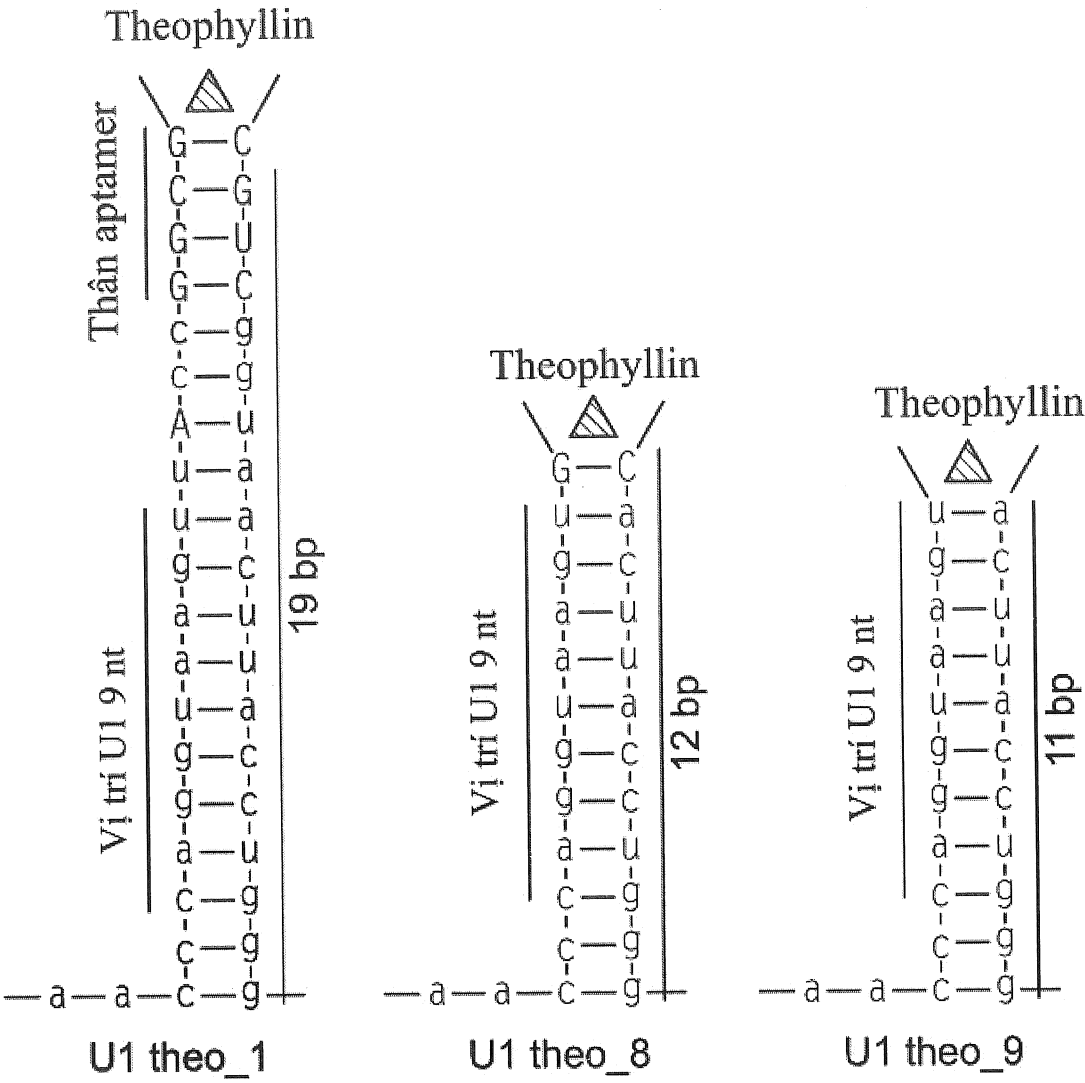
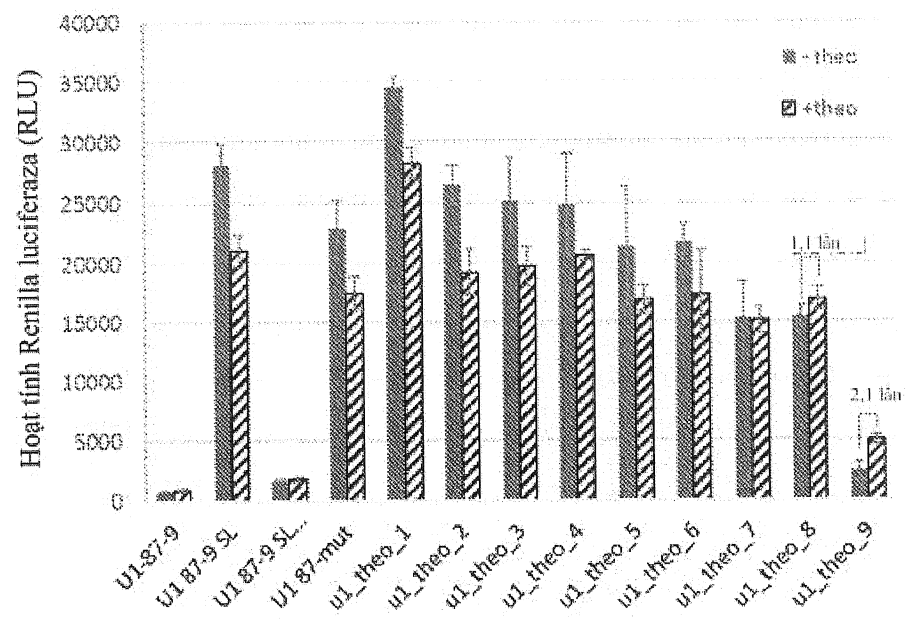


FIG. 4b

6/12

Fig. 4c



7/12

Fig. 5a

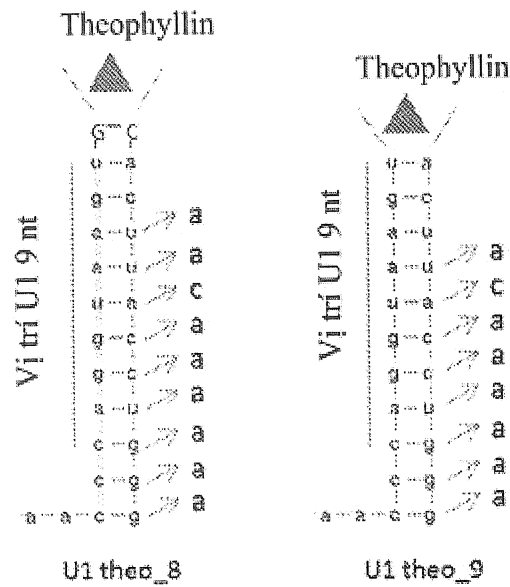
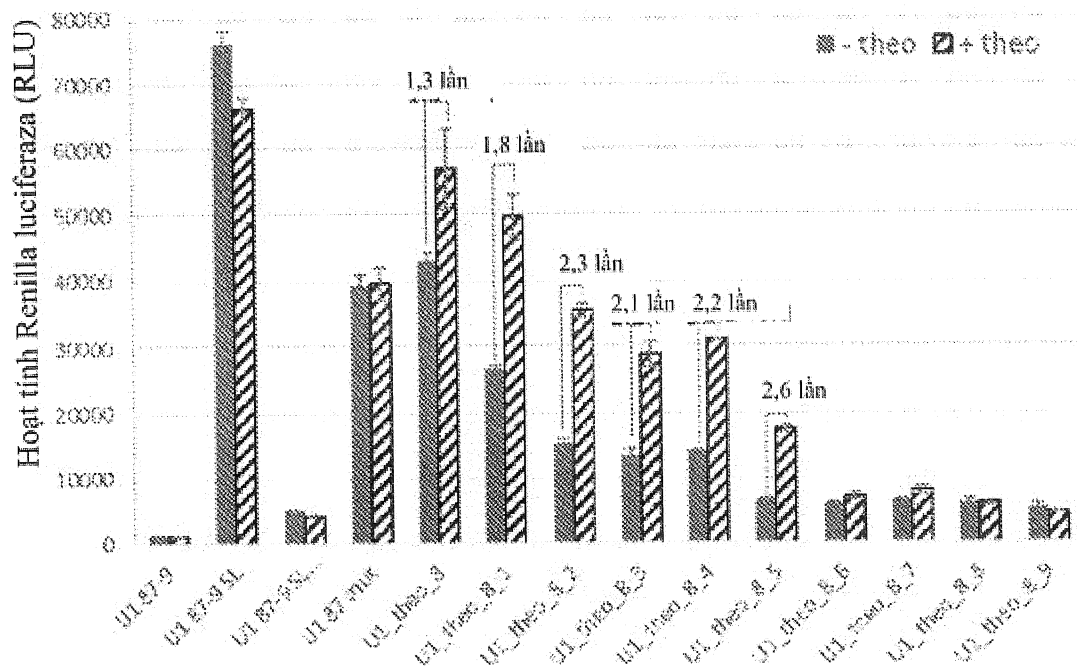
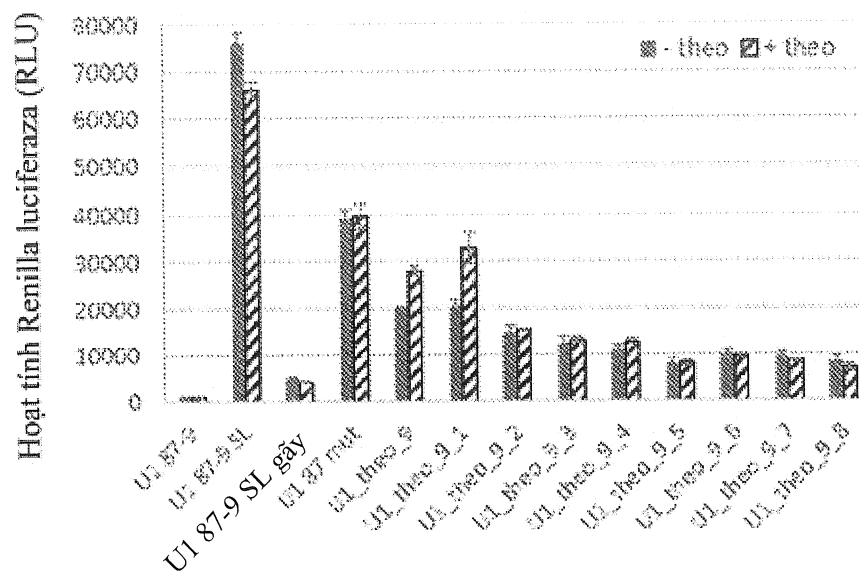


Fig. 5b



8/12

Fig. 5c



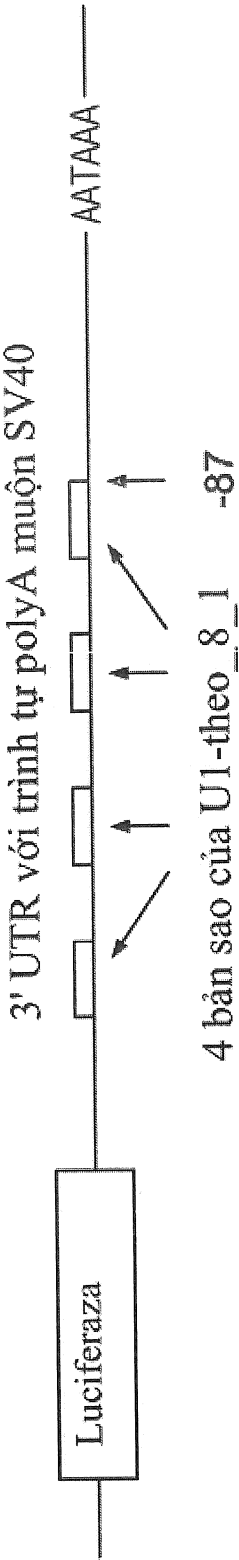


FIG. 6a

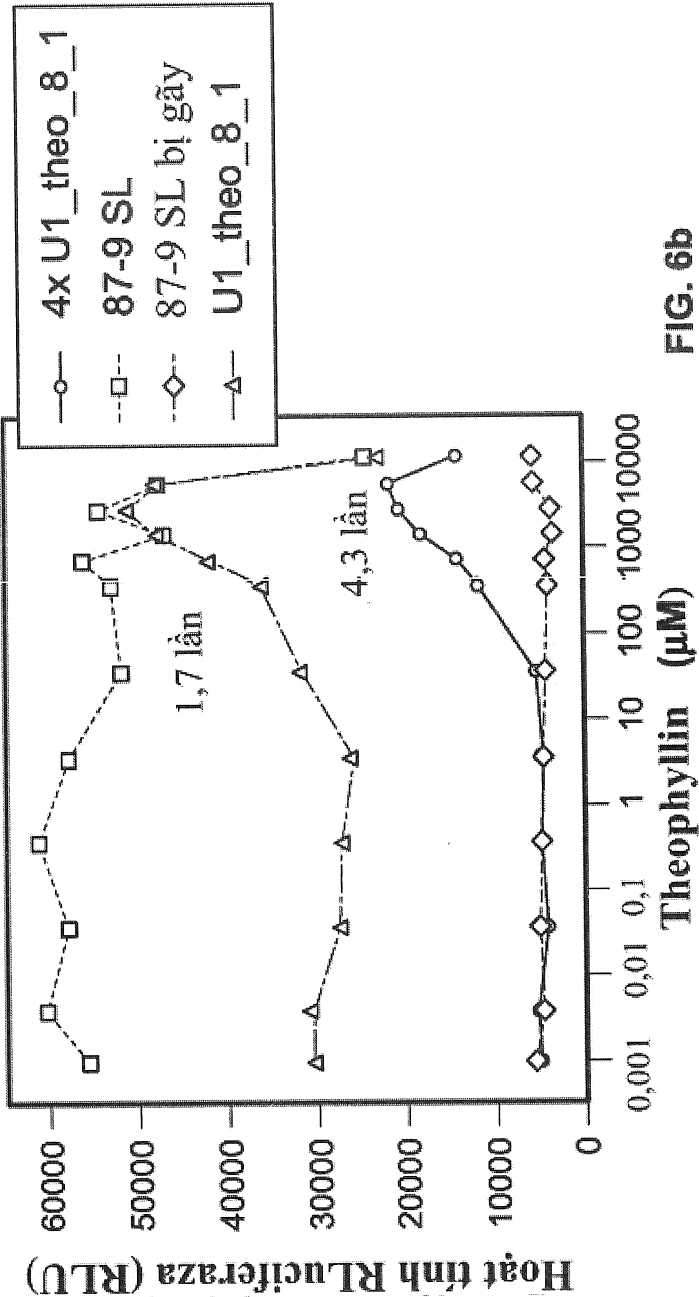


FIG. 6b

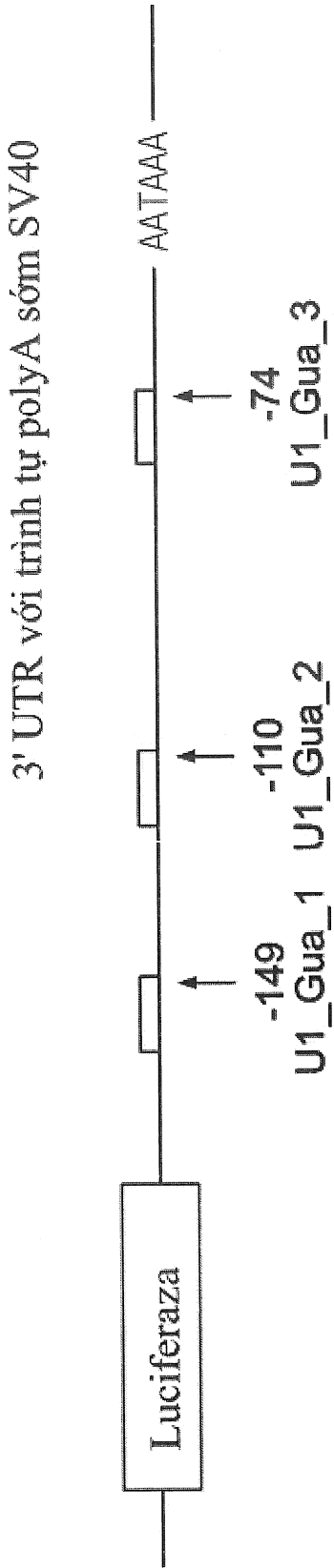
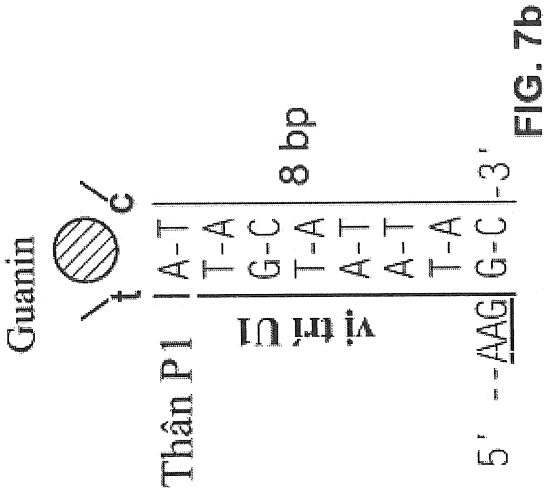
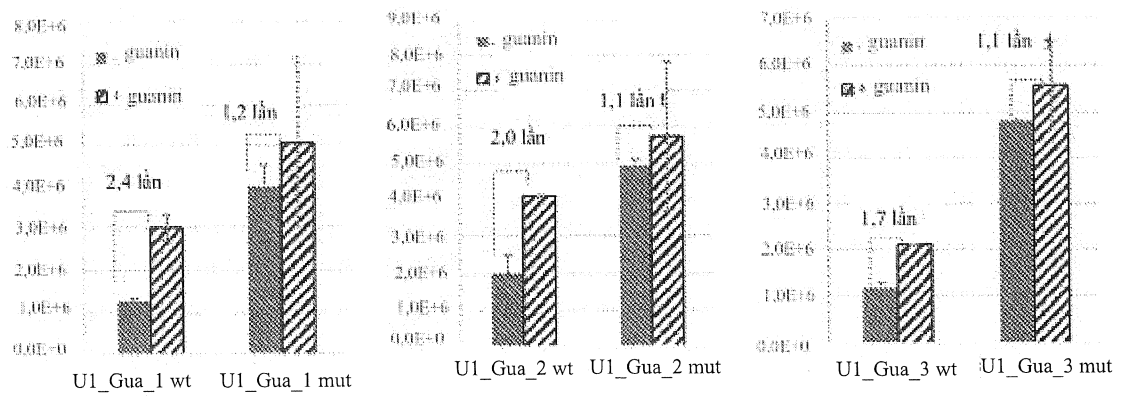


FIG. 7a



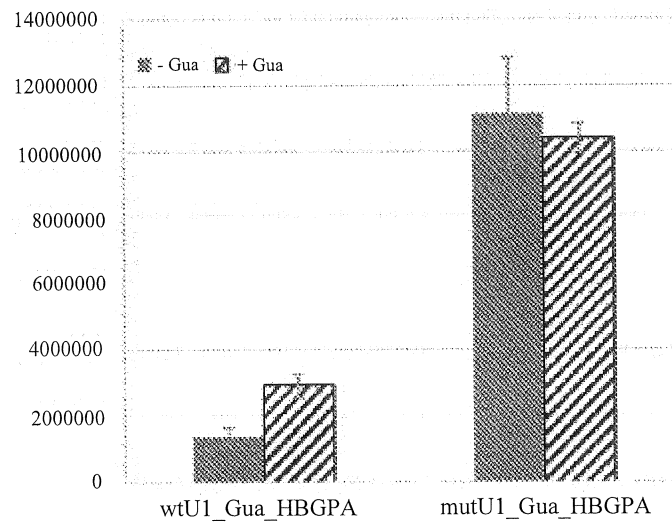
11/12

Fig. 7c



12/12

Fig. 8



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MeiraGTx UK II Limited
 MeiraGTx, LLC
 Volles, Michael J.
 Danos, Olivier F.
 Guo, Xuecui

<120> CẤU TRÚC POLYNUCLEOTIT ĐỂ ĐIỀU HÒA SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÍCH VÀ PHƯƠNG
 PHÁP IN VITRO ĐIỀU HÒA BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÍCH

<130> 162027.46576

<140> PCT/US17/16279

<141> 02-02-2017

<150> U.S. 62/290,200

<151> 02-02-2016

<160> 52

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vị trí liên kết U1 liên ứng

<400> 1

caggtaagta

10

<210> 2

<211> 10

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vị trí liên kết U1 đột biến

<400> 2

catggaacta

10

<210> 3

<211> 210

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> U1-87 wt trong pRL-SV40

<400> 3

tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60

agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aggtaagtac aactagaatg 120

cagtgaataaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt 180

ataagctgca ataaacaagt taacaacaac 210

<210> 4

<211> 210

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> U1-87 mut trong pRL-SV40

<400> 4

tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60

agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc atggaactac aactagaatg 120

cagtgaataaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt 180

ataagctgca ataaacaagt taacaacaac 210

<210> 5

<211> 212

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> U1-140 wt trong pRL-SV40

<400> 5

tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagaca ggtaagtagc 60

ggccgcttcg agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa 120

tgcaagtgaataaaaatgcttt atttgtgaata tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca 180

ttataagctg caataaacaac gtaacaaca ac 212

<210> 6

<211> 212

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> U1-140 mut trong pRL-SV40

<400> 6

tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagaca tggaactagc 60

ggccgcttcg agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa 120

tgcagtga aaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca 180

ttataagctg caataaaca gtaacaaca ac 212

<210> 7

<211> 228

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 2xU1-140 wt trong pRL-SV40

<400> 7

tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagaca ggtaagtaac 60

caaacaggta agtagcggcc gtttcgagca gacatgataa gatacattga tgagtttgga 120

caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaaa tgctttatatt gtgaaatttg tgatgctatt 180

gctttatttg taaccattat aagctgcaat aaacaagtta acaacaac 228

<210> 8

<211> 228

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 2xU1-140 mut trong pRL-SV40

<400> 8

tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagaca tggaactaac 60

caaacatgga actagcggcc gtttcgagca gacatgataa gatacattga tgagtttgga 120

caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaaa tgctttatatt gtgaaatttg tgatgctatt 180

gctttatttg taaccattat aagctgcaat aaacaagtta acaacaac 228

<210> 9

<211> 244

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 3xU1-140 wt trong pRL-SV40

<400> 9

tcaaatcggtt cggttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagaca ggtaagtaac	60
caaacaggta agtaacaaaa caggtaagta gcggccgctt cgagcagaca tgataagata	120
cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga	180
aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac cattataagc tgcaataaac aagttaacaa	240
caac	244

<210> 10

<211> 244

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 3xU1_140 mut trong pRL-SV40

<400> 10

tcaaatcggtt cggttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagaca tggaactaac	60
caaacatgga actaacaaaa catggaacta gcggccgctt cgagcagaca tgataagata	120
cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga	180
aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac cattataagc tgcaataaac aagttaacaa	240
caac	244

<210> 11

<211> 209

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 87-9 trong pRL-SV40

<400> 11

tcaaatcggtt cggttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg	60
agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aggtaagtca actagaatgc	120
agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta	180
taagctgcaa taaacaagtt aacaacaac	209

<210> 12
 <211> 208
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 87-8 trong pRL-SV40

<400> 12
 tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aggtaagcaa ctagaatgca 120
 gtgaaaaaaaa tgctttattt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg taaccattat 180
 aagctgcaat aaacaagtta acaacaac 208

<210> 13
 <211> 207
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 87-7 trong pRL-SV40

<400> 13
 tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aggtaacaac tagaatgcag 120
 tgaaaaaaaaat gctttatttg tgaaatttgg gatgctattg ctttatttgg aaccattata 180
 agctgcaata aacaagttaa caacaac 207

<210> 14
 <211> 206
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 87-6 trong pRL-SV40

<400> 14
 tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aggtacaact agaatgcagt 120
 gaaaaaaaaatg ctttatttgg gaaatttgg atgctattgc tttatttggta accattataa 180

gctgcaataa acaagttaac aacaac 206

<210> 15
 <211> 205
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 87-5 trong pRL-SV40

<400> 15
 tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aggtcaacta gaatgcagtg 120
 aaaaaaatgc tttatttgtg aaatttgtga tgctattgct ttatttgtaa ccattataag 180
 ctgcaataaa caagttaaca acaac 205

<210> 16
 <211> 238
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1 87-9 SL trong pRL-SV40

<400> 16
 tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagttaccga 120
 aaggtaactt acctgggcaa ctagaatgca gtgaaaaaaaa tgctttattt gtgaaatttg 180
 tgatgctatt gctttatttg taaccattat aagctgcaat aaacaagtta acaacaac 238

<210> 17
 <211> 238
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1 87-9 SL bị gãy trong pRL-SV40

<400> 17
 tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagttaccga 120
 aaaaaacaaa caaaaaacaa ctagaatgca gtgaaaaaaaa tgctttattt gtgaaatttg 180

tgatgctatt gctttatttg taaccattat aagctgcaat aaacaagtta acaacaac 238

<210> 18

<211> 267

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> U1_theo_1 trong pRL-SV40

<400> 18

tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60

agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagttaccgg 120

cgataccagc cgaaaggccc ttggcagcgt cggtaactta cctgggcaac tagaatgcag 180

tgaaaaaaat gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata 240

agctgcaata aacaagttta caacaac 267

<210> 19

<211> 265

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> U1_theo_2 trong pRL-SV40

<400> 19

tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60

agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagttacggc 120

gataccagcc gaaaggccct ttggcagcgtc gtaacttacc tgggcaacta gaatgcagtg 180

aaaaaaatgc tttatttgtg aaatttgtga tgctattgct ttatttgtta ccattataag 240

ctgcaataaaa caagttaaca acaac 265

<210> 20

<211> 263

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> U1_theo_3 trong pRL-SV40

<400> 20

tcaaatcggt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagttacgcg 120
 ataccagccg aaaggccctt ggcagcgtgt aacttacctg ggcaactaga atgcagtgaa 180
 aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgaacc attataagct 240
 gcaataaaca agttaacaac aac 263

<210> 21
 <211> 261
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_4 trong pRL-SV40

<400> 21
 tcaaatcggt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagttacgga 120
 taccagccga aaggcccttg gcagcgtaa cttacctggg caactagaat gcagtgaaaa 180
 aaatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc 240
 aataacaag ttaacaaca c 261

<210> 22
 <211> 259
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_5 trong pRL-SV40

<400> 22
 tcaaatcggt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagttacgat 120
 accagccgaa aggcccttgg cagcgtaact tacctgggca actagaatgc agtgaaaaaa 180
 atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa 240
 taaacaagtt aacaacaac 259

<210> 23
 <211> 257

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_6 trong pRL-SV40

<400> 23
 tcaaatcggtt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagttcgata 120
 ccagccgaaa ggcccttggc agcgaactta cctgggcaac tagaatgcag tgaaaaaat 180
 gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata agctgcaata 240
 aacaagttaa caacaac 257

<210> 24
 <211> 255
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_7 trong pRL-SV40

<400> 24
 tcaaatcggtt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagttgatac 120
 cagccgaaag gcccttggca gcaacttacc tgggcaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc 180
 tttatttgtg aaatttgtga tgctattgct ttatttgtaa ccattataag ctgcaataaa 240
 caagttaaca acaac 255

<210> 25
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_8 trong pRL-SV40

<400> 25
 tcaaatcggtt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtatacc 120
 agccgaaagg cccttggcag cacttacctg ggcaactaga atgcagtgaa aaaaatgctt 180

tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttghtaacc attataagct gcaataaaca 240
 agttaacaac aac 253

<210> 26
 <211> 251
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_9 trong pRL-SV40

<400> 26
 tcaaatcggt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtatacca 120
 gccgaaaggc ccttggcaga cttacctggg caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 180
 tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttghtaacat tataagctgc aataaacaag 240
 ttaacaacaa c 251

<210> 27
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_8_1 trong pRL-SV40

<400> 27
 tcaaatcggt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtataacc 120
 agccgaaagg cccttggcag cacttacctg gacaactaga atgcagtga aaaaatgctt 180
 tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttghtaacc attataagct gcaataaaca 240
 agttaacaac aac 253

<210> 28
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_8_2 trong pRL-SV40

<400> 28
tcaaatcggtt cggttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccagggt aagtataacc 120
agccgaaagg cccttggcag cacttacctg aacaactaga atgcagtga aaaaatgctt 180
tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgaacc attataagct gcaataaaca 240
agttaacaac aac 253

<210> 29
<211> 253
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> U1_theo_8_3 trong pRL-SV40

<400> 29
tcaaatcggtt cggttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccagggt aagtataacc 120
agccgaaagg cccttggcag cacttaccta aacaactaga atgcagtga aaaaatgctt 180
tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgaacc attataagct gcaataaaca 240
agttaacaac aac 253

<210> 30
<211> 253
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> U1_theo_8_4 trong pRL-SV40

<400> 30
tcaaatcggtt cggttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccagggt aagtataacc 120
agccgaaagg cccttggcag cacttaccaa aacaactaga atgcagtga aaaaatgctt 180
tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgaacc attataagct gcaataaaca 240
agttaacaac aac 253

<210> 31

<211> 253
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_8_5 trong pRL-SV40

<400> 31
 tcaaatcggt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtataacc 120
 agccgaaagg cccttggcag cacttcaaaa aacaactaga atgcagtga aaaaatgctt 180
 tatttttgaa attttgatg ctattgcttt attttgaacc attataagct gcaataaaca 240
 agttaacaac aac 253

<210> 32
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_8_6 trong pRL-SV40

<400> 32
 tcaaatcggt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtataacc 120
 agccgaaagg cccttggcag cacttaaaaa aacaactaga atgcagtga aaaaatgctt 180
 tatttttgaa attttgatg ctattgcttt attttgaacc attataagct gcaataaaca 240
 agttaacaac aac 253

<210> 33
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_8_7 trong pRL-SV40

<400> 33
 tcaaatcggt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtataacc 120
 agccgaaagg cccttggcag cacttcaaaa aacaactaga atgcagtga aaaaatgctt 180

tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttghtaacc attataagct gcaataaaca 240
 agttaacaac aac 253

<210> 34
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_8_8 trong pRL-SV40

<400> 34
 tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtataacc 120
 agccgaaagg cccttggcag cactacaaaa aacaactaga atgcagtga aaaaatgctt 180
 tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttghtaacc attataagct gcaataaaca 240
 agttaacaac aac 253

<210> 35
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_8_9 trong pRL-SV40

<400> 35
 tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtataacc 120
 agccgaaagg cccttggcag cacaacaaaa aacaactaga atgcagtga aaaaatgctt 180
 tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttghtaacc attataagct gcaataaaca 240
 agttaacaac aac 253

<210> 36
 <211> 251
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_9_1 trong pRL-SV40

<400> 36
tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtatacca 120
gccgaaaggc ccttggcaga cttacctgga caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 180
tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 240
ttaacaacaa c 251

<210> 37
<211> 251
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> U1_theo_9_2 trong pRL-SV40

<400> 37
tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtatacca 120
gccgaaaggc ccttggcaga cttacctgaa caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 180
tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 240
ttaacaacaa c 251

<210> 38
<211> 251
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> U1_theo_9_3 trong pRL-SV40

<400> 38
tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtatacca 120
gccgaaaggc ccttggcaga cttacctaaa caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 180
tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 240
ttaacaacaa c 251

<210> 39
 <211> 251
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_9_4 trong pRL-SV40

<400> 39
 tcaaatcggt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtatacca 120
 gccgaaaggc ccttggcaga cttacaaaaa caactagaat gcagtgaata aaatgcttta 180
 tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 240
 ttaacaacaa c 251

<210> 40
 <211> 251
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_9_5 trong pRL-SV40

<400> 40
 tcaaatcggt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtatacca 120
 gccgaaaggc ccttggcaga cttacaaaaa caactagaat gcagtgaata aaatgcttta 180
 tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 240
 ttaacaacaa c 251

<210> 41
 <211> 251
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_9_6 trong pRL-SV40

<400> 41
 tcaaatcggt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtatacca 120

gccgaaaggc ccttggcaga cttaaaaaaa caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 180
 tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 240
 ttaacaacaa c 251

<210> 42
 <211> 251
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_9_7 trong pRL-SV40

<400> 42
 tcaaatacggtt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtatacca 120
 gccgaaaggc ccttggcaga cttcaaaaaa caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 180
 tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 240
 ttaacaacaa c 251

<210> 43
 <211> 251
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_theo_9_8 trong pRL-SV40

<400> 43
 tcaaatacggtt cggtgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg 60
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtatacca 120
 gccgaaaggc ccttggcaga ctacaaaaaa caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 180
 tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag 240
 ttaacaacaa c 251

<210> 44
 <211> 539
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 4xU1_theo_8_1 trong pRL-SV40

<400> 44

tcaaatacggtt cgttgagcga gttctcaaaa atgaacaata attctagagc ggccgcttcg	60
agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc aaaccaggt aagtataacc	120
agccgaaagg cccttggcag cacttacctg gacaactaga atgcagtga aaaagagttt	180
ggacaaacca aaccaggtta agtgatacca gccgaaaggc ccttggcagc acttacctgg	240
acaactagaa tgcagtga aaatgagcag ttgacaaa ccaaacccag gtaagtata	300
ccagccgaaa ggcccttggc agcacttacc tggacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc	360
tttattttgtg agagttttgga caaaccaaac ccaggtaagt gataccagcc gaaaggccct	420
tggcagcact tacctggaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt	480
gtgatgctat tgcttttttt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaac	539

<210> 45

<211> 328

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> U1_Gua_1 wt trong pFLuc

<400> 45

tcataaaggc caagaagggc ggaaagatcg ccgtgtaagc cataccacat taaggtaatg	60
tataatcgcg tggatatggc acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaatgt ccgactacat	120
tactgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctccacac ctccccctga acctgaaaca	180
taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata	240
aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcactgcatt ctagttgtgg	300
tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttaa	328

<210> 46

<211> 328

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> U1_Gua_1 mut trong pFLuc

<400> 46

tcataaaggc caagaagggc ggaaagatcg ccgtgtaagc cataccacat taatggaatc	60
tataatcgcg tggatatggc acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaagt cgcactagat	120
tcctgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctccacac ctccccctga acctgaaaca	180
taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata	240
aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcactgcatt ctagttgttg	300
tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttaa	328

<210> 47
 <211> 328
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_Gua_2 wt trong pFLuc

<400> 47	
tcataaaggc caagaagggc ggaaagatcg ccgtgtaagc cataccacat ttgtagaggt	60
tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct aaggtaatgt ataatcgcg ggatatggca	120
cgcaagtttc taccgggcac cgtaaattgtc cgactacatt acccccctga acctgaaaca	180
taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata	240
aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcactgcatt ctagttgttg	300
tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttaa	328

<210> 48
 <211> 328
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> U1_Gua_2 mut trong pFLuc

<400> 48	
tcataaaggc caagaagggc ggaaagatcg ccgtgtaagc cataccacat ttgtagaggt	60
tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct aatggaatct ataatcgcg ggatatggca	120
cgcaagtttc taccgggcac cgtaaattgtc cgactagatt cccccctga acctgaaaca	180
taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata	240
aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcactgcatt ctagttgttg	300

tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttaa 328

<210> 49

<211> 328

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> U1_Gua_3 wt trong pFLuc

<400> 49

tcataaaggc caagaagggc ggaaagatcg ccgtgtaagc cataccacat ttgtagaggt 60

tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct cccctgaac ctgaaacata aaatgaatgc 120

aattgtaagg taatgtataa tcgcgtggat atggcacgca agtttctacc gggcaccgta 180

aatgtccgac tacattactg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata 240

aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcactgcatt ctagttgtgg 300

tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttaa 328

<210> 50

<211> 328

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> U1_Gua_3 mut trong pFLuc

<400> 50

tcataaaggc caagaagggc ggaaagatcg ccgtgtaagc cataccacat ttgtagaggt 60

tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct cccctgaac ctgaaacata aaatgaatgc 120

aattgtaatg gaatctataa tcgcgtggat atggcacgca agtttctacc gggcaccgta 180

aatgtccgac tagattcctg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata 240

aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcactgcatt ctagttgtgg 300

tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttaa 328

<210> 51

<211> 375

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> wtU1_Gua_HBGPA

<400> 51

tcataaaaggc caagaagggc ggaaagatcg ccgtgtaagg atccaagctt atcgataaccg	60
tcgacctcga ggtaatgtat aatcgcgtagg atatggcacg caagtttcta ccgggcaccg	120
taaatgtccg actacattac ggcccagatc taattcaccc caccagtgcg ggctgcctat	180
cagaaagtgg tggctggtgt ggctaatagcc ctggcccaca agtatcacta agctcgcttt	240
cttgctgtcc aatttctatt aaaggttcct ttgttccta agtccaacta ctaaactggg	300
ggatattatg aagggccttg agcatctgga ttctgcctaa taaaaaacat ttattttcat	360
tgcaatgatg tattt	375

<210> 52

<211> 375

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mutU1_Gua_HBGPA

<400> 52

tcataaaaggc caagaagggc ggaaagatcg ccgtgtaagg atccaagctt atcgataaccg	60
tcgacctcga tggaatctat aatcgcgtagg atatggcacg caagtttcta ccgggcaccg	120
taaatgtccg actacattac ggcccagatc taattcaccc caccagtgcg ggctgcctat	180
cagaaagtgg tggctggtgt ggctaatagcc ctggcccaca agtatcacta agctcgcttt	240
cttgctgtcc aatttctatt aaaggttcct ttgttccta agtccaacta ctaaactggg	300
ggatattatg aagggccttg agcatctgga ttctgcctaa taaaaaacat ttattttcat	360
tgcaatgatg tattt	375