



(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



1-0045007

(51)^{2020.01} A61K 35/76; C12N 5/10; C12N 15/864; (13) B
A61P 27/02; C12N 15/67

(21) 1-2020-04595

(22) 14/01/2019

(86) PCT/GB2019/050092 14/01/2019

(87) WO 2019/138250 18/07/2019

(30) 1800546.2 12/01/2018 GB

(45) 25/04/2025 445

(43) 26/04/2021 397A

(71) UCL Business Ltd (GB)

The Network Building, 97 Tottenham Court Road, London, Greater London W1T
4TP, United Kingdom

(72) ALI, Robin (GB); MATSUKI, Takaaki (JP); SMITH, Alexander (NL);
GEORGIADIS, Anastasios (GR).

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

(54) ĐƠN VỊ KIỂM SOÁT PHIÊN MÃ (TCU), VECTƠ CHỨA NÓ VÀ DƯỢC PHẨM
CHỨA VECTƠ NÀY

(21) 1-2020-04595

(57) Sáng chế đề cập đến đơn vị kiểm soát phiên mã (TCU) dài 2500 nucleotit. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến cấu trúc biểu hiện chứa TCU, vector chứa TCU, tế bào chủ chứa vector và dược phẩm chứa vector này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến liệu pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa rối loạn võng mạc, cụ thể là loạn dưỡng tế bào nón, loạn dưỡng tế bào nón-que và mù màu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong nhiều loài động vật có vú bao gồm chuột và người, số tế bào nhận sáng hình que mà làm trung gian quan sát trong ánh sáng mờ lớn hơn nhiều số tế bào nhận sáng hình nón. Tuy nhiên, ở thế giới công nghiệp hóa nơi mà sự chiếu sáng cho phép tế bào nón hoạt động suốt ban ngày và ban đêm, quan sát qua trung gian tế bào que ít quan trọng hơn. Nhiều bệnh nhân không có chức năng tế bào que từ khi ra đời chỉ được nhận ra một cách bất ngờ và, thực tế là, không thể nhận ra thị lực bất thường của họ. Ngược lại, khi loạn chức năng tế bào nón có mặt, bệnh nhân luôn có triệu chứng và thường chịu sự cản trở về hình ảnh mà phụ thuộc vào độ loạn chức năng tế bào nón của họ.

Trong một số tình trạng, chỉ, hoặc hầu hết là, tế bào nón bị mất hoặc loạn chức năng, và tế bào que vẫn được bảo quản tương đối. Các tình trạng này có thể được biết là loạn dưỡng tế bào nón hoặc loạn dưỡng tế bào nón-que (cone-rod dystrophy - CRD). Loạn dưỡng tế bào nón hoặc tế bào nón-que là loạn dưỡng võng mạc di truyền được đặc trưng bằng sự mất sơ cấp tế bào nón, hoặc đôi khi mất đồng thời cả tế bào nón và tế bào que. Triệu chứng bao gồm mất thị lực, nhạy với ánh sáng chói và sự nhìn màu kém. Ví dụ, mù màu là loạn dưỡng võng mạc di truyền, nghiêm trọng với sự vắng mặt hoàn toàn của chức năng tế bào nón từ khi ra đời nhưng, có thể đoán được, có chức năng tế bào que bình thường. Đột biến ở nhiều gen bao gồm *CNGA3*, *CNGB3* và *PDE6C* có liên quan đến bệnh. Mỗi gen gây bệnh mã hóa thành phần thiết yếu của phân cấp truyền dẫn quang hình nón mà chuyển ánh sáng thành tín hiệu điện bằng cách gây quá phân cực tế bào nhận sáng. Sự thiếu, ví dụ, *CNGA3* hoặc *CNGB3* protein ở tế bào nhận sáng hình nón dẫn đến sự bất lực của tế bào để quá phân cực đáp ứng với ánh sáng. Kết quả là, tế bào ban đầu sống sót, nhưng không có chức năng, và bệnh nhân có tính sắc bén hình ảnh kém, không thể nhìn màu và sợ ánh sáng từ khi ra đời. Các nhóm khác nhau đã phát triển giao thức liệu pháp ở chuột thiếu *CNGA3* mà cải thiện sự sống sót và chức năng của tế bào hình nón, cũng như thị lực.

Các ví dụ khác của gen gây bệnh có liên quan đến sự gây bệnh loạn dưỡng tế bào nón bao gồm *KCNV2*, *PDE6H*, *GNAT2* và *CACNA2D4*. Gen *KCNV2* mã hóa protein thành phần 2 siêu họ V cải biến kênh kali có cổng điện áp. Đột biến ở *KCNV2* liên quan đến loạn dưỡng tế bào nón với điện võng mạc đồ (ERG) tế bào que khác thường, hoặc loạn dưỡng tế bào nón võng mạc tếp 3B, rồi loạn gen lặn nhiễm sắc thể thường mà gây ra mất thị lực suốt đời kết hợp với đáp ứng ERG khác thường với ánh sáng chói nhấp nháy. Gen *PDE6H* mã hóa nhóm con (gamma) ức chế của phosphodiesteraza cGMP đặc hiệu tế bào nón. Đột biến ở gen này có liên quan đến loạn dưỡng tế bào nón võng mạc tếp 3A (RCD3A). Gen *GNAT2* mã hóa nhóm con alpha đặc hiệu tế bào nón của transducin. Đột biến ở gen có thể dẫn đến loạn dưỡng tế bào nón phát ở trẻ em. Gen *CACNA2D4* mã hóa nhóm con 4 alpha-2/delta, phụ thuộc điện áp, kênh canxi. Đột biến ở gen có thể gây ra loạn chức năng tế bào nón không tiến triển (loạn dưỡng tế bào nón võng mạc 4, RCD4).

Trong thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi tác (age-related macular degeneration - AMD), suy giảm thị lực chủ yếu do thoái hóa hồ giàu tế bào nón ở điểm vàng trung tâm gây ra. Vì vậy bệnh nhân mất thị lực trung tâm và tính sắc bén, nhưng thường có điểm vàng ngoại biên được bảo quản tương đối tốt và vì vậy có một số hình ảnh dư thừa hữu ích mà bị giới hạn bởi số ít ôi tế bào nón bên ngoài hồ.

Cần phát triển liệu pháp mà có thể cải thiện sự sống sót và chức năng tế bào nón, để điều trị hoặc ngăn ngừa rồi loạn võng mạc như loạn dưỡng tế bào nón-que.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất axit nucleic, đơn vị kiểm soát phiên mã (transcriptional control unit - TCU), trình tự gen được tối ưu hóa, cấu trúc biểu hiện, và vector để biểu hiện gen ở tế bào nhận sáng hình nón.

TCU được sáng chế mô tả chứa gen khởi đầu M-opsin hoặc mảnh của nó trong sự kiểm soát của vùng kiểm soát quỹ tích M/L-opsin (locus control region - LCR) và hữu ích để điều khiển mức biểu hiện cao ở tất cả ba loại tế bào nón của người.

Sáng chế còn đề xuất cấu trúc biểu hiện, chứa gen *CNGA3* của người trong sự kiểm soát của TCU được tối ưu hóa để biểu hiện gen ở tế bào nhận sáng hình nón, trong đó TCU chứa gen khởi đầu M-opsin hoặc mảnh của nó trong sự kiểm soát của vùng kiểm soát quỹ tích M/L-opsin.

Theo một số phương án, TCU và cấu trúc biểu hiện chứa đột biến của 6 bp ngay xuôi dòng của vị trí khởi đầu phiên mã ở gen khởi đầu M-opsin hoặc mảnh của nó (đột biến “M8”), trong đó đột biến có thể tăng tác dụng điều trị của vector và cấu trúc biểu hiện chứa đột biến này theo thời gian.

Sáng chế còn đề xuất trình tự tối ưu hóa codon của gen CNGA3, được đề xuất là SEQ ID NO:8.

Sáng chế còn đề xuất vector, như vector virus, chứa cấu trúc biểu hiện được sáng chế mô tả. Cấu trúc biểu hiện tốt hơn là được truyền sử dụng vector có nguồn gốc từ adenovirus kiểu huyết thanh 8 (AAV8) hoặc kiểu huyết thanh AAV mạnh tương tự.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sử dụng axit nucleic, đơn vị kiểm soát phiên mã (TCU), trình tự gen được tối ưu hóa, cấu trúc biểu hiện, và vector để điều trị và/hoặc ngăn ngừa rối loạn hoặc loạn dưỡng võng mạc, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở loạn dưỡng tế bào nón như mù màu.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất:

đơn vị kiểm soát phiên mã (TCU) dài lên đến 2500 nucleotit chứa theo hướng từ 5' đến 3':

(a) vùng kiểm soát quỹ tích (LCR) chứa

(i) SEQ ID NO 1; hoặc

(ii) trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự (a)(i) này;

và

(b) thành phần gen khởi đầu chứa

(i) ít nhất 200 nucleotit của SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 17; hoặc

(ii) trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự (b)(i) này;

TCU này biểu hiện hoạt động gen khởi đầu đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón.

Theo khía cạnh trên, thành phần gen khởi đầu (b) có thể tùy ý chứa ít nhất 200 hoặc 500 nucleotit cuối của SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 17, hoặc trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với 200 hoặc 500 nucleotit cuối của SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 17.

Theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên, thành phần gen khởi đầu (b) có thể chứa ít nhất 200 nucleotit của SEQ ID NO: 3, tùy ý trong đó thành phần gen khởi đầu (b) cũng chứa trình tự của ít nhất 10 nucleotit liền kề được chọn từ nucleotit 1 đến 35 của SEQ ID NO:3, hoặc trình tự chứa ít nhất 10 nucleotit liền kề được chọn từ trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với nucleotit 1 đến 35 của SEQ ID NO:3.

Theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên, thành phần gen khởi đầu (b) có thể chứa SEQ ID NO: 3 [thành phần gen khởi đầu 529 bp ở hG1.7] hoặc SEQ ID NO:5 [thành phần gen khởi đầu 247 bp ở hG1.4] hoặc trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO: 5.

Theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên, thành phần gen khởi đầu có thể còn chứa SEQ ID NO:16 [đột biến M8]. Ví dụ, theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên, nucleotit tương ứng với nucleotit 1934 đến 1939 (GGGCCG) của SEQ ID NO:2 có thể được thay thế bằng SEQ ID NO:16.

Theo một khía cạnh, TCU chứa SEQ ID NO: 4 [biến thể của cấu trúc gen khởi đầu hG1.7, mất bốn nucleotit], SEQ ID NO: 6 [cấu trúc hG1.4] hoặc SEQ ID NO:15 [cấu trúc gen khởi đầu hG1.7 ở sản phẩm].

Sáng chế cũng đề xuất cấu trúc biểu hiện chứa TCU được mô tả ở đây, trong đó TCU được liên kết có điều khiển với trình tự cần được biểu hiện theo cách đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón. Theo một phương án, trình tự được liên kết có điều khiển với TCU chứa gen mã hóa CNGA3, CNGB3, PDE6C, PDE6H, GNAT2, KCNV2 hoặc CACNA2D4. Theo một số phương án, trình tự được liên kết có điều khiển chứa SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc 14, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất 80% với SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc 14 và có khả năng cứu chức năng tế bào nhận sáng hình nón. Theo một phương án, trình tự được liên kết có điều khiển chứa SEQ ID NO: 8 [trình tự được tối ưu hóa codon CNGA3], hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất 80% với SEQ ID NO: 8 và có khả năng cứu chức năng tế bào nhận sáng hình nón.

Sáng chế cũng đề xuất vector chứa bất kỳ trong số axit nucleic, TCU, mảnh gen khởi đầu, gen được tối ưu hóa codon, và/hoặc cấu trúc biểu hiện được mô tả ở đây. Theo một số phương án, vector là vector virut.

Theo một số phương án, vector là vector AAV và/hoặc chứa hệ gen AAV hoặc dẫn xuất của nó. Theo một phương án, dẫn xuất là dẫn xuất khảm, được bố trí lại hoặc

được cải biến capsit. Theo một phương án, hệ gen AAV là từ kiểu huyết thanh có nguồn gốc tự nhiên hoặc thể phân lập hoặc nhánh của AAV. Theo một phương án, hệ gen AAV là từ kiểu huyết thanh AAV 2 (AAV2), kiểu huyết thanh AAV 4 (AAV4), hoặc kiểu huyết thanh AAV 8 (AAV8), và/hoặc capsit AAV có nguồn gốc từ AAV8. Theo phương án được ưu tiên, hệ gen có nguồn gốc từ AAV2 và capsit có nguồn gốc từ AAV8. Theo một phương án, vector AAV mang gen mã hóa CNGA3.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic hoặc vector được sáng chế mô tả, cũng như tế bào chủ tạo ra axit nucleic hoặc vector virut như được sáng chế mô tả. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào HEK293 hoặc HEK293T.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa axit nucleic hoặc vector được mô tả ở đây và chất mang được dụng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sử dụng axit nucleic, vector, trình tự gen được tối ưu hóa, và/hoặc cấu trúc biểu hiện được mô tả ở đây theo phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn võng mạc. Theo một phương án, axit nucleic, vector, trình tự gen được tối ưu hóa, và/hoặc cấu trúc biểu hiện được mô tả ở đây được sử dụng trong việc sản xuất thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn võng mạc. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn võng mạc ở bệnh nhân cần điều trị, bao gồm sử dụng lượng tác dụng chữa bệnh của vector được sáng chế mô tả. Theo một phương án, rối loạn võng mạc là mù màu. Theo một số phương án, vector được dùng cho bệnh nhân bằng cách tiêm võng mạc trực tiếp, dưới võng mạc, hoặc trong thể kính.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện kết quả của nghiên cứu biểu hiện gen chỉ thị *in vivo* ở chuột chuyển gen để đánh giá tác dụng vị trí của vùng kiểm soát quỹ tích (LCR) trên gen khởi đầu lõi opsin xanh lá (M). Trên cùng bên trái: mảng gen sắc tố đỏ và xanh bình thường của người thể hiện vị trí của LCR, đơn vị phiên mã, và exon. Phía dưới bên trái: mảng gen sắc tố hình ảnh được cải biến được thể hiện ở tỷ lệ phóng to gấp 10 lần. Vị trí khởi đầu và hướng phiên mã được thể hiện bằng các mũi tên. P_{đỏ} = gen khởi đầu sắc tố đỏ của người. P_{xanh lá} = gen khởi đầu sắc tố xanh của người. AP, phosphatase kiềm nhau thai của người. lacZ, *E. coli* β -galactosidaza. Phải: Biểu đồ hình tròn thể hiện phần tế bào biểu hiện chuyển gen chỉ thể hiện AP (đỏ), chỉ lacZ (xanh đậm), cả AP và lacZ (vàng), hoặc lacZ>>AP (xanh nhạt) trong chuột chuyển nhiễm tế bào mầm hoặc khám cho cấu

trúc thể hiện bên trái. Số lượng tế bào từ các con chuột khác nhau có nguồn gốc từ cùng dòng tế bào ES đã được gộp lại để tạo ra một biểu đồ hình tròn. Số lượng tế bào cho các dòng chuột mà từ đó đánh dấu PGK-neo được loại bỏ bằng cách lai với chuột tạo tế bào mầm được thể hiện ngay ở bên phải của biểu đồ hình tròn cho dòng cha mẹ tương ứng.

Fig. 2 thể hiện sơ đồ về sự sắp xếp nhiễm sắc thể của gen khởi đầu opsin đỏ (L-) và xanh lá (M-) (trong hộp, hàng đầu). Các sơ đồ trước đây đã phát triển phiên mã đơn vị (pR2.1 và PR1,7), cũng như đơn vị kiểm soát phiên mã thiết kế bọc lộ trong nghiên cứu này. LCR = Vùng kiểm soát quỹ tích.

Fig. 3 minh họa mẫu chuyển nhiễm của tế bào hình nón được chuyển nhiễm với vectơ AAVssh10 biểu hiện protein huỳnh quang xanh (GFP) trong sự kiểm soát của hG1.4 TCU. Được thể hiện là các phân đoạn của võng mạc có nguồn gốc tế bào gốc phôi của người được chuyển nhiễm với AAVshh10-hG1.4(M8)-GFP. Mẫu chuyển nhiễm của tế bào hình nón được hiển thị hóa bởi hình ảnh GFP (A). Đồng khu trú opsin xanh lam (S-opsin; B) với GFP (B') và opsin đỏ/xanh lá (L/M-opsin; C) với GFP (C') được chỉ định sau khi nhuộm sử dụng kháng thể liên kết với opsin xanh lam (S-opsin) hoặc opsin đỏ/xanh lá (L/M opsin).

Fig. 4 minh họa rằng việc bao gồm trình tự M8 ở TCU nâng cao sự cứu đáp ứng quang phổ ở chuột loại *CNGA3*. Các đáp ứng điện võng mạc đồ (ERG) chói của chuột loại *Cnga3* được điều trị với vectơ AAV2/8 mang cấu trúc CNGA3 tối ưu hóa codon (coCNGA3) được điều khiển bởi các TCU khác nhau có hoặc không có trình tự M8 được thể hiện. Các đáp ứng ERG ở 1 tháng (thanh bên trái) và 2 tháng (thanh bên phải) sau khi tiêm được thể hiện. Tất cả động vật được điều trị khi được 1 tháng tuổi, trừ nhóm ở cực bên phải; nhóm này được điều trị sau 2 tuần.

Fig. 5 minh họa rằng CNGA3 tối ưu hóa codon cứu đáp ứng quang phổ ở chuột loại *CNGA3* tác dụng nhiều hơn gen *CNGA3* kiểu dại. Các đáp ứng ERG chói ở chuột loại *Cnga3* được điều trị với vectơ AAV2/8 mang cấu trúc CNGA3 tối ưu hóa codon ("co") và CNGA3 kiểu dại ("non-co").

Fig. 6 minh họa rằng vectơ AAV2/8 biểu hiện CNGA3 trong sự kiểm soát của hG1.4 TCU tác dụng trong việc khôi phục chức năng tế bào nón ở chuột loại *CNGA3*. (A) Dấu vết ERG chói của chuột loại *Cnga3* được điều trị và không được điều trị AAV8. Sóng A và B được chú thích. Trục Y biểu thị μV . Cài đặt độ sáng: 10 Cdsm^{-2} . (B) Các

đáp ứng ERG chói của chuột loại *Cnga3* được điều trị với AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3 hoặc AAV2/5-hG1.4(M8).coCNGA3. Cài đặt độ sáng: 10 Cds m^{-2} .

Fig. 7 minh họa cho việc cứu độ nhảy võng mạc *in vivo* dài hạn với vectơ AAV2/8 biểu hiện CNGA3 trong sự kiểm soát hai TCU được tối ưu hóa khác nhau lên đến 6 tháng sau khi điều trị. Các con chuột thiếu *Cnga3* được tiêm dưới võng mạc ở 2 tuần tuổi với AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3 (n=14) hoặc AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3 (n=13) (chuẩn độ 1×10^{12} vg/ml cho cả hai). Không được điều trị (n=3). Cài đặt độ sáng: 10 Cds m^{-2} .

Fig. 8 minh họa việc sống sót tăng của tế bào nón *in vivo* 3-4 tháng sau khi điều trị với vectơ AAV2/8 biểu hiện CNGA3 trong sự kiểm soát của hG1.7 TCU. Hình ảnh đồng tiêu mặt phẳng đơn của võng mạc ngàm phẳng từ chuột C57BL/6J 3-4 tháng tuổi (A) hoặc chuột thiếu *Cnga3* cùng tuổi không được tiêm (B) hoặc tiêm (C) với AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3 lúc 2 tuần tuổi. Võng mạc được nhuộm bằng arrestin hình nón và làm sạch. Thanh tỷ lệ: 5 μm .

Fig. 9 minh họa việc sống sót tăng của tế bào nón *in vivo*, 13 tháng sau khi điều trị với vectơ AAV2/8 biểu hiện CNGA3 trong sự kiểm soát của hG1.7 TCU. Hình ảnh tiêu điểm chiều Z (A, B) hoặc hình ảnh tiêu điểm một mặt phẳng (C, D) của võng mạc ngàm phẳng từ chuột thiếu *Cnga3* 14 tháng tuổi được tiêm AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3 lúc 2 tuần tuổi. Không được điều trị thể hiện không nhuộm PNA dương tính ở tuổi này. Các ngàm phẳng võng mạc được nhuộm bằng PNA (A, C) và arrestin hình nón (B, D) và làm sạch. Thanh tỷ lệ: 10 μm (A, B), 5 μm (C, D).

Fig. 10 minh họa định lượng cải thiện tính toàn vẹn của khớp thần kinh giữa tế bào hình nón và các tế bào thần kinh hỗ trợ (tế bào lưỡng cực) *in vivo* 3-4 tháng sau khi điều trị với vectơ AAV2/8 biểu hiện CNGA3 trong sự kiểm soát của hG1.7 TCU. Đánh giá được thực hiện sử dụng cường độ tín hiệu của điểm đánh dấu khớp thần kinh Gpr179. Phân tích cường độ tín hiệu nhuộm Gpr179 được thực hiện trên hình ảnh đồng tiêu mặt phẳng đơn của võng mạc gắn kết phẳng từ chuột C57BL/6J 3-4 tháng tuổi hoặc chuột thiếu *Cnga3* cùng độ tuổi không được tiêm hoặc tiêm AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3 lúc 2 tuần tuổi. Võng mạc được nhuộm bằng Gpr179 và PNA và sau đó làm sạch. Các vết bản Gpr179 được truy tìm bằng cách vẽ đường liên tục không đều trên một số nhuộm

Gpr179 liên quan cuống hình nón (nhuộm PNA được sử dụng để xác nhận các cuống hình nón) và hơn 10 nhuộm màu Gpr179 liên quan hình cầu nhỏ que (A). Cường độ tín hiệu là đầu ra (B; vạch trắng: Gpr179, vạch đỏ: PNA). Đỉnh của cường độ tín hiệu từ mỗi điểm gốc được tính trung bình, và tỷ lệ GPr179 liên quan cuống hình nón với hình que (CP/RS) được tính toán. CP/RS từ bốn địa điểm khác nhau được sử dụng để phân tích thống kê (kiểm định so sánh nhiều nhóm Bonferroni (ns: $p > 0,05$, **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$)). Thanh báo lỗi chỉ ra SEM. (C).

Fig. 11 minh họa rằng biểu hiện của CNGA3 trong sự kiểm soát của hG1.4 TCU ở vector AAV8 dẫn đến đáp ứng ERG cải thiện ở chuột thiếu *CNGA3* so với vector AAV Anc80L65, AAV44.9, hoặc AAV5, tương ứng. (A). So sánh Anc80L65 và AAV8. AAV-Anc80L65 hoặc AAV8 mang caset biểu hiện hG1.4(M8).coCNGA3 được truyền đến chuột thiếu *Cnga3* ở 2 tuần tuổi. **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$. Thanh báo lỗi chỉ ra SEM. (B). So sánh AAV8 và AAV44.9 để giao CNGA3 ở chuột thiếu *Cnga3* lúc 4 tuần tuổi. Thanh báo lỗi chỉ ra SEM. (C) So sánh AAV5 và AAV8. AAV5 hoặc AAV8 mang caset biểu hiện hG1.4(M8).coCNGA3 được truyền đến chuột thiếu *Cnga3* ở 2 tuần tuổi. **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$. Thanh báo lỗi chỉ ra SEM.

Fig. 12 minh họa mức biểu hiện cải thiện cho TCU hG1.4 và hG1.7 mang đột biến M8 so với mức biểu hiện quan sát được cho gen khởi đầu hình nón đã biết. (A) hEB từ 17-19 tuần tuổi được chuyển nhiễm với eGFP biểu hiện AAVShH10 trong hai gen khởi đầu opsin xanh lá khác nhau (hG1.4 và hG1.7) và được thu thập 2 tuần sau đó ($n = 6-8$ cho mỗi gen khởi đầu). Sau khi phân ly, tế bào được phân tích về cường độ huỳnh quang trung bình tương đối (MFI) trong tế bào dương tính GFP (MFI tương đối trong hEB được chuyển nhiễm hEB bằng AAVShH10-eGFP được phân tích trong thí nghiệm cùng ngày được tính theo tỷ lệ với MFI trong EB được chuyển nhiễm với AAV ShH10-1.7L-eGFP) bằng phương pháp đo tế bào dòng. Dấu hoa thị biểu thị sự khác biệt đáng kể ($p \leq 0,01$). Thanh báo lỗi chỉ ra SEM. (B) Các đáp ứng ERG chổi của chuột loại *Cnga3* đã điều trị được điều trị với AAV2/8-CAR-CNGA3 hoặc bỏ không điều trị. Trục Y biểu thị μV . Cài đặt độ sáng: 10 Cds m^{-2} .

Mô tả văn tắt trình tự

SEQ ID NO: 1 thể hiện trình tự ADN của 1,2 mảnh kb của vùng kiểm soát quỹ tích M/L opsin của người.

SEQ ID NO:2 thể hiện trình tự ADN của mảnh 2,0 kb của gen khởi đầu M opsin của người.

SEQ ID NO:3 thể hiện trình tự ADN của mảnh 500 bp của gen khởi đầu M opsin của người.

SEQ ID NO:4 thể hiện trình tự ADN của biến thể của cấu trúc hG1.7(M8), bao gồm mảnh 1,2 kb của vùng kiểm soát quỹ tích M/L opsin của người theo sau là mảnh 500 bp của gen khởi đầu M opsin của người, mảnh gen khởi đầu opsin này bao gồm đột biến M8.

SEQ ID NO:5 thể hiện trình tự ADN của mảnh 200 bp của gen khởi đầu M opsin của người.

SEQ ID NO:6 thể hiện trình tự cADN của cấu trúc hG1.4(M8), bao gồm mảnh 1,2 kb của vùng kiểm soát quỹ tích M/L opsin của người theo sau là mảnh 200 bp của gen khởi đầu M opsin của người, mảnh gen khởi đầu opsin này bao gồm đột biến M8.

SEQ ID NO:7 thể hiện trình tự cADN của gen *CNGA3* của người.

SEQ ID NO:8 thể hiện trình tự cADN tối ưu hóa codon của gen *CNGA3* của người.

SEQ ID NO:9 thể hiện trình tự cADN của gen *PDE6C* của người.

SEQ ID NO:10 thể hiện trình tự cADN của gen *PDE6H* của người.

SEQ ID NO:11 thể hiện trình tự cADN của gen *GNAT2* của người.

SEQ ID NO:12 thể hiện trình tự cADN của gen *KCNV2* của người.

SEQ ID NO:13 thể hiện trình tự cADN của gen *CACNA2D4* của người.

SEQ ID NO:14 thể hiện trình tự cADN của gen *CNGB3* của người.

SEQ ID NO:15 thể hiện trình tự ADN của cấu trúc hG1.7(M8), chứa mảnh 1,2 kb của vùng kiểm soát quỹ tích M/L opsin của người theo sau là trình tự GATC, và mảnh 500 bp của gen khởi đầu M opsin của người, mảnh gen khởi đầu opsin này bao gồm đột biến M8.

SEQ ID NO:16 thể hiện trình tự của đột biến M8.

SEQ ID NO:17 thể hiện trình tự ADN của mảnh 2,0 kb của gen khởi đầu M opsin của người chứa đột biến M8.

Mô tả chi tiết sáng chế

Cần được hiểu rằng các ứng dụng khác nhau của trình tự polynucleotit được bộc lộ có thể được điều chỉnh với nhu cầu cụ thể trong lĩnh vực kỹ thuật. Cũng cần được hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ nhằm mục đích mô tả phương án cụ thể của sáng chế, và không nhằm giới hạn.

Ngoài ra, như được sử dụng trong bản mô tả này và bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo, dạng số ít bao gồm số nhiều trừ khi nội dung rõ ràng chỉ ra khác. Vì vậy, ví dụ, tham khảo đến “polynucleotit” bao gồm “các polynucleotit”, tham khảo đến “gen khởi đầu” bao gồm “các gen khởi đầu”, tham khảo đến “vector” bao gồm hai hoặc nhiều vector này, và tương tự. “M/L opsin” và “L/M opsin” được sử dụng thay phiên nhau dùng để chỉ opsin xanh lá và đỏ.

Tất cả các công bố, patent và đơn xin cấp patent được nêu ở đây, cho dù ở trên hoặc ở dưới, đều được kết hợp bằng cách tham khảo toàn bộ nội dung của chúng.

Đơn vị kiểm soát phiên mã (TCU)

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất TCU được tối ưu hóa để biểu hiện gen ở tế bào nhận sáng hình nón. Theo một phương án, sáng chế đề xuất TCU mà chứa mảnh của vùng kiểm soát quỹ tích (LCR) M/L opsin. Theo phương án được ưu tiên, TCU chứa mảnh của vùng kiểm soát quỹ tích (LCR) M/L opsin của người.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất TCU mà chứa vùng gen khởi đầu, như gen khởi đầu M opsin hoặc mảnh của nó. Theo phương án được ưu tiên, TCU được sáng chế mô tả chứa gen khởi đầu M opsin của người hoặc mảnh của nó.

Theo một số phương án, TCU chứa mảnh và/hoặc biến thể của vùng kiểm soát quỹ tích (LCR) M/L opsin của người và gen khởi đầu M-opsin của người hoặc mảnh của nó, trong đó TCU có hoạt động gen khởi đầu đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón.

Theo một phương án, TCU chứa LCR mà chứa trình tự của nucleotit, thông thường là nucleotit liên kề, từ SEQ ID NO:1 mà tạo ra biểu hiện đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón của trình tự polynucleotit được liên kết có điều khiển. Còn được dự định là LCR chứa trình tự mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, LCR chứa xóa hoặc chèn một hoặc nhiều nucleotit, trong đó việc xóa hoặc

chèn không xóa bỏ biểu hiện đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón của tải trọng gen được liên kết hoạt động với LCR được cải biến.

Theo một phương án, TCU chứa gen khởi đầu M opsin hoặc mảnh của nó, trong đó gen khởi đầu M opsin hoặc mảnh của nó chứa trình tự của nucleotit, thông thường là nucleotit liên kề, từ SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO:17 mà tạo ra biểu hiện đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón trên trình tự polynucleotit được liên kết có điều khiển. Gen khởi đầu M opsin hoặc mảnh của nó có thể, ví dụ, chứa lên đến 1200 nucleotit của SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:17, và tốt hơn là không quá 1100, không quá 1000, không quá 900, không quá 800, không quá 700, không quá 600, không quá 500, không quá 400, không quá 300, hoặc không quá 200 nucleotit của SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:17. Theo một số phương án, mảnh gen khởi đầu M opsin chứa ít nhất 200, 300, 400 hoặc 500 nucleotit của SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:17. Còn được dự định là mảnh gen khởi đầu M opsin có độ tương đồng trình tự ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với ít nhất 200, ít nhất 300, ít nhất 400, hoặc ít nhất 500 nucleotit liên kề của SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:17. Theo một số phương án, gen khởi đầu M-opsin hoặc mảnh của nó chứa xóa hoặc chèn một hoặc nhiều nucleotit, trong đó việc xóa hoặc chèn không xóa bỏ biểu hiện đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón của tải trọng gen được liên kết hoạt động với gen khởi đầu M-opsin được cải biến hoặc mảnh. Theo một số phương án, gen khởi đầu M-opsin hoặc mảnh của nó về cơ bản bao gồm SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:17. Theo một số phương án, gen khởi đầu M-opsin hoặc mảnh của nó bao gồm SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO:17.

Tốt hơn là, TCU chứa mảnh gen khởi đầu M opsin mà chứa SEQ ID NO: hoặc trình tự về cơ bản giống hệt với SEQ ID NO:3. Còn được dự định là TCU chứa mảnh gen khởi đầu M opsin mà chứa ít nhất 200, ít nhất 300, ít nhất 400, hoặc ít nhất 500 nucleotit của SEQ ID NO:3 hoặc trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với ít nhất 200, ít nhất 300, ít nhất 400, hoặc ít nhất 500 nucleotit của SEQ ID NO: 3. Theo một số phương án, mảnh gen khởi đầu M opsin về cơ bản bao gồm SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, mảnh gen khởi đầu M opsin bao gồm SEQ ID NO:3.

Theo một số phương án, TCU chứa ít nhất 200 nucleotit của SEQ ID NO:3 hoặc trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với ít nhất 200 nucleotit của SEQ ID NO:3

và trình tự chứa ít nhất 10, ít nhất 15, ít nhất 20, ít nhất 25, ít nhất 30 hoặc ít nhất 35 nucleotit liền kề của nucleotit 1-35 của SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, TCU chứa ít nhất 200 nucleotit của SEQ ID NO:3 hoặc trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với ít nhất 200 nucleotit của SEQ ID NO:3 và trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với ít nhất 10, ít nhất 15, ít nhất 20, ít nhất 25, ít nhất 30 hoặc ít nhất 35 nucleotit liền kề tương ứng với nucleotit 1-35 của SEQ ID NO:3.

Tốt hơn là, TCU chứa mảnh gen khởi đầu M opsin mà chứa SEQ ID NO:5 hoặc trình tự về cơ bản giống hệt với SEQ ID NO:5. Theo một số phương án, mảnh gen khởi đầu M opsin về cơ bản bao gồm SEQ ID NO:5. Theo một số phương án, mảnh gen khởi đầu M opsin bao gồm SEQ ID NO:5.

Gen khởi đầu bổ sung và mảnh của nó được dự định để sử dụng ở TCU là gen khởi đầu hoặc mảnh gen khởi đầu mà khác biệt về trình tự với trình tự ở trên nhưng giữ được hoạt động gen khởi đầu đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón. Các trình tự này có độ tương đồng trình tự ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự của nucleotit liền kề từ SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:17 như được xác định ở trên. Tỷ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự của biến thể tốt hơn là được xác định trên toàn bộ độ dài của phần tương ứng của SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:17, hoặc trên 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 hoặc 1200 phần nucleotit của SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:17 phù hợp với trình tự biến thể. Còn được dự định là gen khởi đầu và mảnh của nó mà chứa trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với SEQ ID NO:3 và/hoặc SEQ ID NO:5.

Độ tương đồng trình tự có thể được tính toán sử dụng bất kỳ thuật toán phù hợp nào. Ví dụ, các thuật toán PILEUP và BLAST có thể được sử dụng để tính toán độ tương đồng hoặc xếp hàng trình tự (như xác định trình tự tương đương hoặc tương ứng (thông thường là trên cài đặt mặc định của chúng), ví dụ như được mô tả ở Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Thuật toán này liên quan đến việc xác định cặp trình tự điểm cao (HSPs) trước tiên bằng cách xác định các từ ngắn của độ dài W trong trình tự truy vấn phù hợp hoặc thỏa mãn một số điểm ngưỡng có giá trị dương T khi được căn chỉnh với một từ cùng độ dài trong trình tự cơ sở dữ

liệu. T được dùng để chỉ ngưỡng điểm từ vùng lân cận (Altschul et al, supra). Các lượt truy cập từ vùng lân cận ban đầu này đóng vai trò là hạt giống để bắt đầu tìm kiếm để tìm HSP chứa chúng. Các từ truy cập được mở rộng theo cả hai hướng dọc theo mỗi trình tự chừng nào điểm căn chỉnh tích lũy có thể được tăng. Các phần mở rộng cho các lượt truy cập từ trong mỗi hướng bị dừng lại khi: điểm căn chỉnh tích lũy giảm bởi đại lượng X so với giá trị đạt được lớn nhất của nó; điểm tích lũy bằng 0 hoặc thấp hơn, do sự tích lũy của một hoặc nhiều căn chỉnh phần dư cho điểm âm; hoặc phần cuối của một trong hai trình tự đạt được. Các tham số thuật toán BLAST W, T và X xác định độ nhạy và tốc độ căn chỉnh. Chương trình BLAST sử dụng độ dài từ mặc định (W) là 11, ma trận điểm BLOSUM62 (xem Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919) căn chỉnh (B) là 50, kỳ vọng (E) là 10, M = 5, N = 4 và so sánh cả hai sợi.

Thuật toán BLAST thực hiện phân tích thống kê về sự giống nhau giữa hai trình tự; ví dụ xem, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787. Một thước đo sự giống nhau được đề xuất bởi thuật toán BLAST là xác suất tổng nhỏ nhất (P(N)), đề xuất dấu hiệu của xác suất nhờ đó sự kết hợp giữa hai trình tự polynucleotit hoặc axit amin sẽ tình cờ xảy ra. Ví dụ, trình tự được coi là tương tự như trình tự khác nếu xác suất tổng nhỏ nhất khi so trình tự đầu tiên với trình tự thứ hai ít hơn khoảng 1, tốt hơn là ít hơn khoảng 0,1, tốt hơn nữa là ít hơn khoảng 0,01, và tốt nhất là ít hơn khoảng 0,001. Tương tự, UWGCG Gói cung cấp chương trình BESTFIT có thể được sử dụng để tính toán độ tương đồng (ví dụ được sử dụng trên cài đặt mặc định của nó) (Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395).

Theo một số phương án, TCU chứa gen khởi đầu M-opsin hoặc mảnh của nó mà chứa trình tự đột biến M8 TCTAGA (SEQ ID NO:16). Theo một phương án, TCU chứa gen khởi đầu M-opsin hoặc mảnh của nó mà chứa, một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu nucleotit của SEQ ID NO:16. Ví dụ, nucleotit tương ứng với nucleotit từ 1934 đến 1939 (GGGCCG) của SEQ ID NO:2 có thể được thay thế bằng SEQ ID NO:16.

Theo một số phương án, TCU bao gồm trình tự nucleotit bổ sung không tự nhiên tìm thấy trong LCR M/L opsin và/hoặc vùng gen khởi đầu M-opsin. Trình tự nucleotit bổ sung có thể là 5' hoặc 3' của LCR hoặc vùng gen khởi đầu M-opsin. Theo một số phương án, trình tự bổ sung nằm giữa LCR và vùng gen khởi đầu M-opsin. Theo một phương án, trình tự "GATC" nằm giữa vùng LCR và vùng M-opsin.

Theo một phương án, TCU chứa SEQ ID NO:4. Theo một phương án, TCU chứa SEQ ID NO:6. Theo một phương án, TCU chứa SEQ ID NO:15.

Còn được dự định là TCU chứa trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:15.

Theo một phương án, TCU về cơ bản bao gồm SEQ ID NO:4. Theo một phương án, TCU về cơ bản bao gồm SEQ ID NO:6. Theo một phương án, TCU về cơ bản bao gồm SEQ ID NO:15.

Theo một phương án, TCU bao gồm SEQ ID NO:4. Theo một phương án, TCU bao gồm SEQ ID NO:6. Theo một phương án, TCU bao gồm SEQ ID NO:15.

TCU có thể còn được định vị ở bất cứ đâu trong trình tự lớn hơn miễn là hoạt động gen khởi đầu đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón giữ được. Theo các phương án, TCU được mô tả ở đây nằm ở vị trí 5', hoặc ngay 5', với gen cần được biểu hiện (ví dụ, tải trọng) theo cách đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón như được mô tả ở đây.

TCU cũng có thể được sử dụng song song với các thành phần điều hòa khác như một hoặc nhiều gen khởi đầu, chất tăng cường và/hoặc LCR khác.

TCU có thể được đề xuất ở dạng phân tử axit nucleic phân lập.

TCU được đề xuất bởi sáng chế có thể được sử dụng để dẫn biểu hiện của gen (tải trọng) ở tế bào nhận sáng hình nón theo cách đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón. Biểu hiện đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón có thể được xác định dưới dạng biểu hiện mà chỉ có mặt ở tế bào nhận sáng hình nón, nhưng không đáng kể trong các loại tế bào khác. Biểu hiện đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón có thể được xác định dưới dạng biểu hiện lớn hơn khoảng 10 lần, lớn hơn 20 lần, lớn hơn 50 lần hoặc lớn hơn 100 lần trở lên ở tế bào nhận sáng hình nón so với các loại tế bào khác, đặc biệt là tế bào nhận sáng hình que. Biểu hiện ở tế bào nhận sáng hình nón và các loại tế bào khác có thể được xác định bằng bất kỳ kỹ thuật tiêu chuẩn phù hợp nào được biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, mức biểu hiện ARN có thể được xác định bằng PCR thời gian thực định lượng. Biểu hiện protein có thể được xác định bằng phương pháp thấm phương tây hoặc hóa mô miễn dịch. TCU được đề xuất ở đây cung cấp biểu hiện của gen được liên kết có điều khiển ở tất cả kiểu phụ tế bào nhận sáng hình nón.

TCU được đề xuất bởi sáng chế có thể được sử dụng để dẫn biểu hiện gen tăng đáng kể ở tế bào nhận sáng hình nón so với TCU hoặc gen khởi đầu tham khảo. Biểu hiện tăng đáng kể có thể được xác định là nhiều hơn khoảng 10 lần, 20 lần, 50 lần, 100 lần, 200 lần hoặc 300 lần biểu hiện của gen ở tế bào nhận sáng hình nón khi so với biểu hiện được dẫn bởi TCU hoặc gen khởi đầu tham khảo, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở gen khởi đầu M-opsin ban đầu. Biểu hiện ở tế bào nhận sáng hình nón và các loại tế bào khác có thể được xác định bởi kỹ thuật chuẩn thích hợp bất kỳ được biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, mức biểu hiện ARN có thể được xác định bằng PCR thời gian thực định lượng. Biểu hiện protein có thể được xác định bằng thẩm tách tây hoặc hóa mô miễn dịch.

TCU được đề xuất bởi sáng chế có thể được sử dụng để dẫn biểu hiện của protein mã hóa trình tự nucleotit ở tế bào nhận sáng hình nón, bao gồm trình tự nucleotit biểu hiện protein mà không được biểu hiện bình thường ở tế bào nhận sáng hình nón như GFP.

Ví dụ, TCU được đề xuất theo sáng chế hữu ích để biểu hiện gen ở tế bào nhận sáng hình nón cần thiết cho chức năng bình thường của tế bào nhận sáng hình nón, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, nhóm con protein G(t) liên kết nucleotit guanin alpha-2 (GNAT2), kênh cation nucleotit tạo vòng alpha-3 (CNGA3), kênh cation nucleotit tạo vòng beta-3 (CNGB3), nhóm con phosphodiesteraza vòng 3',5' đặc hiệu cGMP hình nón alpha' (PDE6C), nhóm con gamma phosphodiesteraza vòng 3', 5' cGMP nhạy với rhodopsin tế bào nón võng mạc (PDE6H), thành phần 2 siêu họ V kênh cổng điện áp kali (KCNV2), và nhóm con alpha-2/delta-4 kênh canxi phụ thuộc vào điện áp (CACNA2D4), là protein thiết yếu cho chức năng bình thường của tế bào nón. Như vậy, sáng chế đề xuất TCU và phương pháp biểu hiện, ví dụ, gen *GNAT2*, *CNGA3*, *CNGB3*, *PDE6C*, *PDE6H*, *KCNV2*, và *CACNA2D4* ở tế bào nhận sáng hình nón. Các gen *PDE6C*, *GNAT2*, *CNGA3* và *CNGB3* là bốn gen đóng góp vào mù màu. PDE6C là nhóm con alpha của phosphodiesteraza vòng 3',5' đặc hiệu cGMP hình nón. GNAT2 là thành phần alpha của transducin hình nón, thành phần thiết yếu của phân cấp truyền dẫn quang hình nón. CNGA3 là nhóm con alpha của kênh ion tạo nucleotit vòng hình nón, đóng đáp ứng với ánh sáng, do đó siêu phân cực tế bào hình nón. CNGB3 là nhóm con beta của kênh ion tạo nucleotit vòng hình nón, đóng đáp ứng với ánh sáng, do đó siêu phân cực tế bào hình nón.

Cấu trúc biểu hiện

Sáng chế cũng đề xuất cấu trúc biểu hiện chứa TCU được sáng chế mô tả, được liên kết có điều khiển với trình tự, như trình tự gen, cần được biểu hiện theo cách đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón.

Thuật ngữ “được liên kết có điều khiển” dùng để chỉ vị trí kề nhau trong đó thành phần được mô tả đang ở trong mối quan hệ cho phép chúng có chức năng theo cách dự định của chúng. Trình tự kiểm soát “được liên kết có điều khiển” với trình tự mã hóa được buộc theo cách mà biểu hiện của trình tự mã hóa đạt được trong điều kiện tương thích với trình tự kiểm soát. Nhiều bản sao polynucleotit giống nhau hoặc khác nhau có thể được đưa vào cấu trúc biểu hiện. Cấu trúc biểu hiện có thể được xác định là trình tự polynucleotit có khả năng điều khiển biểu hiện protein từ trình tự polynucleotit chứa trình tự mã hóa.

Vì vậy, cấu trúc biểu hiện ví dụ có thể chứa trình tự mã hóa *PDE6H*, *PDE6C*, *GNAT2*, *KCNV2*, *CACNA2D4*, *CNGA3* hoặc *CNGB3*, ví dụ polynucleotit được chọn từ SEQ ID NO: 7 đến 14, hoặc biến thể của SEQ ID NO: 7 đến 14 mà giữ được chức năng của protein dịch mã từ trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 7 đến 14.

Biến thể của polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 7 đến 14 có thể được xác định dưới dạng biến thể bất kỳ của trình tự của SEQ ID NO: 7 đến 14, bao gồm biến thể có trong tự nhiên ở trình tự axit nucleic. Biến thể có thể được xác định là có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với SEQ ID NO 7 đến 14, trong đó polypeptit được dịch mã từ trình tự biến thể giữ được chức năng của nó. Biến thể có thể được xác định là có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với SEQ ID NO 7 đến 14, trong đó polypeptit được dịch mã từ trình tự biến thể có khả năng cứu chức năng tế bào nhận sáng hình nón. Theo các phương án, biến thể là phiên bản được tối ưu hóa codon của trình tự mã hóa.

Cấu trúc biểu hiện được dự định theo sáng chế có thể tái tạo chức năng tế bào nhận sáng hình nón. Việc cứu chức năng tế bào nhận sáng hình nón có thể được xác định là phục hồi ít nhất khoảng 50%, 60%, 70%, 80% 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% chức năng tế bào nhận sáng hình nón. Chức năng tế bào nhận sáng hình nón có thể được phân tích bởi kỹ thuật chuẩn thích hợp bất kỳ được biết với người có hiểu

biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng phân tích điện học của đáp ứng võng mạc.

Việc cứu chức năng tế bào nhận sáng hình nón cũng có thể được xác định là kéo dài sự sống sót tế bào nón. Việc kéo dài sự sống sót tế bào nón có thể được xác định là kéo dài thời gian mà tế bào nhận sáng hình nón có chức năng khoảng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% hoặc lớn hơn 100% khi so với tế bào nhận sáng hình nón bị ảnh hưởng bởi loạn dưỡng tế bào nón. Chức năng tế bào nhận sáng hình nón có thể được phân tích bởi kỹ thuật chuẩn thích hợp bất kỳ được biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng phân tích điện học của đáp ứng võng mạc. Ví dụ của kéo dài sự sống sót tế bào nón cũng bao gồm cải thiện hoạt động ERG hoặc làm chậm việc mất hoạt động ERG, cải thiện độ nhạy võng mạc hoặc làm chậm/tạm dừng việc mất độ nhạy võng mạc tiến triển, làm chậm hoặc tạm dừng việc mất tế bào nhận sáng, cải thiện thị lực hoặc làm chậm/tạm dừng việc mất thị lực.

Cấu trúc biểu hiện theo sáng chế có thể chứa TCU được liên kết có điều khiển với gen *CNGA3*. Theo một số phương án, trình tự gen *CNGA3* chứa SEQ ID NO:7. Theo một số phương án, gen *CNGA3* chứa trình tự tối ưu hóa codon. “Sự tối ưu hóa codon” đề cập đến quá trình thay đổi trình tự polynucleotit có trong tự nhiên để nâng cao biểu hiện trong sinh vật đích, ví dụ, người. Theo một phương án của sáng chế, gen *CNGA3* của người, SEQ ID NO:7, đã được tối ưu hóa để tạo SEQ ID NO:8. Trong cADN *CNGA3* đã tối ưu hóa của SEQ ID NO:8 codon hiếm đã được thay thế bằng codon xảy ra thường xuyên hơn và/hoặc codon thường xuyên được tìm thấy ở gen được biểu hiện cao của người.

Theo một phương án, cấu trúc biểu hiện chứa TCU được liên kết có điều khiển với SEQ ID NO:8.

Vector

Sáng chế đề xuất vector chứa axit nucleic, TCU, gen khởi đầu và mảnh của nó, gen được tối ưu hóa, và cấu trúc biểu hiện được sáng chế mô tả. Vector có thể là loại bất kỳ, ví dụ, nó có thể là vector plasmid hoặc ADN vòng mini.

Hiệu quả của liệu pháp nói chung là phụ thuộc vào phân phối đầy đủ và hiệu quả của ADN hiến tặng. Quá trình này thường là qua trung gian bởi vector virus. Như vậy,

sáng chế đề xuất vectơ virus, có thể dựa trên, ví dụ, trên virus herpes simplex, adenovirus, hoặc lentivirus. Vectơ virus có thể là vectơ virus liên hợp adeno (AAV) hoặc dẫn xuất của nó. AAV là vectơ đặc biệt hấp dẫn vì nó thường không gây bệnh; phần lớn mọi người đã bị nhiễm virus này trong suốt cuộc đời của họ mà không có tác dụng bất lợi. Đặc quyền miễn dịch của mô mắt, kết quả của rào cản giải phẫu và yếu tố điều hòa miễn dịch, làm cho mắt phần lớn được miễn đáp ứng miễn dịch bất lợi.

Theo một phương án, vectơ virus chứa hệ gen AAV từ kiểu huyết thanh, thể phân lập hoặc nhánh của AAV, hoặc dẫn xuất của nó có nguồn gốc tự nhiên.

“Hệ gen AAV” là trình tự polynucleotit mà mã hóa chức năng cần thiết để sản xuất hạt virus AAV. Các chức năng này bao gồm hoạt động trong chu trình sao chép và đóng gói cho AAV ở tế bào chủ, bao gồm tự tạo bọc hệ gen AAV thành hạt virus AAV. Các virus AAV có trong tự nhiên thiếu sao chép và dựa vào sự cung cấp của chức năng trợ giúp ở *trans* để hoàn thành chu trình sao chép và đóng gói. Do đó và bằng sự loại bỏ bổ sung gen *rep* và *cap* AAV, hệ gen AAV của vectơ theo sáng chế thiếu sao chép.

Hệ gen AAV có thể ở dạng sợi đơn, chiều dương hoặc âm, hoặc theo cách khác ở dạng sợi kép. Việc sử dụng dạng sợi kép cho phép bỏ qua bước sao chép ADN ở tế bào đích và do đó có thể tăng tốc biểu hiện chuyển gen.

Hệ gen AAV có thể từ kiểu huyết thanh hoặc thể phân lập hoặc nhánh của AAV có nguồn gốc tự nhiên bất kỳ. Như được biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, virus AAV có trong tự nhiên có thể được phân loại theo các hệ thống sinh học khác nhau.

Thông thường, virus AAV dùng để chỉ về kiểu huyết thanh của chúng. “Kiểu huyết thanh” tương ứng với loài phụ biến thể của AAV do profin của nó của biểu hiện của kháng nguyên bề mặt capsit có hoạt tính khác biệt mà có thể được sử dụng để phân biệt nó với loài phụ biến thể khác. Thông thường là, virus có kiểu huyết thanh AAV cụ thể không phản ứng ngang hiệu quả với kháng thể trung hòa đặc hiệu cho kiểu huyết thanh AAV khác bất kỳ. Các kiểu huyết thanh AAV bao gồm AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 và AAV11, cũng là kiểu huyết thanh tái tổ hợp, như Rec2 và Rec3, gần đây được nhận ra từ não linh trưởng. Trong vectơ theo sáng chế, hệ gen có thể có nguồn gốc từ kiểu huyết thanh AAV bất kỳ. Capsit

cũng có thể có nguồn gốc từ kiểu huyết thanh AAV. Hệ gen và capsit có thể có nguồn gốc từ cùng kiểu huyết thanh hoặc các kiểu huyết thanh khác nhau.

Theo một phương án, hệ gen của vectơ được sáng chế mô tả có nguồn gốc từ kiểu huyết thanh AAV 2 (AAV2), kiểu huyết thanh AAV 4 (AAV4), kiểu huyết thanh AAV (AAV5) hoặc kiểu huyết thanh AAV 8 (AAV8). Các vectơ AAV khác mà có thể được sử dụng bao gồm vectơ có nguồn gốc từ AAV44.9 và AAV-Anc80. Được ưu tiên nhất là hệ gen có nguồn gốc từ AAV2, liên kết với tế bào đích qua thụ thể proteoglycan heparin sulphat, nhưng các kiểu huyết thanh khác quan tâm đặc biệt để sử dụng theo sáng chế bao gồm AAV4, AAV5 và AAV8, giúp chuyển nhiễm hiệu quả mô trong mắt, như biểu mô sắc tố võng mạc.

Trình tự của hệ gen AAV hoặc thành phần của hệ gen AAV bao gồm trình tự ITR, gen rep hoặc cap để sử dụng theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ số truy nhập sau đây cho toàn bộ trình tự hệ gen AAV: virus liên hợp adeno 1 NC_002077, AF063497; virus liên hợp adeno 2 NC_001401; virus liên hợp adeno 3 NC_001729; virus liên hợp adeno 3B NC_001863; virus liên hợp adeno 4 NC_001829; virus liên hợp adeno 5 Y18065, AF085716; virus liên hợp adeno 6 NC_001862; AAV gia cầm ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC_004828; chủng AAV gia cầm DA-1 NC_006263, AY629583; AAV bò NC_005889, AY388617.

Virus AAV cũng có thể được dùng để chỉ về nhánh hoặc nhân bản. Việc này dùng để chỉ mối quan hệ phát sinh loài của virus AAV có nguồn gốc tự nhiên, và thông thường là nhóm phát sinh loài của virus AAV có thể được bắt nguồn từ tổ tiên chung, và bao gồm tất cả con cháu của nó. Ngoài ra, virus AAV có thể được dùng để chỉ về thể phân lập đặc hiệu, tức là thể phân lập di truyền của virus AAV đặc hiệu tìm thấy trong tự nhiên. Thuật ngữ thể phân lập di truyền mô tả quần thể của virus AAV mà trải qua trộn gen bị giới hạn với các virus AAV có trong tự nhiên khác, do đó xác định quần thể khác biệt có thể hiểu được ở cấp độ di truyền.

Ví dụ của nhánh và thể phân lập của AAV mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm:

Nhánh A: AAV1 NC_002077, AF063497, AAV6 NC_001862, Hu. 48 AY530611, Hu 43 AY530606, Hu 44 AY530607, Hu 46 AY530609,

Nhánh B: Hu. 19 AY530584, Hu. 20 AY530586, Hu 23 AY530589, Hu22 AY530588, Hu24 AY530590, Hu21 AY530587, Hu27 AY530592, Hu28 AY530593, Hu 29 AY530594, Hu63 AY530624, Hu64 AY530625, Hu13 AY530578, Hu56 AY530618, Hu57 AY530619, Hu49 AY530612, Hu58 AY530620, Hu34 AY530598, Hu35 AY530599, AAV2 NC_001401, Hu45 AY530608, Hu47 AY530610, Hu51 AY530613, Hu52 AY530614, Hu T41 AY695378, Hu S17 AY695376, Hu T88 AY695375, Hu T71 AY695374, Hu T70 AY695373, Hu T40 AY695372, Hu T32 AY695371, Hu T17 AY695370, Hu LG15 AY695377,

Nhánh C: Hu9 AY530629, Hu10 AY530576, Hu11 AY530577, Hu53 AY530615, Hu55 AY530617, Hu54 AY530616, Hu7 AY530628, Hu18 AY530583, Hu15 AY530580, Hu16 AY530581, Hu25 AY530591, Hu60 AY530622, Ch5 AY243021, Hu3 AY530595, Hu1 AY530575, Hu4 AY530602 Hu2, AY530585, Hu61 AY530623,

Nhánh D: Rh62 AY530573, Rh48 AY530561, Rh54 AY530567, Rh55 AY530568, Cy2 AY243020, AAV7 AF513851, Rh35 AY243000, Rh37 AY242998, Rh36 AY242999, Cy6 AY243016, Cy4 AY243018, Cy3 AY243019, Cy5 AY243017, Rh13 AY243013,

Nhánh E: Rh38 AY530558, Hu66 AY530626, Hu42 AY530605, Hu67 AY530627, Hu40 AY530603, Hu41 AY530604, Hu37 AY530600, Rh40 AY530559, Rh2 AY243007, Bb1 AY243023, Bb2 AY243022, Rh10 AY243015, Hu17 AY530582, Hu6 AY530621, Rh25 AY530557, Pi2 AY530554, Pi1 AY530553, Pi3 AY530555, Rh57 AY530569, Rh50 AY530563, Rh49 AY530562, Hu39 AY530601, Rh58 AY530570, Rh61 AY530572, Rh52 AY530565, Rh53 AY530566, Rh51 AY530564, Rh64 AY530574, Rh43 AY530560, AAV8 AF513852, Rh8 AY242997, Rh1 AY530556,

Nhánh F: Hu14 (AAV9) AY530579, Hu31 AY530596, Hu32 AY530597, Clonal Thể phân lập AAV5 Y18065, AF085716, AAV 3 NC_001729, AAV 3B NC_001863, AAV4 NC_001829, Rh34 AY243001, Rh33 AY243002, Rh32 AY243003.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể chọn kiểu huyết thanh, nhánh, dòng hoặc thể phân lập của AAV phù hợp để sử dụng theo sáng chế trên cơ sở sự nhận biết chung thông thường của họ.

Cần được hiểu tuy nhiên rằng sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng hệ gen AAV của các kiểu huyết thanh khác mà có thể chưa được nhận ra hoặc được đặc trưng. Kiểu huyết thanh AAV xác định tính đặc hiệu mô lây nhiễm (hoặc ái tính) của virus AAV. Do đó, kiểu huyết thanh AAV được ưu tiên để sử dụng ở virus AAV được dùng cho bệnh nhân theo sáng chế là kiểu huyết thanh có ái tính tự nhiên hoặc hiệu quả lây nhiễm cao của tế bào nhận sáng hình nón đích.

AAV kiểu đại, chứa gen virus, xen vật liệu hệ gen của chúng vào nhiễm sắc thể 19 của tế bào chủ. Hệ gen ADN sợi đơn AAV chứa hai lặp đầu cuối đảo ngược (ITR) và hai khung đọc mở, chứa gen cấu trúc (*cap*) và đóng gói (*rep*).

Thông thường là, hệ gen AAV của kiểu huyết thanh hoặc thể phân lập hoặc nhánh của AAV có nguồn gốc tự nhiên chứa ít nhất một trình tự lặp đầu cuối đảo ngược (ITR). Vector theo sáng chế thường chứa hai ITR, tốt hơn là một ở mỗi đầu hệ gen. Trình tự ITR hoạt động ở *cis* để tạo nguồn gốc chức năng sao chép, và cho phép tích hợp và loại bỏ vector từ hệ gen của tế bào. Trình tự ITR được ưu tiên là của AAV2 và biến thể của nó. Hệ gen AAV thường chứa gen đóng gói, như gen *rep* và/hoặc *cap* mã hóa chức năng đóng gói cho hạt virus AAV. Gen *rep* mã hóa một hoặc nhiều protein Rep78, Rep68, Rep52 và Rep40 hoặc biến thể của chúng. Gen *cap* mã hóa một hoặc nhiều protein capsit như VP1, VP2 và VP3 hoặc biến thể của chúng. Các protein này tạo nên capsit của hạt virus AAV. Biến thể capsit được thảo luận dưới đây.

Với mục đích trị liệu, ITR có thể được đề xuất *in cis* ngoài gen trị liệu. Virus AAV do đó có thể được cải biến: gen virus có thể được loại bỏ khỏi hệ gen, sản xuất AAV tái tổ hợp (rAAV). rAAV chứa gen trị liệu và ít nhất một ITR. Việc loại bỏ gen virus làm cho rAAV không có khả năng xen hoạt động hệ gen của nó vào ADN tế bào chủ. Thay vào đó, hệ gen rAAV hợp nhất thông qua ITR, tạo thành cấu trúc hình tròn, nhiều tầng, hoặc xen vào chỗ phá vỡ nhiễm sắc thể từ trước. Để sản xuất virus, gen cấu trúc và đóng gói, hiện được loại bỏ khỏi rAAV, được cung cấp *in trans*, ở dạng plasmit trợ giúp.

Tốt hơn là hệ gen AAV sẽ được tạo dẫn xuất nhằm mục đích sử dụng cho bệnh nhân. Dẫn xuất này là chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật và sáng chế bao gồm việc sử dụng dẫn xuất được biết bất kỳ của hệ gen AAV, và dẫn xuất có thể được tạo ra bằng cách áp dụng kỹ thuật được biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Dẫn xuất của hệ gen AAV bao gồm dạng bị cắt cụt hoặc được cải biến bất kỳ của hệ gen AAV mà cho phép biểu hiện chuyển gen Rep-1 từ vector theo sáng chế *in vivo*. Thông thường là, có thể cắt cụt hệ gen AAV đáng kể để bao gồm trình tự virut tối thiểu nhưng giữ được chức năng ở trên. Việc này được ưu tiên vì lý do an toàn để giảm nguy cơ tái tổ hợp vector với virut kiểu dại, và cũng để tránh kích hoạt đáp ứng miễn dịch tế bào bởi sự có mặt của protein gen virut trong tế bào đích.

Thông thường là, dẫn xuất sẽ bao gồm ít nhất một trình tự lặp đầu cuối đảo ngược (ITR), tốt hơn là nhiều hơn một ITR, như hai ITR hoặc nhiều hơn. Một hoặc nhiều ITR có thể có nguồn gốc từ hệ gen AAV có các kiểu huyết thanh khác nhau, hoặc có thể là ITR khám hoặc đột biến. ITR đột biến được ưu tiên là trình tự mất *trs* (vị trí phân giải đầu cuối). Sự mất này cho phép sao chép liên tục hệ gen để tạo ra hệ gen sợi đơn mà chứa cả hai trình tự mã hóa và bổ trợ, tức là hệ gen AAV tự bổ trợ. Việc này cho phép bỏ qua sao chép ADN ở tế bào đích, và do đó cho phép biểu hiện chuyển gen tăng tốc.

Một hoặc nhiều ITR tốt hơn là sẽ ở sườn caset cấu trúc biểu hiện chứa gen khởi đầu và chuyển gen theo sáng chế. Sự bao gồm một hoặc nhiều ITR được ưu tiên để hỗ trợ đóng gói vector theo sáng chế thành hạt virut. Theo phương án được ưu tiên, thành phần ITR sẽ chỉ là trình tự giữ được từ hệ gen AAV nguyên thủy ở dẫn xuất. Vì vậy, dẫn xuất tốt hơn là sẽ không bao gồm gen *rep* và/hoặc *cap* của hệ gen nguyên thủy và các trình tự khác bất kỳ của hệ gen nguyên thủy. Việc này được ưu tiên vì lý do được mô tả ở trên, và cũng để giảm khả năng tích hợp vector vào hệ gen tế bào chủ. Ngoài ra, giảm kích thước của hệ gen AAV cho phép tăng linh hoạt trong việc kết hợp các thành phần trình tự khác (như thành phần điều hòa) trong vector ngoài chuyển gen.

Tham chiếu đến hệ gen AAV2, phần sau đây do đó có thể được loại bỏ ở dẫn xuất theo sáng chế: Một trình tự lặp đầu cuối đảo ngược (ITR), gen sao chép (*rep*) và capsit (*cap*). Tuy nhiên, theo một số phương án, bao gồm phương án *in vitro*, dẫn xuất ngoài ra có thể bao gồm một hoặc nhiều gen *rep* và/hoặc *cap* hoặc các trình tự virut khác của hệ gen AAV.

Dẫn xuất có thể là dẫn xuất khám, được bố trí lại hoặc cải biến capsit của một hoặc nhiều virut AAV có trong tự nhiên. Sáng chế bao gồm sự cung cấp trình tự protein capsit từ các kiểu huyết thanh, nhánh, dòng, hoặc thể phân lập của AAV khác nhau trong

cùng một vectơ. Sáng chế bao gồm sự đóng gói hệ gen của một kiểu huyết thanh thành capsit của kiểu huyết thanh khác, tức là giả mạo.

Dẫn xuất khảm, được bố trí lại hoặc cải biến capsit thông thường là sẽ được chọn để tạo một hoặc nhiều chức năng mong muốn cho vectơ virus. Vì vậy, các dẫn xuất này có thể hiển thị hiệu quả phân phối gen tăng, giảm khả năng sinh miễn dịch (thể dịch hoặc tế bào), phạm vi ái tính bị thay đổi và/hoặc việc nhắm đích được cải thiện loại tế bào cụ thể so với vectơ virus AAV chứa hệ gen AAV có trong tự nhiên, như hệ gen của AAV2. Tăng hiệu quả phân phối gen có thể được thực hiện bằng cách cải thiện liên kết thụ thể hoặc đồng thụ thể tại bề mặt tế bào, cải thiện nội bộ, cải thiện buôn bán trong tế bào và thành hạt nhân, cải thiện việc phát hiện ra hạt virus và cải thiện biến đổi hệ gen sợi đơn thành dạng sợi đôi. Hiệu quả tăng lên cũng có thể liên quan đến phạm vi nhiệt đới bị thay đổi hoặc việc nhắm mục tiêu quần thể tế bào đặc hiệu, sao cho liều vectơ không được pha loãng bởi việc sử dụng cho mô không cần thiết.

Protein capsit khảm bao gồm protein được tạo ra bằng cách tái tổ hợp giữa hai hay nhiều trình tự mã hóa capsit của kiểu huyết thanh AAV có trong tự nhiên. Việc này có thể được tiến hành ví dụ bằng cách tiếp cận cứu hộ dấu hiệu trong đó trình tự capsit không lây nhiễm của một kiểu huyết thanh được đồng truyền nhiễm với trình tự capsit của kiểu huyết thanh khác, và lựa chọn theo hướng được sử dụng để chọn cho trình tự capsit có đặc tính mong muốn. Trình tự capsit của các kiểu huyết thanh khác nhau có thể được thay đổi bằng cách tái tổ hợp tương đồng trong tế bào để tạo ra protein capsit khảm mới.

Protein capsit khảm cũng bao gồm protein được tạo ra bằng kỹ thuật của trình tự protein capsit để chuyển miễn protein capsit đặc hiệu, vòng lặp bề mặt hoặc gốc axit amin đặc hiệu giữa hai hoặc nhiều protein capsit, ví dụ giữa hai hoặc nhiều protein capsit của các kiểu huyết thanh khác nhau.

Protein capsit được bố trí lại hoặc khảm cũng có thể được tạo ra bằng cách xáo trộn ADN hoặc bằng PCR để bị lỗi. Gen capsit AAV lai có thể được tạo thành bằng cách phân mảnh ngẫu nhiên trình tự của gen AAV liên quan ví dụ gen mã hóa protein capsit của nhiều kiểu huyết thanh khác nhau và sau đó tập hợp lại các mảnh trong phản ứng polymeraza tự môi, phản ứng này cũng có thể gây ra sự giao nhau trong các vùng tương đồng trình tự. Thư viện gen AAV lai được tạo thành theo cách này bằng cách xáo trộn

gen capsit của một số kiểu huyết thanh có thể được sàng lọc để xác định dòng virus có chức năng mong muốn. Tương tự, PCR có xu hướng sai số có thể được sử dụng để đột biến ngẫu nhiên gen capsit AAV để tạo thành thư viện biến thể đa dạng mà có thể sau đó được chọn cho đặc tính mong muốn.

Trình tự của gen capsit cũng có thể được cải biến về mặt di truyền để đưa đoạn mất, thế hoặc xen đặc hiệu liên quan đến trình tự kiểu đại nguyên thủy. Cụ thể là, gen capsit có thể được cải biến bằng cách xen trình tự của protein hoặc peptit không liên quan trong khung đọc mở của trình tự mã hóa capsit, hoặc ở đầu cuối N và/hoặc C của trình tự mã hóa capsit.

Protein hoặc peptit không liên quan có thể thuận lợi hoạt động như một phối tử cho loại tế bào cụ thể, nhờ đó tạo ra liên kết được cải thiện với tế bào đích hoặc cải thiện tính đặc hiệu nhắm đích của vector với quần thể tế bào cụ thể.

Protein không liên quan cũng có thể là protein mà hỗ trợ tinh chế hạt virus như một phần của quy trình sản xuất tức là epitop hoặc thể ái lực. Vị trí xen thông thường sẽ được chọn để không gây trở ngại cho các chức năng khác của hạt virus ví dụ nội bộ hóa, buôn bán hạt virus. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định vị trí thích hợp để xen dựa trên sự nhận biết thông thường chung của họ.

Sáng chế ngoài ra bao gồm sự cung cấp trình tự của hệ gen AAV theo thứ tự và cấu hình khác với của hệ gen AAV nguyên thủy. Sáng chế cũng bao gồm việc thay thế một hoặc nhiều trình tự AAV hoặc gen với trình tự từ virus khác hoặc gen khảm gồm trình tự từ nhiều hơn một virus. Gen khảm này có thể gồm trình tự từ hai hoặc nhiều protein virus liên quan của các loài virus khác nhau.

Vector theo sáng chế có dạng vector virus chứa gen khởi đầu và cấu trúc biểu hiện theo sáng chế.

Để tránh nghi ngờ, sáng chế cũng đề xuất hạt virus AAV chứa vector theo sáng chế. Hạt AAV theo sáng chế bao gồm dạng chuyển capsit trong đó hệ gen AAV hoặc dẫn xuất có ITR của một kiểu huyết thanh được đóng gói trong capsit của kiểu huyết thanh khác. Hạt AAV theo sáng chế cũng bao gồm dạng khảm trong đó hỗn hợp các protein capsit không cải biến từ hai hoặc nhiều kiểu huyết thanh khác nhau tạo thành vỏ bao của virus. Hạt AAV cũng bao gồm các dạng cải biến hóa học mang các phối tử được

hấp phụ lên bề mặt của capsit. Ví dụ, các phối tử này có thể bao gồm các kháng thể để nhắm đích thụ thể của bề mặt tế bào cụ thể.

Hệ gen AAV2, giống như hệ gen của tất cả các kiểu huyết thanh AAV, có thể được bao bọc trong nhiều protein capsit khác nhau. AAV2 có thể được đóng gói trong capsit AAV2 tự nhiên của nó (AAV2/2) hoặc nó có thể được tạo kiểu giả (pseudotype) với các capsit khác (ví dụ, hệ gen AAV2 trong capsit AAV1, dẫn đến AAV2/1, hoặc hệ gen AAV2 trong capsit AAV8, dẫn đến AAV2/8).

Theo phương án được ưu tiên, capsit AAV có nguồn gốc từ AAV8. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, trong đó trình tự được liên kết có điều khiển là gen *CNGA3*, được ưu tiên là capsit là AAV8 hoặc capsit khác khác với AAV5.

AAV chuyển hóa tế bào thông qua sự thực ẩm bào được điều tiết bởi thụ thể đặc hiệu kiểu huyết thanh. Yếu tố chính ảnh hưởng tới động học của việc biểu hiện gen chuyển rAAV là tỷ lệ của hạt virus tháo vỏ bọc trong thể nhân. Về phần mình, điều này phụ thuộc vào kiểu capsit bao bọc vật liệu di truyền. Sau khi tháo vỏ bọc, hệ gen rAAV sợi đơn thẳng được làm ổn định bằng cách tạo ra phân tử sợi kép thông qua quá trình tổng hợp *de novo* sợi hỗ trợ. Việc sử dụng ADN tự hỗ trợ có thể bỏ qua giai đoạn này bằng cách sản xuất ADN gen chuyển sợi kép. Đã được phát hiện ra rằng việc biểu hiện gen AAV2/8 tự hỗ trợ có sự bắt đầu nhanh hơn và biên độ cao hơn, so với AAV2/8 sợi đơn. Vì vậy, bằng cách đi tránh thời gian trễ liên quan đến việc tổng hợp sợi thứ hai, mức độ biểu hiện gen được làm tăng lên so với sự biểu hiện gen chuyển từ cấu trúc sợi đơn tiêu chuẩn. Các nghiên cứu tiếp theo khảo sát tác động của ADN tự hỗ trợ ở các kiểu giả AAV khác cũng tạo ra các kết quả tương tự. Một lưu ý đối với kỹ thuật này là, do AAV có dung lượng đóng gói khoảng 4,8kb, nên hệ gen tái tổ hợp tự hỗ trợ phải có kích thước phù hợp (nghĩa là 2,3kb hoặc nhỏ hơn).

Ngoài việc thay đổi dung lượng đóng gói, việc tạo kiểu giả hệ gen AAV2 với các capsit AAV khác còn có thể làm thay đổi đặc trưng của tế bào và động học của việc biểu hiện gen chuyển. Ví dụ, khi AAV2 được tạo kiểu giả với capsit AAV4, sự biểu hiện gen chuyển đặc hiệu nhắm đến tế bào RPE. Ngoài ra, AAV2/8 được báo cáo là chuyển hóa tế bào nhận sáng hiệu quả hơn so với AAV2/2 hoặc AAV2/5.

Chuẩn bị vector

Vectơ theo sáng chế có thể được chuẩn bị bằng phương pháp tiêu chuẩn được biết trong lĩnh vực kỹ thuật để cung cấp vectơ cho liệu pháp. Vì vậy, các phương pháp chuyển nhiễm miền công cộng, đóng gói và tinh chế đã được biết rõ có thể được sử dụng để tạo ra chế phẩm vectơ thích hợp.

Như được thảo luận ở trên, vectơ theo sáng chế có thể chứa hệ gen đầy đủ của virus AAV có trong tự nhiên ngoài gen khởi đầu theo sáng chế hoặc biến thể của nó. Tuy nhiên, thông thường, hệ gen được phái sinh sẽ được sử dụng, ví dụ thể phái sinh mà có ít nhất một trình tự lặp đoạn cuối đảo ngược (ITR), nhưng có thể thiếu gen AAV như *rep* hoặc *cap*.

Theo các phương án này, để cung cấp cụm hệ gen đã được phái sinh vào hạt virus AAV, các cấu trúc gen bổ sung cung cấp AAV và/hoặc các chức năng virus hỗ trợ có thể được cung cấp trong tế bào chủ kết hợp với hệ gen được phái sinh. Các cấu trúc bổ sung này thường sẽ chứa các gen mã hóa protein capsit AAV cấu trúc nghĩa là *cap*, VP1, VP2, VP3, và các gen mã hóa các chức năng khác được yêu cầu cho chu trình sống của AAV, như *rep*. Việc chọn lọc các protein capsit cấu trúc được đưa ra trên các cấu trúc bổ sung sẽ xác định kiểu huyết thanh của vectơ virus đã đóng gói.

Vectơ virus được đóng gói được đặc biệt ưu tiên riêng để sử dụng trong sáng chế chứa hệ gen được phái sinh của AAV2 kết hợp với protein capsit AAV8.

Như được đề cập ở trên, các virus AAV không có khả năng sao chép và do đó các chức năng virus hỗ trợ, tốt hơn là các chức năng hỗ trợ adenovirus cũng có thể được đưa ra trên một hoặc nhiều cấu trúc bổ sung để cho phép sao chép AAV. Các hệ thống cũng được biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sử dụng cấu trúc đơn mà chứa chức năng hỗ trợ *rep*, *cap* và Ad, vì vậy cấu trúc hỗ trợ bổ sung không được yêu cầu.

Tất cả các cấu trúc bổ sung ở trên có thể được đề xuất dưới dạng plasmit hoặc các yếu tố episom khác trong tế bào chủ, hoặc theo cách khác là một hoặc nhiều cấu trúc có thể được kết hợp vào hệ gen của tế bào chủ.

Đơn vị kiểm soát phiên mã theo sáng chế có khả năng cứu việc mất chức năng tế bào nhận sáng hình nón, có thể xảy ra ví dụ bởi đột biến ở gen *CNGA3*. “Cứu” thường có nghĩa là bất kỳ sự làm giảm hoặc làm chậm tốc độ phát triển của rối loạn võng mạc hoặc kiểu hình loạn dưỡng, ví dụ khôi phục sự hiện diện của protein CNGA3 trong tế

bào nhận sáng hình nón, cải thiện hoạt tính ERG hoặc làm chậm việc mất hoạt tính ERG, cải thiện độ nhạy võng mạc hoặc làm chậm/tạm dừng việc mất tiến triển độ nhạy võng mạc, làm chậm hoặc tạm dừng mất tế bào nhận sáng, cải thiện quan sát hoặc làm chậm/tạm dừng việc mất thị lực.

Đặc tính của đơn vị kiểm soát phiên mã theo sáng chế cũng có thể được thí nghiệm sử dụng kỹ thuật dựa trên kỹ thuật ở ví dụ. Cụ thể là, đơn vị kiểm soát phiên mã theo sáng chế có thể được lắp vào vector theo sáng chế và được truyền đến võng mạc của động vật thí nghiệm thiếu *CNGA3*, như chuột, và tác dụng được quan sát và so với đối chứng. Tốt hơn là, đối chứng sẽ là mắt khác của cùng động vật, không được điều trị hoặc được điều trị với vector đối chứng như vector chứa gen chỉ thị trái ngược với trình tự theo sáng chế. Phân tích điện học của đáp ứng võng mạc với ánh sáng sau đó có thể được sử dụng để xác nhận rằng tế bào nhận sáng trong đôi mắt mà được điều trị nhạy cảm với ánh sáng hơn tế bào nhận sáng từ đôi mắt mà không được điều trị hoặc được điều trị với vector đối chứng. Độ nhạy của mắt được điều trị với ánh sáng có thể ví dụ lớn hơn ít nhất là 1,1, 1,2, 1,5, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 hoặc 1000 lần độ nhạy của mắt được điều trị đối chứng hoặc không được điều trị.

Phương pháp điều trị bệnh và ứng dụng trong y học

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic (như TCU, gen khởi đầu và mảnh của nó, gen tối ưu hóa codon, cấu trúc biểu hiện, và vector) cũng như phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa rối loạn hoặc loạn dưỡng võng mạc ở bệnh nhân cần điều trị.

Võng mạc gồm lớp tế bào biểu mô sắc tố võng mạc (RPE) và ba lớp tế bào thần kinh; cụ thể là (từ ngoài vào trong), lớp hạt nhân bên ngoài (chứa tế bào nhận sáng hình que và hình nón), lớp hạt nhân bên trong (chứa tế bào lưỡng cực), và lớp tế bào hạch. Rối loạn hoặc loạn dưỡng võng mạc có thể được xác định là bệnh của võng mạc, được đặc trưng bởi việc mất tiến triển tế bào nhận sáng và việc mất quan sát đồng thời. Rối loạn hoặc loạn dưỡng võng mạc có thể được di truyền rối loạn hoặc loạn dưỡng võng mạc.

Theo một phương án, phân tử axit nucleic và phương pháp được đề xuất để điều trị và/hoặc ngăn ngừa loạn dưỡng tế bào nón-que và/hoặc loạn dưỡng tế bào nón. Loạn dưỡng tế bào nón-que có thể được xác định là bệnh được đặc trưng bởi việc mất tiến

triển tế bào nhận sáng hình nón và việc mất quan sát đồng thời và có thể được di truyền. Theo một phương án, rối loạn võng mạc là mù màu hoặc thoái hóa điểm vàng. Thoái hóa điểm vàng có thể là thoái hóa điểm vàng liên quan đến độ tuổi (AMD), ví dụ AMD ướt hoặc tạo mạch mới hoặc teo địa lý, tình trạng bệnh thoái hóa điểm vàng di truyền hoặc loạn dưỡng tế bào nón di truyền.

Thuật ngữ “bệnh nhân” và “đối tượng” có thể được sử dụng thay phiên nhau. Bệnh nhân tốt hơn là động vật có vú. Động vật có vú có thể là động vật được nuôi thương mại, như ngựa, bò, cừu hoặc lợn, động vật phòng thí nghiệm, như chuột hoặc chuột nhắt, hoặc vật nuôi, như mèo, chó, thỏ hoặc chuột lang. Bệnh nhân tốt hơn nữa là người. Đối tượng có thể là đực hoặc cái. Đối tượng tốt hơn là được nhận ra là có nguy cơ, hoặc có, rối loạn hoặc loạn dưỡng vòng mạc.

Thuật ngữ “điều trị,” “được điều trị,” “đang điều trị,” hoặc “sự điều trị” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ cả biện pháp điều trị trị liệu và phòng ngừa hoặc ngăn ngừa, trong đó đối tượng là ngăn ngừa hoặc làm chậm (giảm bớt) tình trạng bệnh, rối loạn hoặc bệnh sinh lý không mong muốn, hoặc để có được các kết quả lợi ích hoặc lâm sàng mong muốn. Với mục đích của sáng chế, các kết quả lợi ích hoặc lâm sàng mong muốn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, giảm bớt triệu chứng; giảm mức độ của tình trạng bệnh, rối loạn hoặc bệnh; ổn định (tức là không xấu đi) trạng thái của tình trạng bệnh, rối loạn hoặc bệnh; trì hoãn phát hoặc làm chậm tốc độ phát triển của tình trạng bệnh, rối loạn hoặc bệnh; làm giảm tình trạng bệnh, rối loạn hoặc trạng thái bệnh; và thuyên giảm (cho dù một phần hay toàn bộ), cho dù có thể phát hiện được hoặc không thể phát hiện được, hoặc tăng cường hoặc cải thiện tình trạng bệnh, rối loạn hoặc bệnh. Điều trị bao gồm gọi ra đáp ứng ý nghĩa lâm sàng không có quá nhiều mức độ tác dụng phụ.

Bệnh nhân có thể không có triệu chứng và/hoặc có thể có khuynh hướng bệnh. Như vậy, sáng chế cũng đề xuất phương pháp hoặc sử dụng mà bao gồm bước xác định xem có hay không đối tượng có nguy cơ phát triển, hoặc có, rối loạn võng mạc, như loạn dưỡng tế bào nón, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, mù màu. Lượng có tác dụng phòng ngừa axit nucleic, như vectơ, như được sáng chế mô tả có thể được dùng cho đối tượng này. Lượng có tác dụng phòng ngừa là lượng mà ngăn ngừa phát một hoặc nhiều triệu chứng bệnh. Như vậy, theo một số phương án, axit nucleic, như vectơ, như được sáng chế mô tả có thể được dùng để ngăn ngừa hoặc trì hoãn phát một hoặc nhiều triệu chứng rối loạn võng mạc, như loạn dưỡng tế bào nón-que, bao gồm, nhưng không bị

giới hạn ở, mù màu. Tương tự, axit nucleic, như vectơ, như được sáng chế mô tả có thể được dùng khi triệu chứng bệnh xuất hiện ở đối tượng tức là để chữa triệu chứng bệnh hiện có. Lượng có tác dụng chữa bệnh của axit nucleic, như vectơ, như được sáng chế mô tả có thể được dùng cho đối tượng. Như được sử dụng ở đây, “lượng có tác dụng chữa bệnh” có nghĩa là lượng axit nucleic đặt ra ở đây mà, khi được dùng cho động vật có vú, có tác dụng trong việc tạo ra tác dụng trị liệu mong muốn. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa rối loạn hoặc loạn dưỡng vòng mạc, trong đó axit nucleic, như vectơ, như được sáng chế mô tả được dùng cho bệnh nhân cần điều trị lượng có tác dụng chữa bệnh. Theo một số phương án, rối loạn hoặc loạn dưỡng vòng mạc là loạn dưỡng tế bào nón, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, mù màu.

Sáng chế cũng đề xuất sử dụng axit nucleic, như vectơ, như được sáng chế mô tả trong việc sản xuất thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn hoặc loạn dưỡng vòng mạc, như loạn dưỡng tế bào nón, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, mù màu. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn võng mạc, như loạn dưỡng tế bào nón, cụ thể là mù màu ở bệnh nhân cần điều trị bao gồm sử dụng lượng có tác dụng chữa bệnh của axit nucleic, như vectơ, như được sáng chế mô tả cho bệnh nhân.

Phương pháp sử dụng

Nói chung, phân phối axit nucleic võng mạc trực tiếp, dưới võng mạc hoặc trong thể kính, như vectơ, như được sáng chế mô tả, thường là bằng cách tiêm, được ưu tiên. Phân phối đến không gian võng mạc, dưới võng mạc không gian hoặc trong thể kính vì vậy được ưu tiên.

Sáng chế do đó cũng đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa loạn dưỡng tế bào nón, cụ thể là mù màu ở bệnh nhân cần điều trị, bao gồm việc sử dụng lượng tác dụng chữa bệnh của axit nucleic, như vectơ, như được sáng chế mô tả cho bệnh nhân bằng cách tiêm võng mạc trực tiếp, dưới võng mạc hoặc trong thể kính.

Theo khía cạnh liên quan, sáng chế đề xuất sử dụng axit nucleic, như vectơ, như được sáng chế mô tả ở phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn võng mạc, như loạn dưỡng tế bào nón, cụ thể là mù màu bằng cách sử dụng vectơ này cho bệnh nhân bằng cách tiêm võng mạc trực tiếp, dưới võng mạc hoặc trong thể kính.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất sử dụng axit nucleic, như vector, như được sáng chế mô tả trong việc sản xuất thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn võng mạc, như loạn dưỡng tế bào nón, cụ thể là mù màu bằng cách tiêm võng mạc trực tiếp, dưới võng mạc hoặc trong thể kính.

Sáng chế cũng đề xuất axit nucleic, như vector, như được sáng chế mô tả để sử dụng trong việc điều trị rối loạn võng mạc, như loạn dưỡng tế bào nón, cụ thể là mù màu, trong đó vector này được dùng trực tiếp vào võng mạc, không gian dưới võng mạc hoặc không gian trong thể kính.

Việc sử dụng axit nucleic, như vector, như được sáng chế mô tả thông thường là bằng cách tiêm võng mạc trực tiếp hoặc dưới võng mạc. Việc này bao gồm phân phối trực tiếp đến tế bào nhận sáng hình nón.

Việc phân phối thông thường là được tiến hành trực tiếp, hoặc dưới võng mạc, võng mạc thoái hóa ở bệnh nhân mắc rối loạn võng mạc, như loạn dưỡng tế bào nón-que, cụ thể là mù màu.

Axit nucleic, như vector, như được sáng chế mô tả có thể chuyển hóa tế bào đích ở trên mà không cần nhập quần thể tế bào khác bất kỳ. Tiêm trong thể kính cũng có thể được sử dụng để cung cấp vector theo sáng chế.

Liều axit nucleic, như vector, như được sáng chế mô tả có thể được xác định theo các thông số khác nhau, đặc biệt là theo độ tuổi, khối lượng và tình trạng bệnh của bệnh nhân cần được điều trị; đường sử dụng; và chế độ được yêu cầu. Lân nữa, bác sĩ sẽ có thể xác định đường sử dụng và liều lượng được yêu cầu cho bệnh nhân cụ thể bất kỳ.

Liều đơn thông thường nằm trong khoảng từ 10^{10} đến 10^{12} hạt hệ gen, phụ thuộc vào lượng mô võng mạc còn lại mà cần chuyển nạp. Hạt hệ gen được xác định ở đây là capsit AAV mà chứa phân tử ADN sợi đơn mà có thể được xác định với phương pháp đặc hiệu trình tự (như PCR thời gian thực). Liều đó có thể được đề xuất dưới dạng liều đơn, nhưng có thể được lặp đối với mắt đồng loại hoặc trong trường hợp axit nucleic, như vector, như được sáng chế mô tả có thể không nhắm đến vùng võng mạc chính xác vì bất kỳ lý do gì (như biến chứng phẫu thuật). Điều trị tốt hơn là điều trị dài hạn đơn cho mỗi mắt, nhưng tiêm lặp lại, ví dụ trong những năm tới và/hoặc với các kiểu huyết thanh AAV khác nhau có thể được xem xét.

Tế bào chủ

Sáng chế thêm vào đó đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic, như vector hoặc vector virus, hoặc hạt virus AAV được sáng chế mô tả. Tế bào chủ thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng để tạo ra axit nucleic, như vector này, được sáng chế mô tả. Thông thường, tế bào này sẽ là tế bào động vật có vú chuyển giao, nhưng các loại tế bào khác, ví dụ tế bào côn trùng, cũng có thể được sử dụng. Về hệ thống sản xuất tế bào động vật có vú, HEK293 và HEK293T được ưu tiên cho vector AAV. Tế bào BHK hoặc CHO cũng có thể được sử dụng.

Dược phẩm và liều lượng

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa axit nucleic, như vector, được sáng chế mô tả, cũng như chất mang dược dụng, chất pha loãng, tá dược, chất hỗ trợ, chất đệm, chất ổn định, và/hoặc các vật liệu khác đã được biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Các vật liệu này không nên độc hại và không nên gây trở ngại cho hiệu quả của thành phần hoạt tính. Cũng được đề xuất là dược phẩm mà chứa chất mang dược dụng, chất pha loãng, tá dược, chất hỗ trợ, chất đệm, chất ổn định, và/hoặc các vật liệu khác đã được biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và trình tự axit nucleic, plasmit, vector, hoặc vector virus như được mô tả ở đây.

Bản chất chính xác của chất mang hoặc vật liệu khác có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật theo đường sử dụng, tức là ở đây tiêm vồng mạc trực tiếp, dưới vồng mạc hoặc trong thể kính.

Dược phẩm thông thường là ở dạng lỏng. Dược phẩm lỏng thường bao gồm chất mang lỏng như nước, xăng dầu, dầu động vật hoặc thực vật, dầu khoáng hoặc dầu tổng hợp. Dung dịch muối sinh lý, magie clorua, dextroza hoặc dung dịch saccarit khác hoặc glycol như etylen glycol, propylen glycol hoặc polyetylen glycol có thể được bao gồm. Trong một số trường hợp, chất hoạt động bề mặt, như axit pluronic (PF68) 0,001% có thể được sử dụng.

Để tiêm ở vị trí phiên não, thành phần hoạt chất sẽ ở dạng dung dịch nước không chứa pyrogen và có độ pH thích hợp, đẳng trương và ổn định. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể tạo ra dung dịch thích hợp sử dụng, ví dụ, phương tiện đẳng trương như tiêm natri clorua, tiêm Ringer, tiêm Ringer lactat hóa, dung dịch Hartmann. Chất bảo quản, chất ổn định, chất đệm, chất chống oxy hóa và/hoặc các phụ gia khác có thể được bao gồm, như được yêu cầu.

Để giải phóng chậm, vector có thể được bao gồm trong được phẩm mà được bào chế để giải phóng từ từ, như trong các vi nang được hình thành từ các polyme tương hợp sinh học hoặc trong hệ thống chất mang liposom theo phương pháp được biết trong lĩnh vực.

Liều lượng và chế độ liều lượng có thể được xác định trong hiểu biết trung bình của người hành nghề y tế chịu trách nhiệm về việc sử dụng chế phẩm. Liều lượng của (các) hoạt chất có thể thay đổi, phụ thuộc vào lý do sử dụng, đối tượng cá thể, và Phương pháp sử dụng. Liều lượng có thể được điều chỉnh dựa trên khối lượng của đối tượng, độ tuổi và sức khỏe của đối tượng, và dung nạp đối với (các) hợp chất hoặc chế phẩm.

Liệu pháp kết hợp

Axit nucleic, TCU, gen khởi đầu, gen tối ưu hóa codon, cấu trúc biểu hiện, vector và/hoặc được phẩm được sáng chế mô tả có thể được sử dụng kết hợp với liệu pháp khác bất kỳ để điều trị và/hoặc ngăn ngừa rối loạn võng mạc, như loạn dưỡng tế bào nón, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, mù màu.

Kit

Axit nucleic, TCU, gen khởi đầu, gen tối ưu hóa codon, cấu trúc biểu hiện, vector và/hoặc được phẩm được sáng chế mô tả có thể được đóng gói thành kit.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Vật liệu và phương pháp

Cấu trúc plasmit

Để tạo thành phiên bản cải thiện của gen khởi đầu *opsin tế bào nón xanh lá*, vùng *kiểm soát quỹ tích* (LCR) 1250-bp (Smallwood et al., 2002) được kết hợp với các mảnh gen khởi đầu lõi opsin xanh lá khác nhau (bp -480 đến +40) thành plasmit cha mẹ pAAV/CMV.eGFP, tạo ra cấu trúc plasmit pAAV/hG1.7.eGFP và pAAV/hG1.4.eGFP. Cấu trúc vector mang gen khởi đầu đột biến 'M8' được tạo ra bằng cách gây đột biến đặc hiệu vị trí.

Với cấu trúc gen trị liệu, pAAV/coCNGA3 được tạo thành bằng cách nhân bản vô tính trình tự CNGA3 được tối ưu hóa codon và Kozak từ plasmit pUC57 (tạo ra bởi GenScript) thành plasmit pAAV mang các cấu trúc gen khởi đầu opsin tế bào nón xanh lá (M) khác nhau.

Tối ưu hóa codon

Tối ưu hóa codon đạt được bằng công cụ tối ưu hóa codon OptimumGene™ thích hợp của GenScript.

Giao thức sản xuất virus AAV2/8 và AAV2/5

Virus 8 kiểu huyết thanh AAV2 và virus 5 kiểu huyết thanh AAV2 tái tổ hợp được tạo ra sử dụng chuyển nhiễm ba của phương pháp tế bào 293T được mô tả trước đó (Gao et al. 2002). Đĩa 145cm² của đĩa tế bào 293T (20 đĩa mỗi mẻ virus) được truyền với hỗn hợp chứa plasmit quan tâm: plasmit capsit virus: ADN plasmit hỗ trợ theo tỷ lệ 1:1:3, polyetylenimin (PEI - Polysciences Inc., Eppelheim, Germany) và DMEM sau khi ủ 10 phút. Các tế bào được chuyển giao được nằm trên giường trong 24 giờ. 48 giờ sau khi chuyển nhiễm, tế bào được thu hoạch, cô đặc bằng ly tâm, tái sử dụng trong đệm TD (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, K₂HPO₄ 0,7 mM, MgCl₂ 3,5 mM, Tris Base 25 mM [độ pH = 7,5]). Sau đó đệm này được phân giải bằng 3-4 chu trình quá trình đông lạnh-rã đông, theo dõi bởi điều trị Benzonase (Sigma Aldrich, Dorset, UK), và sau đó các mảnh vụn tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm liên tiếp và các bước lọc ống tiêm.

Tinh chế được tiến hành bằng sắc ký trao đổi ion (sử dụng phương pháp dựa trên phương pháp bởi Davidoff et al. 2004). Dịch rửa giải được cô đặc trong ống cô đặc Vivaspin 4 10kDa (Sartorius Stedim Biotech, Fisher Scientific, Loughborough, UK), rửa trong PBS-MK, sau đó cô đặc vào 100-150µl thể tích, sau đó được trích để lưu trữ -80°C (dài hạn) hoặc + 4°C (ngắn hạn).

Sản xuất và chuyển nạp các cơ quan tử võng mạc có nguồn gốc tế bào gốc của người

Dòng tế bào gốc bào thai (ESC) H9 của người được duy trì ở tình trạng không có bộ cấp liệu trên môi trường E8 và đĩa 6 lỗ phủ geltrex. hESC được phân ly sử dụng dung dịch dispaza và collagenaza. Các khối ESC được thu thập và tái huyền phù lại trong môi trường E8. Để biệt hóa thần kinh võng mạc ESC của người được duy trì cho đến khi hợp lưu khi môi trường không có FGF được thêm vào các giếng cấy trong hai ngày. Môi trường cảm ứng thần kinh (DMEM/F12 nâng cao, axit amin không thiết yếu MEM, phần bổ sung N2, Glutamin và Pen/Strep 100mM) được thêm vào cho đến khi mụn nước được quan sát. Các mụn nước được cắt bỏ thủ công và giữ trong đĩa 96 lỗ ở môi trường biệt hóa võng mạc (DMEM, F12, Pen/Strep và B27 không có axit retinoic) và lúc 6 tuần môi

trường biệt hóa được bổ sung FBS, taurin và glutamax và lúc 10 tuần RA đã được bổ sung.

Các vectơ AAV (kiểu huyết thanh SsH10) mang cấu trúc *gen khởi đầu opsin tế bào nón xanh lá* điều khiển eGFP được thêm vào môi trường ở $1,2 \times 10^{11}$ vg/lỗ (1-3 cơ quan tử/lỗ). Các cơ quan tử được nuôi cấy trong 28 ngày nữa trước khi thu hoạch và phân tích.

Hóa mô miễn dịch

Mắt được chuẩn bị để cố định bằng cách xỏ lỗ giác mạc, và sau đó ngâm trong paraformaldehyt 1% (PFA, độ pH 7,4). Các cơ quan tử võng mạc được cố định bằng cách ngâm trong paraformaldehyt 1% (PFA, độ pH 7,4). Mắt được để cố định ở nhiệt độ phòng trong tối đa một giờ, trước khi được loại bỏ khỏi dung dịch và được ngâm hoàn toàn trong nền nhúng ở nhiệt độ cắt tối ưu (OCT), với phần trước-sau của mắt lơ lửng theo trục ngang-dọc trong ống nhúng. Sau đó chúng được đông lạnh và bảo quản ở -20°C cho đến khi được yêu cầu phân chia.

Các phần 10 - 18 micron được chuẩn bị sử dụng Bright® OTF5000 Cryostat (Bright Instrument Co Ltd, Cambridgeshire, UK), nhờ đó cho phép trực quan hóa cả hai khía cạnh trên và dưới của võng mạc. Lát đã được thu thập ngay sau khi phân chia trên lát kính hiển vi phủ polysin, và cho phép để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng. Các lát được bảo quản ở -20°C hoặc được phân tích trực tiếp.

Đối với hóa mô miễn dịch, các phần bị chặn trong albumin 5% huyết thanh dê và 1% huyết thanh bò ở PBS. Các kháng thể sơ cấp opsin kháng tế bào nón (Millipore) được ủ qua đêm ở 4°C . Phần được ủ với kháng thể thứ cấp trong 2 giờ ở RT và rửa sạch. Các kháng thể thứ cấp alexa-fluor (Invitrogen-Molecular Probes) được sử dụng ở độ pha loãng 1:500. Các lát được nhuộm bằng DAPI như một phần bổ sung vào môi trường lắp (0,1% DAPI ở môi trường) hoặc bằng cách ngâm trong DAPI 0,2% trong TBS và rửa PBS trước khi gắn vào môi trường lắp đèn huỳnh quang (DAKO). Các lát đã gắn được bảo quản ở 4°C .

Các lát đã gắn được chụp ảnh sử dụng kính hiển vi đồng tiêu Leica DM5500Q (Leica Biosystems, Germany) hoặc Zeiss AxioObserver Z1 (Carl Zeiss Inc, Göttingen, Germany).

Tiêm dưới võng mạc

Tiêm dưới võng mạc được tiến hành trên *Cpfl5* (thiếu *CNGA3*) (Hawes et al., 2006) và chuột C57BL/6 quanh 2 tuần sau khi ra đời. Kính hiển vi hoạt động được sử dụng suốt phẫu thuật nhãn khoa. Kim tiêm dưới da 1,5 cm, 34 gauge (Hamilton, Switzerland) được cài xen tiếp tuyến bằng màng cứng, tạo ra vết thương đường hầm xơ cứng tự bịt kín (Tan et al. 2009). 1,0 – 1,5 μ l dịch huyền phù virus được tiêm trong bán cầu trên và dưới của không gian dưới võng mạc, mỗi bán cầu tạo ra phân tách võng mạc bóng nước có thể nhìn thấy được bằng mắt. C57BL/6 được sử dụng để nghiên cứu gen khởi đầu và tiêm 1×10^{12} độ chuẩn virus. Chuột *Cpfl5* được sử dụng ở nghiên cứu thoát *CNGA3*. Chuột được tiêm cấu trúc virus *CNGA3* trong mắt được chỉ định, với cấu trúc virus đối chứng được tiêm vào mắt bên. Tất cả các con chuột đều được tiêm hai bên.

Hiệu quả điều trị *in vivo*

Quá trình khôi phục chức năng võng mạc được đánh giá bằng phương pháp ghi điện tử quang học. Bản ghi ERG thu được đồng thời từ cả hai mắt. Sau khi thích ứng tối qua đêm (~12 giờ), một giọt 2,5% phenylephrin và 1% tropicamid (Minims, Bausch & Lomb) được dùng lên mỗi mắt để làm giãn đồng tử và mắt được giữ ẩm bằng cách bôi chất bôi trơn. ERG được thực hiện sử dụng thiết bị có bán trên thị trường (Espion ERG Diagnosys System). Ghi âm nhấp nháy đơn thích ứng ánh sáng thu được tại cường độ ánh sáng tăng 0,1, 1, 3, 16, 10, 31,6 và 75,28 cd.s/m^2 trên nền là 30 cd/m^2 . Trừ khi các hình vẽ chỉ định thể hiện biên độ sóng b thích ứng ánh sáng trung bình (giá trị trung bình $\pm$ SD) sau 4 tuần sau khi điều trị, khi vector đạt đến biểu hiện đỉnh.

Ví dụ 1: Tối ưu hóa đơn vị kiểm soát phiên mã đặc hiệu tế bào nón (TCU)

Vùng kiểm soát quỹ tích của người (LCR), được bố trí ngược dòng của gen opsin màu đỏ, nâng cao biểu hiện của cả hai gen opsin đỏ (L-opsin) và opsin xanh lá (M-opsin), được đặt song song với nhau (xem Fig. 1, trên cùng bên trái). Gen khởi đầu đặc hiệu hình nón mạnh mẽ sử dụng trước đó LCR và gen khởi đầu opsin màu đỏ, vì chúng là thành phần gần nhau về mặt vật lý. Trong nghiên cứu biểu hiện gen chỉ thị *in vivo* ở chuột chuyển gen bởi Smallwood et al, các mức biểu hiện khác nhau từ gen khởi đầu opsin đỏ hoặc xanh lá dựa trên sự gần gũi vật lý của chúng với LCR được kiểm tra. Smallwood et al. tạo cấu trúc một số dẫn xuất của mảng đỏ và xanh lá của người để chứng minh các mức biểu hiện khác nhau từ gen khởi đầu opsin đỏ hoặc xanh lá dựa trên độ gần vật lý của chúng với LCR (xem Fig. 1, phía dưới bên trái). Mỗi dẫn xuất bao

gồm gen chỉ thị phosphatase kiềm (AP) trong sự kiểm soát của gen khởi đầu opsin đỏ và β -galactosidase (LacZ) trong sự kiểm soát của gen khởi đầu opsin xanh lá. Với mỗi dòng tế bào gốc bào thai, vông mạc được phân tích từ nhiều gen sáng lập khảm hoặc từ nhiều con cháu đã di truyền ổn định gen chuyển. Trong trường hợp thứ hai, phân tích được tiến hành cả trước và sau khi lai với chuột cre dòng mầm để loại bỏ caset PGK-neo ở sườn loxP.

Trong cấu trúc kiểu đại, sử dụng kết cấu nhiễm sắc thể tự nhiên (pPMS107), 65–95% tế bào nón biểu hiện AP (trong sự kiểm soát của gen khởi đầu opsin đỏ) hoặc lacZ (trong sự kiểm soát của gen khởi đầu opsin xanh lá), nhưng không cả hai. Việc cài xen gen đệm 9-kb giữa hai đơn vị phiên mã (tức là tăng khoảng cách giữa LCR và gen khởi đầu opsin xanh lá, cấu trúc pPMS108) dẫn đến sự thay đổi lớn từ tế bào biểu hiện lacZ (gen khởi đầu xanh lá) đến AP (gen khởi đầu đỏ). Sự thay đổi vị trí của hai đơn vị phiên mã (pPMS101) và đặt gen khởi đầu lõi opsin xanh lá ngay sau LCR (pPMS101), làm lệch profin biểu hiện của các con chuột chuyển gen này hầu như chỉ hướng tới phiên mã gen khởi đầu lõi opsin xanh lá (>99%).

Sáng chế đề xuất đơn vị kiểm soát phiên mã (TCU) đặc hiệu tế bào nón tương tự sử dụng LCR của người và gen khởi đầu opsin xanh lá của người được tối ưu hóa. Thành phần lõi được bảo tồn của gen khởi đầu opsin xanh lá của người (0,2kb) được nhận ra và một loạt TCU sử dụng gen khởi đầu opsin xanh lá chế tạo được tạo ra sử dụng vùng LCR và gen khởi đầu opsin xanh lá của các kích thước khác nhau: 2,0Kb (hG2,0), 1,7Kb (hG1.7) và 1,4Kb (hG1.4), xem Fig. 2. Mảnh gen khởi đầu opsin đỏ là 1,7Kb (PR1,7, tương tự như gen khởi đầu được sử dụng bởi AGTC, Ye et al., 2016)) cũng được tạo ra làm đối chứng.

Ngoài ra, một loạt các vector AAVshh10 chứa gen báo cáo GFP dẫn bởi gen khởi đầu được mô tả ở trên được tạo ra và biểu hiện ở giống cấy vông mạc có nguồn gốc từ ES của người được đánh giá.

Tất cả các cấu trúc được thí nghiệm được đề xuất profin chuyển nạp tương tự về mức biểu hiện GFP và tính đặc hiệu tế bào nón. Cấu trúc với mảnh gen khởi đầu nhỏ tạo nhiều không gian để gói gen lớn trong vector AAV.

Ví dụ 2- TCU được tối ưu hóa đề xuất biểu hiện mạnh của gen chỉ thị ở tất cả các kiểu phụ tế bào nón

Để thử nghiệm khả năng của TCU được tối ưu hóa được sáng chế mô tả để thúc đẩy biểu hiện protein gen báo cáo ở tế bào hình nón, võng mạc có nguồn gốc từ ES của người được chuyển hóa sử dụng AAVshh10-hG1.4.GFP, . Biểu hiện gen chỉ thị mạnh (Fig. 3A) ở tất cả các kiểu phụ tế bào nón (Fig. 3B', C') được quan sát.

So với gen khởi đầu arrestin hình nón (CAR) của người khác biệt trước đó, mức biểu hiện được đề xuất bởi hG1.4 cao hơn ở tế bào nón của người và không có biểu hiện lạc vị ở tế bào biểu mô sắc tố võng mạc (RPE) hoặc tế bào hình que. Ở chuột, gen khởi đầu hình nón dựa trên gen khởi đầu opsin đỏ của người không đặc hiệu ở tế bào nón và biểu hiện qua trung gian ở dạng que (Ye et al., 2016).

Ví dụ 3: Tối ưu hóa bổ sung của TCU và tối ưu hóa codon của gen *CNGA3* của người

Thay đổi trình tự GGGCCG ở các vị trí +5 đến +10 so với vị trí khởi đầu phiên mã của gen opsin xanh lá thành TCTAGA, gấp đôi cấp độ biểu hiện thu được. Sự thay đổi trình tự này (M8), xem SEQ ID NO:16, do đó được tích hợp vào cấu trúc hG1.4 và hG1.7

Ngoài ra, trình tự mã hóa của *CNGA3* được tối ưu hóa codon, cố gắng cải thiện thiên vị sử dụng codon và thành phần CG, và loại bỏ vị trí xử lý kín bất kỳ và cấu trúc vòng gốc tiềm năng trong mRNA.

Các cấu trúc hG1.4(M8) (SEQ ID NO:6) và hG1.7(M8) (SEQ ID NO:15) được sử dụng ở vector AAV2/8 mang cADN *CNGA3* tối ưu hóa codon của người (coCNGA3) và hiệu quả của vector được xác định ở mẫu chuột loại bỏ *CNGA3* sử dụng đánh giá điện cơ (ERG) của chức năng hình nón. Một tháng sau khi sử dụng vector, không có lợi thế rõ ràng hơn vector không có trình tự M8, mặc dù vector hG1.7(M8) dường như cho thấy cải thiện nhỏ so với vector tương ứng không có trình tự M8 (Fig. 4, thanh bên trái của cột). Khi đánh giá ERG ở các con vật này được lặp lại sau 2 tháng sử dụng, biên độ ở con vật tiêm với vector 'M8' còn được làm tăng lên (Fig. 4, thanh bên phải của cột), trong khi biên độ ở con vật tiêm với vector chuẩn vẫn không đổi (hG1.4) hoặc được làm tăng giới hạn (hG1.7). Được chứng minh rằng mức biểu hiện tối đa quan trọng để đạt được sự cứu chức năng tốt về mù màu do *CNGA3* và các kết quả này chỉ ra rằng sự bao gồm trình tự M8 ở cấu trúc có lợi cho điều trị.

Gen *CNGA3* tối ưu hóa codon cứu đáp ứng thích ứng ánh sáng ở chuột loại bỏ *Cnga3* hiệu quả hơn gen *CNGA3* của người kiểu dại (Fig. 5). Cấu trúc mang gen khởi đầu opsin đỏ (1.7L) điều khiển gen *CNGA3* của người kiểu dại hoặc gen *CNGA3* của người tối ưu hóa codon được đóng gói ở kiểu huyết thanh AAV2/8 và tiêm dưới võng mạc ở chuột thiếu *Cnga3*. Các đáp ứng ERG thích ứng ánh sáng được đánh giá 1 tháng và 2 tháng sau tiêm. Các đáp ứng ERG ở động vật nhận được vector tối ưu hóa codon liên tục cao hơn ở động vật nhận gen kiểu dại (Fig. 5).

Ví dụ 4: Các vector AAV2/8 biểu hiện *CNGA3* có thể cứu đáp ứng thích ứng ánh sáng ở chuột loại bỏ *CNGA3*, trong khi cấu trúc AA2/5 tương ứng đề xuất cứu nhỏ nhất

Để đánh giá khả năng của vector AAV2/5 và AAV2/8 biểu hiện *CNGA3* cứu đáp ứng thích ứng ánh sáng, vector virus AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3 và AAV2/5-hG1.4(M8).coCNGA3 được tiêm dưới võng mạc vào chuột loại bỏ *cnga3* 1 tháng tuổi. Đáp ứng ERG thích ứng ánh sáng được đánh giá 4 tuần sau sử dụng. Các tác giả sáng chế quan sát đáp ứng thích ứng ánh sáng mạnh ở mắt được điều trị AAV2/8 với biên độ sóng b ERG lên đến 70 μ V (Fig. 6 A và B). Đôi mắt nhận được tiêm dưới võng mạc ở cả hai bán cầu (trên/dưới) cho thấy cải thiện tốt nhất ở biên độ sóng b ERG. Để so sánh, chuột kiểu dại có biên độ quanh 100-120 μ V ở cùng cài đặt thử nghiệm. Không có đáp ứng từ mắt không được điều trị và mắt được điều trị AAV2/5 tạo đáp ứng nhỏ nhất (Fig. 6 A và B). Dữ liệu này thể hiện rằng vector AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3 có thể tạo mức biểu hiện *CNGA3* cao và khôi phục chức năng hình nón ở chuột loại bỏ *CNGA3* với khoảng 60% chức năng của kiểu dại, như được xác định bởi biên độ sóng b ERG hình nón.

Để chứng minh thêm rằng cứu độ nhạy võng mạc bởi vector AAV2/8 biểu hiện *CNGA3* lâu dài, chuột thiếu *Cnga3* được tiêm dưới võng mạc vào 2 tuần tuổi với AAV2/8-hG1.4(M8).coCNGA3 (n=14) hoặc AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3 (n=13) (độ chuẩn 1×10^{12} vg/ml cho cả hai), hoặc bỏ không được điều trị (n=3). Cả hai sự chuyển nhiễm với vector dẫn đến sự cứu độ nhạy võng mạc lên đến sáu tháng sau khi điều trị (Fig. 7).

Ví dụ 5: Các vector AAV2/8 biểu hiện *CNGA3* thúc đẩy sự sống sót hình nón dài hạn

Khả năng của vector AAV2/8 biểu hiện CNGA3 để thúc đẩy sự sống sót của tế bào nón được đánh giá bằng cách tiêm chuột thiếu *Cnga3* lúc 2 tuần tuổi với AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3. Chuột *C57BL/6J* 3-4 tháng tuổi, không nhận tiêm, làm đối chứng cho tế bào nón khỏe. Vồng mạc được phân lập và nhuộm bằng arrestin hình nón và làm sạch.

Các vồng mạc thiếu *Cnga3* được chuyển hóa với AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3 (xem Fig. 8C) cho thấy sự sống sót của tế bào nón *in vivo* 3-4 tháng sau khi điều trị. Mức độ sống sót tương tự với sống sót tế bào nón của đối chứng khỏe mạnh (xem Fig. 8A) và được làm tăng lên đáng kể so với vồng mạc thiếu *Cnga3* không được tiêm (xem Fig. 8B).

Khả năng của vector AAV2/8 biểu hiện CNGA3 thúc đẩy sự sống sót tế bào nón lâu dài và vẫn có thể được quan sát 13 tháng sau khi điều trị vector (xem Fig. 9).

Ví dụ 6: Các vector AAV2/8 biểu hiện CNGA3 bảo tồn kết nối synap *in vivo*

Để đánh giá khả năng của vector AAV2/8 biểu hiện CNGA3 cải thiện tính toàn vẹn của khớp thần kinh giữa tế bào hình nón và hỗ trợ các tế bào thần kinh (tế bào lưỡng cực), chuột thiếu *Cnga3* lúc 2 tuần tuổi được tiêm AAV2/8-hG1.7(M8).coCNGA3. 3-4 tháng sau khi điều trị, vồng mạc được phân lập và nhuộm bằng Gpr179 và PNA rồi xóa. Kết nối synap cũ được xác định bằng cách đo cường độ tín hiệu của điểm đánh dấu khớp thần kinh Gpr179 ở hình ảnh tiêu điểm mặt phẳng đơn của vồng mạc ngâm phẳng. Phần mềm Leica Las X được sử dụng để xử lý hình. Vết bản Gpr179 được truy tìm bằng cách vẽ đường rãnh tay trên một số cuộn hình nón liên quan đến vết Gpr179 (nhuộm PNA được sử dụng để xác nhận các cuộn hình nón) và hơn 10 spherule hình que liên quan đến vết Gpr179 (A). Cường độ tín hiệu là đầu ra (B; vạch trắng: Gpr179, vạch đỏ: PNA). Đỉnh của cường độ tín hiệu từ mỗi nguồn gốc được tính trung bình và từ cuộn hình nón đến hình que liên quan đến tỷ lệ GPr179 (CP/RS) được tính toán. CP/RS từ bốn vị trí khác nhau được sử dụng để phân tích thống kê (nhiều kiểm tra so sánh Bonferroni (ns: $p > 0,05$, **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$)). Vồng mạc từ chuột thiếu *Cnga3* không được tiêm và chuột *C57BL/6J* không được tiêm của cùng độ tuổi (3-4 tháng) là đối chứng dương và âm, tương ứng.

Như được thể hiện trên Fig. 10, sự chuyển nạp võng mạc *thiếu Cnga3* với vector AAV2/8 biểu hiện CNGA3 dẫn đến kết nối synap tương tự của chuột đối chứng khỏe mạnh và được cải thiện đáng kể so với võng mạc *thiếu Cnga3* không được tiêm.

Ví dụ 7: Phân phối coCNGA3 sử dụng AAV2/8 đề xuất lợi ích lớn hơn phân phối sử dụng kiểu huyết thanh AAV mạnh mới AAV-Anc80, AAV-44.9, và AAV5

Một số kiểu huyết thanh và capsit AAV khác nhau có sẵn để biểu hiện gen. Ví dụ, capsit Anc80-L65 đã phát triển mới được thể hiện có ái tính hiệu quả với tế bào nhận sáng và để có thể so sánh hoặc thậm chí vượt trội với AAV8. Ngoài ra, kiểu huyết thanh mới AAV44.9 cũng được thể hiện có hiệu quả chuyển nạp và biểu hiện cao ở tế bào nhận sáng khi được thí nghiệm kết hợp với gen đánh dấu huỳnh quang. Vì vậy, khả năng của bốn vector AAV khác nhau— Anc80-L65, AAV44.9, AAV5, và AAV8 – để biểu hiện coCNGA3 và tạo đáp ứng ERG duy trì được so sánh.

Vector tương ứng mang caset biểu hiện hG1.4(M8)-coCNGA3 ($1,0 \times 10^{12}$ vg/mL) được truyền đến không gian dưới võng mạc của chuột *thiếu Cnga3* ở 2 tuần tuổi, và ERG thích ứng ánh sáng nhấp nháy đơn được ghi lại tại các thời điểm khác nhau sau khi tiêm (xem Fig. 11). Kích thích ánh sáng của 10cd.s/m^2 được sử dụng để phân tích. Như được thể hiện trên Fig. 11, chuyển gen qua trung gian AAV8 dẫn đến đáp ứng ERG cao hơn so với Anc80-L65 (xem Fig. 11A), AAV44.9 (xem Fig. 11B), hoặc AAV5 (xem Fig. 11C và Fig. 6).

Ví dụ 8: So sánh TCU được tối ưu hóa với gen khởi đầu đặc hiệu tế bào nón, được biết trước đó

Để so sánh mức biểu hiện của TCU được sáng chế mô tả với một trong các gen khởi đầu đặc hiệu tế bào nón mạnh nhất có sẵn (1.7L), cơ thể phôi thai của người (hEBs) 17-19 tuần tuổi được chuyển hóa với vector AAV AAVShH10 biểu hiện eGFP trong sự kiểm soát của hG1.4(M8), hG1.7(M8) hoặc P1.7L, tương ứng, và được thu thập 2 tuần sau ($n = 6-8$ cho mỗi gen khởi đầu). Sau khi phân ly, tế bào được phân tích cường độ huỳnh quang trung bình tương đối (MFI) ở tế bào dương tính GFP. MFI tương đối trong hEBs được chuyển hóa với các vector khác nhau được đánh giá bằng phép đo tế bào dòng chảy và được tính toán theo tỷ lệ với MFI trong EBs được chuyển hóa với AAV ShH10-1.7L-eGFP. Như được thể hiện trên Fig. 12A, cấu trúc hG1.7 đề xuất tăng khoảng 50% ở biểu hiện GFP so với gen khởi đầu được biết trước đó 1.7L.

Ngoài ra, vector AAV2/8 điều khiển hCNGA3 từ gen khởi đầu hCAR (arrestin hình nón của người) ở chuột loại bỏ *CNGA3* được thí nghiệm. Đáp ứng thích ứng ánh sáng cứu không vượt quá 30% mức kiểu dại (Fig. 12B).

Đã được báo cáo rằng vector AAV2/5(Y719F) và gen khởi đầu opsin hình nón xanh lam của chuột có thể được sử dụng để cứu chuột loại bỏ *CNGA3*. Trong nghiên cứu đó, biên độ ERG thích ứng ánh sáng đạt được 30% của kiểu dại khi được tiêm ở P12 và được đánh giá 10 tuần sau điều trị (Michalakakis et al., 2010). Gần đây vector AAV5 và gen khởi đầu opsin đỏ 2.1 kb được sử dụng để cứu cừu thiếu *CNGA3*. Trong nghiên cứu này, có gấp đôi ERG nhấp nháy hình nón khi so với không được điều trị (Banin et al, 2015). Tuy nhiên, cả gen khởi đầu được biết là chỉ có chức năng trong tập con của tế bào nón của người (gen khởi đầu opsin hình nón xanh lam chỉ hoạt động với tế bào nón màu xanh lam và gen khởi đầu opsin đỏ 2.1 chỉ hoạt động trong tế bào nón màu đỏ).

Nghiên cứu sử dụng vector AAV2/5 với gen khởi đầu CBA để biểu hiện *CNGA3* của chuột ở chuột loại bỏ *CNGA3* bởi phòng thí nghiệm Hauswirth cho thấy cứu lên đến 70% biên độ sóng b hình nón ERG kiểu dại khi chuột được điều trị rất sớm (P14 được đánh giá 3 tuần sau điều trị –độ chuẩn virus 1E13) (Pang et al., 2012). Các tác giả sáng chế đạt được hiệu quả tương tự trong việc giải cứu quan sát thích ứng ánh sáng điều trị cùng mẫu động vật muộn hơn trong cuộc sống (1 tháng – độ chuẩn virus 7E12). Trong khi mù màu ở người là rối loạn không lan ra các nơi khác, mẫu chuột *CNGA3* có tế bào hình nón chết trong tháng đầu tiên chỉ ra rằng điều trị sớm hơn là có lợi. Gen khởi đầu CBA không đặc hiệu không có khả năng được sử dụng trong thử nghiệm *CNGA3*, nhưng ủng hộ ý kiến của các tác giả sáng chế là mức biểu hiện *CNGA3* cao là quan trọng để cứu tối ưu.

Tài liệu tham khảo

Altschul S. F. A protein alignment scoring system sensitive at all evolutionary distances. 1993 J Mol Evol 36:290-300.

Altschul S. F. et al Basic local alignment search tool. 1990 J Mol Biol 215:403-10.

Banin E., Gootwine E., Obolensky A., Ezra-Elia R., Ejzenberg A., Zelinger L., Honig H., Rosov A., Yamin E., Sharon D., Averbukh E., Hauswirth W. W., Ofri R.

Gene Augmentation Therapy Restores Retinal Function and Visual Behavior in a Sheep Model of CNGA3 Achromatopsia. 2015 *Mol Ther.* Sep;23(9):1423-33.

Davidoff et al. Purification of recombinant adeno-associated virus type 8 vectors by ion exchange chromatography generates clinical grade vector stock. 2004 *J. Virol. Methods* 121; 209-215.

Devereux J. et al. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. 1984 *Nucleic Acids Research* 12, 387-395.

Gao G. P., Alvira M. R., Wang L., Calcedo R., Johnston J., Wilson J. M. M. M. adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 (18) (2002), pp. 11854-11859

Hawes N., Wang X., Hurd R. E., Wang J., Davisson M. T., Nusinowitz S., Heckenlively J. R., Chang B. A Point Mutation in the *Cnga3* Gene Causes Cone Photoreceptor Function Loss (*cpfl5*) in Mice. 2006 *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: E-Abstr 4579

Henikoff S. and Henikoff J. G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919.

Karlin S. and Altschul S. F. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877.

Michalakakis S., Mühlfriedel R., Tanimoto N., Krishnamoorthy V., Koch S., Fischer M. D., Becirovic E., Bai L., Huber G., Beck S. C., Fahl E., Büning H., Paquet-Durand F., Zong X., Gollisch T., Biel M., Seeliger M. W. Restoration of cone vision in the CNGA3^{-/-} mouse model of congenital complete lack of cone photoreceptor function. 2010 *Mol Ther.* Dec;18(12):2057-63.

Pang J. J., Deng W. T., Dai X., Lei B., Everhart D., Umino Y., Li J., Zhang K., Mao S., Boye S. L., Liu L., Chiodo V. A., Liu X., Shi W., Tao Y., Chang B., Hauswirth W. W. AAV-mediated cone rescue in a naturally occurring mouse model of CNGA3-Achromatopsia. 2012 *PLoS One*. 7(4):e35250.

Shabaan S. A. and Deeb S. S. Functional Analysis of the Promoters of the Human Red and Green Visual Pigment Genes. 1998 *IOVS* 39: 885-896.

Smallwood P. M., Wang Y., Nathans J. Role of a Locus Control Region in the mutually exclusive expression of human red and green cone pigment genes. 2002 Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 22;99(2):1008-11.

Ye G. J., Budzynski E., Sonnentag P., Nork T. M., Sheibani N., Gurel Z., Boye S. L., Peterson J. J., Boye S. E., Hauswirth W. W., Chulay J. D. Cone-Specific Promoters for Gene Therapy of Achromatopsia and Other Retinal Diseases. 2016 Hum Gene Ther. Jan;27(1):72-82.

Thông tin trình tự

SEQ ID NO:1 - mảnh 1,2 kb của vùng kiểm soát quỹ tích (LCR) M/L opsin

TAGGAATAGAAGGGTGGGTGCAGGAGGCTGAGGGGTGGGGAAAGGGCAT
GGGTGTTTCATGAGGACAGAGCTTCCGTTTCATGCAATGAAAAGAGTTTGG
AGACGGATGGTGGTGACTGGACTATACACTTACACACGGTAGCGATGGTA
CACTTTGTATTATGTATATTTTACCACGATCTTTTTAAAGTGTCAAAGGCAA
ATGGCCAAATGGTTCCTTGTCCTATAGCTGTAGCAGCCATCGGCTGTAGT
GACAAAGCCCCTGAGTCAAGATGACAGCAGCCCCATAACTCCTAATCGG
CTCTCCCGCGTGGAGTCATTTAGGAGTAGTCGCATTAGAGACAAGTCCAAC
ATCTAATCTTCCACCCTGGCCAGGGCCCCAGCTGGCAGCGAGGGTGGGAG
ACTCCGGGCAGAGCAGAGGGCGCTGACATTGGGGCCCCGGCCTGGCTTGGG
TCCCTCTGGCCTTTCCCCAGGGGCCCCTCTTTCCTTGGGGCTTTCTTGGGCCG
CCACTGCTCCCGCTCCTCTCCCCCATCCCACCCCTCACCCCTCGTTCTT
CATATCCTTCTCTAGTGCTCCCTCCACTTTCATCCACCCTTCTGCAAGAGTG
TGGGACCACAAATGAGTTTTACCTGGCCTGGGGACACACGTGCCCCCAC
AGGTGCTGAGTGACTTTCTAGGACAGTAATCTGCTTTAGGCTAAAATGGGA
CTTGATCTTCTGTTAGCCCTAATCATCAATTAGCAGAGCCGGTGAAGGTGC
AGAACCTACCGCCTTTCCAGGCCTCCTCCCACCTCTGCCACCTCCACTCTCC
TTCCTGGGATGTGGGGGCTGGCACACGTGTGGCCCAGGGCATTGGTGGGA
TTGCACTGAGCTGGGTCATTAGCGTAATCCTGGACAAGGGCAGACAGGGC
GAGCGGAGGGCCAGCTCCGGGGGCTCAGGCAAGGCTGGGGGCTTCCCCCAG
ACACCCCACTCCTCCTCTGCTGGACCCCACTTCATAGGGCACTTCGTGTTC
TCAAAGGGCTTCCAAATAGCATGGTGGCCTTGGATGCCCAGGGAAGCCTC
AGAGTTGCTTATCTCCCTCTAGACAGAAGGGGAATCTCGGTCAAGAGGGA

GAGGTCGCCCTGTTCAAGGCCACCCAGCCAGCTCATGGCGGTAATGGGAC
 AAGGCTGGCCAGCCATCCCACCCTCAGAAGGGACCCGGTGGGGCAGGTGA
 TCTCAGAGGAGGCTCACTTCTGGGTCTCACATTCTTG

SEQ ID NO:2- mảnh gen khởi đầu opsin 2,0 kb M, mảnh 500 bp của SEQ ID
 NO:3 gạch chân, UTR in nghiêng không có trình tự M8

TAAAAAGCAAGTCTTGCCAGGGCAGTGGTGTGCACCTGTGGTCCCAGCTA
 CTCAGGATGCTGAGGCAGGAGGATTACTTGTGCCCAGCAAGTAGAGGCTG
 CAGTGACCTGTGACTGTGCTACTGCCCTCCAACCTGGGTGACAGAGTGAGA
 CCTTGTCTCAAAAAAAAAAAGAGCGGGGGGGGGGGGGCCGGGCGGGCGTG
 GTGGCTCACAGCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAAGCCAAGGCGGGTGGAT
 CACTTGAGGTCAGGAGTTTGAGACCATCATGGTCAACACTGCGAAACACT
 GTCCCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCGGGCATGGTGGCACACACCTGT
 AATCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAGCCGGGGA
 GACGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGACTGCGCCACTGCACTCCAGCCTGACT
 GACAAGAGTGAGATTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTAATCACTAGAAA
 AGAAGCTACATATGTACATAACATCCAAATAACCAAGAGGAGAAAAAAT
 GGGACTTGATTAATCAAACAAAAACAAAAAAGAAAGAAAGAAAGGGGG
 AGAAAATAAAACAAGGGCTGGGTGTGCTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGC
 ACTTTGGAAGCCAAGGTGGGTGGATCTCTTGAGCTCAGGAGGTCAAGACC
 AGCCTGGGCAACATGGCGAAACCCCGTCTCTATTAAAAAAAAAAATTAATA
 CAACAATTATCCTGGAGTGGTGGTGCACACCTGTAGTCCCAGCTACCCAGG
 ACGCTGAGACGGGAGGATCGCTTGATCCCGGGGATGTCGAGGCTGCCGTG
 ATCGCACCACTGCCCTCCAGCCAGGGTGGCAGACTGAGACCCCATCTCAA
 AAAATAAATAAATAAAAGCAAACAAGAAAAAAAAAAGGCTTGAAACATAT
 CTGATAGATAAAGGGCTAATCAACACAATATATAAAGAACTGCAAATCAG
 TAAACTAAGAGCAAATAACCCAATATAAAGACATTAAAGGGTAGCCACGG
 ACATCTCAGACGACGAAAAACAAAAGACAGTAAACGTATAATAAAACATG
 TAATTGCAAGGTGATCCGGGAATAGTAAGCGAAAAGCAACAATTAAATAC
 TATTTTCTCATCCACCAGAACGCCAAAAATTAAAAAGCCTAACAATGTCCA
 GGGCTGGCGAGAATGTGGCAGAAGGTGATGTCACATACCCTGCAAGTGGG
 AATCTAAACAGATTCAGGGTTTTGGTTTTTTTTTAATCGCAATTAGGTGGCC
 TGTAAATTTTTTTTCTTGAGACAGAGTTTTTGCTCTTGTTGCCCAGGCTGGA

GTGCAATGGCTCGATCTTGGCTCACCGCAACCTCGACCTCCCAGGTACAAG
 CGATTCTCCTGTCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGAGTACAGGTATTTGCCA
CTAAGCCCAGCTAATTGTTTTTTATTTAGTAGAAACGGGGTTTCACCATGTT
AGTCAGGCTGGTCGGGAACCTCCTGACCTCAGGAGATCTACCCGCCTTGGCC
TCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGTGCCACTGTGCCCAGCCACTTTTT
TTTAGACAGAGTCTTGGTCTGTTGCCCAGGCTAGAGTTCAGTGGCGCCATC
TCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCCAGATTCAAGCGATTCTCCTGCCTCG
ACCTCCCAGTAGCTGGGATTACAGGTTTCCAGCAAATCCCTCTGAGCCGCC
CCCGGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGGTGGGAGGAGGAGG
TCTAAGTCCCAGGCCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTAGGATTTGGGAGCT
TTTAAGGTGAAGAGGCCCGGGCTGATCCCACTGGCCGGTATAAAGCACCG
TGACCCTCAGGTGACGCACCAGGGCCGGCTGCCGTCGGGGACAGGGCTTTC
CATAGCC

SEQ ID NO:3- mảnh opsin 500 bp M, UTR in nghiêng, đột biến M8 gạch chân

ACAGGTATTTGCCACTAAGCCCAGCTAATTGTTTTTTATTTAGTAGAAACG
 GGGTTTCACCATGTTAGTCAGGCTGGTCGGGAACCTCCTGACCTCAGGAGAT
 CTACCCGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGTGCCACTGT
 GCCCAGCCACTTTTTTTTAGACAGAGTCTTGGTCTGTTGCCCAGGCTAGAG
 TTCAGTGGCGCCATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCCAGATTCAAGC
 GATTCTCCTGCCTCGACCTCCCAGTAGCTGGGATTACAGGTTTCCAGCAA
 TCCCTCTGAGCCGCCCCCGGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGG
 GTGGGAGGAGGAGGTCTAAGTCCCAGGCCCAATTAAGAGATCAGATGGTG
 TAGGATTTGGGAGCTTTTAAGGTGAAGAGGCCCGGGCTGATCCCACTGGCC
 GGTATAAAGCACCGTGACCCTCAGGTGACGCACCATCTAGAGCTGCCGTCG
GGGACAGGGCTTTCATAGCC

SEQ ID NO:4 - biến thể của cấu trúc hG1.7(M8), mảnh LCR opsin 1,2 kb M/L,
 mảnh opsin 500 bp M, UTR in nghiêng, đột biến M8 gạch chân

TAGGAATAGAAGGGTGGGTGCAGGAGGCTGAGGGGTGGGGAAAGGGCAT
 GGGTGTTTCATGAGGACAGAGCTTCCGTTTCATGCAATGAAAAGAGTTTGG
 AGACGGATGGTGGTGACTGGACTATACTTACACACGGTAGCGATGGTA
 CACTTTGTATTATGTATATTTTACCACGATCTTTTAAAGTGTCAAAGGCAA

ATGGCCAAATGGTTCCTTGTCCTATAGCTGTAGCAGCCATCGGCTGTTAGT
GACAAAGCCCCTGAGTCAAGATGACAGCAGCCCCATAACTCCTAATCGG
CTCTCCCGCGTGGAGTCATTTAGGAGTAGTCGCATTAGAGACAAGTCCAAC
ATCTAATCTTCCACCCTGGCCAGGGCCCCAGCTGGCAGCGAGGGTGGGAG
ACTCCGGGCAGAGCAGAGGGGCGCTGACATTGGGGCCCCGGCCTGGCTTGGG
TCCCTCTGGCCTTTCCCCAGGGGGCCCTCTTTCCTTGGGGCTTTCTTGGGCCG
CCACTGCTCCCGCTCCTCTCCCCCATCCCACCCCCTCACCCCCTCGTTCTT
CATATCCTTCTCTAGTGCTCCCTCCACTTTCATCCACCCTTCTGCAAGAGTG
TGGGACCACAAATGAGTTTTTCACCTGGCCTGGGGACACACGTGCCCCCAC
AGGTGCTGAGTGACTTTCTAGGACAGTAATCTGCTTTAGGCTAAAATGGGA
CTTGATCTTCTGTTAGCCCTAATCATCAATTAGCAGAGCCGGTGAAGGTGC
AGAACCTACCGCCTTTCCAGGCCTCCTCCCACCTCTGCCACCTCCACTCTCC
TTCCTGGGATGTGGGGGGCTGGCACACGTGTGGCCCAGGGCATTGGTGGGA
TTGCACTGAGCTGGGTCATTAGCGTAATCCTGGACAAGGGCAGACAGGGC
GAGCGGAGGGCCAGCTCCGGGGGCTCAGGCAAGGCTGGGGGGCTTCCCCCAG
ACACCCCCTCCTCCTCTGCTGGACCCCCACTTCATAGGGCACTTCGTGTTC
TCAAAGGGCTTCCAAATAGCATGGTGGCCTTGGATGCCCAGGGAAGCCTC
AGAGTTGCTTATCTCCCTCTAGACAGAAGGGGAATCTCGGTCAAGAGGGA
GAGGTGCCCCCTGTTCAAGGCCACCCAGCCAGCTCATGGCGGTAATGGGAC
AAGGCTGGCCAGCCATCCCACCCTCAGAAGGGACCCGGTGGGGCAGGTGA
TCTCAGAGGAGGCTCACTTCTGGGTCTCACATTCTTGACAGGTATTTGCCA
CTAAGCCCAGCTAATTGTTTTTTATTTAGTAGAAACGGGGTTTCACCATGTT
AGTCAGGCTGGTCGGGAACCTCCTGACCTCAGGAGATCTACCCGCCTTGGCC
TCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGTGCCACTGTGCCAGCCACTTTTT
TTTAGACAGAGTCTTGGTCTGTTGCCAGGCTAGAGTTCAGTGGCGCCATC
TCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCCAGATTCAAGCGATTCTCCTGCCTCG
ACCTCCCAGTAGCTGGGATTACAGGTTTCCAGCAAATCCCTCTGAGCCGCC
CCCGGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGGTGGGAGGAGGAGG
TCTAAGTCCCAGGCCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTAGGATTTGGGAGCT
TTTAAGGTGAAGAGGCCCCGGGCTGATCCCCTGGCCGGTATAAAGCACCG
TGACCCTCAGGTGACGCACCATCTAGAGCTGCCGTCGGGGACAGGGCTTTCC
ATAGCC

SEQ ID NO:5 - mảnh opsin 200 bp M, UTR in nghiêng, đột biến M8 gạch chân

GATCGATTACAGGTTTCCAGCAAATCCCTCTGAGCCGCCCCCGGGGGCTCG
CCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGGTGGGAGGAGGAGGTCTAAGTCCCAG
GCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTAGGATTTGGGAGCTTTTAAGGTGAA
GAGGCCCGGGCTGATCCCCTGGCCGGTATAAAGCACCGTGACCCTCAGG
TGACGCACCACTAGAGCTGCCGTCGGGGACAGGGCTTTCATAGCC

SEQ ID NO:6 - cấu trúc hG1.4(M8): mảnh LCR opsin 1,2 kb M/L, mảnh opsin 200bp M, UTR in nghiêng, đột biến M8 gạch chân

TAGGAATAGAAGGGTGGGTGCAGGAGGCTGAGGGGTGGGGAAAGGGCAT
GGGTGTTTCATGAGGACAGAGCTTCCGTTTCATGCAATGAAAAGAGTTTGG
AGACGGATGGTGGTGACTGGACTATACACTTACACACGGTAGCGATGGTA
CACTTTGTATTATGTATATTTTACCACGATCTTTTAAAGTGTCAAAGGCAA
ATGGCCAAATGGTTCCTTGTCTATAGCTGTAGCAGCCATCGGCTGTTAGT
GACAAAGCCCCTGAGTCAAGATGACAGCAGCCCCATAACTCCTAATCGG
CTCTCCCGCGTGGAGTCATTTAGGAGTAGTCGCATTAGAGACAAGTCCAAC
ATCTAATCTTCCACCCTGGCCAGGGCCCCAGCTGGCAGCGAGGGTGGGAG
ACTCCGGGCAGAGCAGAGGGCGCTGACATTGGGGCCCGGCCTGGCTTGGG
TCCCTCTGGCCTTTCCCCAGGGGCCCCTCTTTCCTTGGGGCTTTCTTGGGCCG
CCACTGCTCCCGCTCCTCTCCCCCATCCCACCCCCTCACCCCCTCGTTCTT
CATATCCTTCTCTAGTGCTCCCTCCACTTTCATCCACCCTTCTGCAAGAGTG
TGGGACCACAAATGAGTTTTACCTGGCCTGGGGACACACGTGCCCCCAC
AGGTGCTGAGTGACTTTCTAGGACAGTAATCTGCTTTAGGCTAAAATGGGA
CTTGATCTTCTGTTAGCCCTAATCATCAATTAGCAGAGCCGGTGAAGGTGC
AGAACCTACCGCCTTTCCAGGCCTCCTCCCACCTCTGCCACCTCCACTCTCC
TTCCTGGGATGTGGGGGCTGGCACACGTGTGGCCCAGGGCATTGGTGGGA
TTGCACTGAGCTGGGTCATTAGCGTAATCCTGGACAAGGGCAGACAGGGC
GAGCGGAGGGCCAGCTCCGGGGCTCAGGCAAGGCTGGGGGCTTCCCCCAG
ACACCCCCTCCTCCTCTGCTGGACCCCCACTTCATAGGGCACTTCGTGTTC
TCAAAGGGCTTCCAAATAGCATGGTGGCCTTGGATGCCCAGGGAAGCCTC
AGAGTTGCTTATCTCCCTCTAGACAGAAGGGGAATCTCGGTCAAGAGGGA
GAGGTCGCCCTGTTCAAGGCCACCCAGCCAGCTCATGGCGGTAATGGGAC
AAGGCTGGCCAGCCATCCCACCCCTCAGAAGGGACCCGGTGGGGCAGGTGA

TCTCAGAGGAGGCTCACTTCTGGGTCTCACATTCTTGGATCGATTACAGGT
 TTCCAGCAAATCCCTCTGAGCCGCCCCCGGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAG
 GAAGCAAGGGGTGGGAGGAGGAGGTCTAAGTCCCAGGCCCAATTAAGAG
 ATCAGATGGTGTAGGATTTGGGAGCTTTTAAGGTGAAGAGGCCCGGGCTG
 ATCCCACTGGCCGGTATAAAGCACCGTGACCCTCAGGTGACGCACCATCTA
GAGCTGCCGTCGGGGACAGGGCTTTCCATAGCC

SEQ ID NO:7- cADN *CNGA3* tối ưu hóa không codon

ATGGCCAAGATCAACACCCAATACTCCCACCCCTCCAGGACCCACCTCAA
 GGTAAGACCTCAGACCGAGATCTCAATCGCGCTGAAAATGGCCTCAGCA
 GAGCCCACTCGTCAAGTGAGGAGACATCGTCAGTGCTGCAGCCGGGGATC
 GCCATGGAGACCAGAGGACTGGCTGACTCCGGGCAGGGCTCCTTACCCGG
 CCAGGGGATCGCCAGGCTGTTCGCGCCTCATCTTCTTGCTGCGCAGGTGGGC
 TGCCAGGCATGTGCACCACCAGGACCAGGGACCGGACTCTTTTCCTGATCG
 TTTCCGTGGAGCCGAGCTTAAGGAGGTGTCCAGCCAAGAAAGCAATGCCC
 AGGCAAATGTGGGCAGCCAGGAGCCAGCAGACAGAGGGAGAAGCGCCTG
 GCCCCTGGCCAAATGCAACACTAACACCAGCAACAACACGGAGGAGGAG
 AAGAAGACGAAAAAGAAGGATGCGATCGTGGTGGACCCGTCCAGCAACCT
 GTACTACCGCTGGCTGACCGCCATCGCCCTGCCTGTCTTCTATAACTGGTA
 TCTGCTTATTTGCAGGGCCTGTTTCGATGAGCTGCAGTCCGAGTACCTGAT
 GCTGTGGCTGGTCCTGGACTACTCGGCAGATGTCCTGTATGTCTTGATGT
 GCTTGTACGAGCTCGGACAGGTTTTCTCGAGCAAGGCTTAATGGTCAGTGA
 TACCAACAGGCTGTGGCAGCATTACAAGACGACCACGCAGTTCAAGCTGG
 ATGTGTTGTCCCTGGTCCCCACCGACCTGGCTTACTTAAAGGTGGGCACAA
 ACTACCCAGAAGTGAGGTTCAACCGCCTACTGAAGTTTTCCCGGCTCTTTG
 AATTCTTTGACCGCACAGAGACAAGGACCAACTACCCCAATATGTTTCAGG
 ATTGGGAACCTGGTCTTGTACATTCTCATCATCCACTGGAATGCCTGC
 ATCTACTTTGCCATTTCCAAGTTCATTGGTTTTGGGACAGACTCCTGGGTCT
 ACCCAAACATCTCAATCCCAGAGCATGGGCGCCTCTCCAGGAAGTACATTT
 ACAGTCTCTACTGGTCCACCTTGACCCTTACCACCATTGGTGAGACCCAC
 CCCCCGTGAAAGATGAGGAGTATCTCTTTGTGGTCGTAGACTTCTTGGTGG
 GTGTTCTGATTTTTGCCACCATTGTGGGCAATGTGGGCTCCATGATCTCGA
 ATATGAATGCCTCACGGGCAGAGTTCCAGGCCAAGATTGATTCCATCAAG

CAGTACATGCAGTTCCGCAAGGTCACCAAGGACTTGGAGACGCGGGTTAT
 CCGGTGGTTTACTACCTGTGGGCCAACAAGAAGACGGTGGATGAGAAGG
 AGGTGCTCAAGAGCCTCCCAGACAAGCTGAAGGCTGAGATCGCCATCAAC
 GTGCACCTGGACACGCTGAAGAAGGTTTCGCATCTTCCAGGACTGTGAGGC
 AGGGCTGCTGGTGGAGCTGGTGCTGAAGCTGCGACCCACTGTGTTTCAGCCC
 TGGGGATTATATCTGCAAGAAGGGAGATATTGGGAAGGAGATGTACATCA
 TCAACGAGGGCAAGCTGGCCGTGGTGGCTGATGATGGGGTACCCAGTTC
 GTGGTCCTCAGCGATGGCAGCTACTTCGGGGAGATCAGCATTCTGAACATC
 AAGGGGAGCAAGTCGGGGAACCGCAGGACGGCCAACATCCGCAGCATTG
 GCTACTCAGACCTGTTCTGCCTCTCAAAGGACGATCTCATGGAGGCCCTCA
 CCGAGTACCCCGAAGCCAAGAAGGCCCTGGAGGAGAAAGGACGGCAGAT
 CCTGATGAAAGACAACCTGATCGATGAGGAGCTGGCCAGGGCGGGCGCGG
 ACCCCAAGGACCTTGAGGAGAAAGTGGAGCAGCTGGGGTCCTCCCTGGAC
 ACCCTGCAGACCAGGTTTGCACGCCTCCTGGCTGAGTACAACGCCACCCAG
 ATGAAGATGAAGCAGCGTCTCAGCCAACCTGGAAAGCCAGGTGAAGGGTGG
 TGGGGACAAGCCCCTGGCTGATGGGGAAGTTCCCGGGGATGCTACAAAAA
 CAGAGGACAAACAACAGTGA

SEQ ID NO:8 - cADN *CNGA3* tối ưu hóa codon

ATGGCAAAAATCAATACCCAGTACAGCCACCCCTCACGAACTCACCTGAA
 AGTCAAAAACAAGCGATAGAGACCTGAACAGAGCCGAGAACGGCCTGTCCA
 GGGCCACAGCTCCTCTGAGGAACTAGTTCAGTGCTGCAGCCTGGAATC
 GCTATGGAGACCAGAGGGCTGGCTGACTCTGGCCAAGGAAGTTTCACAGG
 GCAGGGCATCGCCAGGCTGTCTAGACTGATTTTTCTGCTGAGGAGATGGGC
 CGCTAGGCATGTGCACCATCAGGACCAGGGACCCGATAGTTTCCCTGAC
 AGGTTCAGGGGGGCGGAACCTGAAGGAGGTCAGCTCCCAGGAATCTAACGC
 ACAGGCCAATGTGGGCAGTCAGGAGCCCGCTGATAGAGGACGGTCCGCAT
 GGCCTCTGGCCAAGTGCAACACTAATACCTCTAACAATACAGAGGAAGAG
 AAGAAAATAAGAAAAAGGATGCCATCGTGGTCGACCCTTCTAGTAACCT
 GTACTATAGGTGGCTGACAGCTATCGCACTGCCAGTGTTCTACAATTGGTA
 TCTGCTGATTTGCAGAGCTTGTTTTGACGAACTGCAGAGTGAGTATCTG
 ATGCTGTGGCTGGTGCTGGATTACTCAGCAGACGTGCTGTATGTGCTGGAT
 GTCCTGGTGCGCGCACGAACTGGGTTCCCTGGAGCAGGGCCTGATGGTGAG

CGACACCAACAGACTGTGGCAGCACTACAAAACCACAACCTCAGTTTAAGC
TGGATGTCCTGTCCCTGGTGCCAACCGACCTGGCCTACCTGAAAGTCGGCA
CAAACCTATCCCGAGGTGCGGTTCAATCGCCTGCTGAAGTTCTCTCGGCTGT
TTGAGTTCTTCGATAGGACAGAGACTAGAACCAACTACCCAAATATG
TTCCGCATCGGCAACCTGGTGCTGTATATTCTGATCATTATCCACTGGAAT
GCTTGTATCTACTTTGCAATCAGCAAGTTCATTGGATTTGGGACCGACAGC
TGGGTGTATCCAAACATTTCCATCCCCGAACATGGACGACTGAGCAGGAA
GTACATCTATTCACTGTACTGGAGCACACTGACTCTGACCACAATTGGGGA
GACCCCCCTCCAGTGAAGGATGAAGAGTACCTGTTCGTGGTCGTGGACTT
TCTGGTCGGCGTGCTGATCTTCGCAACAATTGTCGGCAATGTGGGA
AGTATGATCTCAAACATGAATGCCTCACGAGCTGAGTTCCAGGCTAAAATT
GACAGCATCAAGCAGTATATGCAGTTTAGAAAAGTCACTAAGGATCTGGA
GACCAGAGTGATCCGGTGGTTTGACTACCTGTGGGCCAACAAAAAGACAG
TCGATGAAAAAGAGGTGCTGAAGAGCCTGCCCCGACAACTGAAGGCAGA
GATTGCCATCAATGTCCATCTGGATACTCTGAAAAAGGTGCGGATCTTCCA
GGACTGCGAAGCAGGACTGCTGGTCGAGCTGGTGCTGAAGCTGCGCCCT
ACCGTGTTTAGCCCAGGCGATTATATCTGTAAAAAGGGGGACATTGGCAA
AGAAATGTACATTATCAACGAGGGGAAGCTGGCTGTCGTGGCAGACGATG
GCGTGACCCAGTTCGTCTGTGCTGAGCGATGGCAGCTATTTTGGGGAAATTT
CCATCCTGAATATCAAAGGCTCCAAGTCTGGAAACCGGCGCACAGCTAAT
ATTCGGTCCATCGGATATTCTGACCTGTTCTGCCTGTCTAAGGACGATCTG
ATGGAGGCACTGACTGAATACCCCGAGGCCAAAAAGGCTCTGGAAGAG
AAAGGCCGGCAGATCCTGATGAAGGATAACCTGATTGACGAAGAGCTGGC
ACGAGCTGGAGCAGACCCTAAAGATCTGGAAGAGAAGGTGGAGCAGCTG
GGATCAAGCCTGGATACCCTGCAGACACGCTTCGCTCGACTGCTGGCAGA
ATACAATGCCACCCAGATGAAAATGAAGCAGCGCCTGAGTCAGCTGGAGT
CACAGGTGAAAGGCGGAGGGGACAAGCCCCTGGCAGATGGCGAAGTCCCT
GGCGACGCTACAAAAACAGAAGATAAACAGCAGTAA

SEQ ID NO:9 - cADN *PDE6C*, NM_006204.3

ATGGGTGAGATCAACCAAGTTGCCGTGGAGAAATACCTGGAGGAGAACCC
TCAGTTTGCCAAGGAGTACTTTGACAGGAAGTTGCGGGTGGAGGTGCTGG
GAGAAATCTTCAAGAACAGCCAGGTGCCAGTCCAGTCCAGCATGTCCTTCT

CTGAGCTGACCCAGGTGGAGGAGTCAGCCCTGTGCTTGGAGCTGCTGTGG
ACCGTGCAGGAGGAGGGGGGCACCCCAGAGCAGGGGGTTACAGGGCCC
TGCAGAGGCTGGCCACCTGCTCCAGGCTGACCGCTGCAGCATGTTCTGT
GCCGGTCCCGGAACGGCATACTGAGGTGGCCTCTAGGTTGCTGGATGTCA
CCCCACCTCCAAGTTTGAGGACAACCTGGTGGGCCCTGACAAAGAAGTT
GTGTTTCCATTGGACATTGGGATAGTGGGTTGGGCTGCTCACACGAAGAAA
ACTCATAATGTCCCAGATGTGAAAAAGAACAGCCATTTTTCTGACTTCATG
GACAAGCAAACCTGGGTATGTCACTAAGAACCTGCTGGCAACCCCGATCGT
GGTGGGCAAGGAGGTTCTTGCTGTGATCATGGCAGTTAACAAAGTAAATG
CATCTGAATTTTCCAAACAGGATGAAGAGGTCTTTTCCAAATACCTCAACT
TTGTGTCTATCATCCTAAGGCTTCATCACACCAGCTACATGTACAATATTG
AATCCCGAAGAAGCCAGATCCTTATGTGGTCAGCCAATAAAGTATTTGAA
GAACTCACAGATGTTGAGCGACAGTTTCACAAAGCGCTCTACACGGTTAG
ATCATATCTGAACTGTGAACGATACTCCATTGGACTGCTGGACATGACCAA
GGAGAAGGAATTCTACGATGAATGGCCAATCAAGCTTGGAGAAGTAGAGC
CTTATAAAGGTCCAAAGACACCTGATGGCAGGGAAGTCAACTTTTATAAA
ATCATTGATTACATTTTACATGGAAAAGAAGAGATCAAAGTGATTCCGACG
CCTCCTGCAGACCACTGGACACTCATTAGTGGGTTGCCAACATATGTTGCT
GAAAATGGATTTATCTGTAACATGATGAATGCCCTGCGGATGAATACTTC
ACATTTTCAGAAAGGACCTGTAGACGAAACTGGTGGGGTCATTAAGAATGTT
TTGTCCCTGCCTATTGTCAACAAGAAAGAAGATATTGTGGGAGTGGCTACA
TTTTACAACAGGAAGGATGGAAAACCTTTTCGATGAGCATGATGAATACATT
ACCGAGACTCTCACACAATTTCTTGGATGGTCTCTTTTAAATACTGACACCT
ACGATAAGATGAATAAGCTAGAAAACAGAAAGGACATTGCTCAGGAAATG
CTCATGAACCAAACCAAAGCCACTCCTGAAGAAATTAAGTCCATTTTGAA
ATTTCAAGAGAAGTTAAATGTTGATGTAATTGACGACTGTGAAGAAAAAC
AACTTGTTGCAATTTTGAAAGAGGACTTGCCAGACCCACGCTCAGCAGAA
CTGTACGAATTCCGCTTCAGTGACTTCCCCCTTACAGAGCACGGATTGATT
AAATGTGGAATACGACTGTTTTTTGAAATAAATGTGGTGGAGAAATTCAAA
GTACCTGTAGAGGTTCTTACCAGATGGATGTACACTGTGAGGAAAGGGTA
CCGAGCTGTCACTTACCACAATTGGCGGCATGGGTTCAACGTGGGGCAGA
CCATGTTTACTTTGCTGATGACAGGAAGATTAAAGAAGTACTACACAGATC

TCGAAGCCTTTGCCATGCTTGCTGCTGCTTTCTGCCATGATATTGACCACAG
AGGCACCAATAATTTGTACCAGATGAAATCCACGTCTCCATTAGCAAGACT
TCATGGTTCTTCTATTTTGGAGAGGCACCACCTGGAGTACAGTAAGACTCT
GTTGCAGGATGAGAGTTTAAACATCTTCCAGAACCTAAATAAGCGGCAGTT
TGAAACAGTTATTCATTTGTTTCGAGGTCGCAATAATAGCAACTGACCTGGC
TTTATATTTCAAGAAGAGGACCATGTTTCAAAAAAATTGTTGATGCCTGTGA
ACAAATGCAAACGGAAGAAGAAGCCATCAAATATGTAAGTGTGATCCAA
CCAAGAAAGAGATTATCATGGCAATGATGATGACGGCATGTGACTTGTCT
GCTATTACCAAGCCCTGGGAGGTGCAAAGTCAGGTAGCACTTATGGTTGCA
AATGAATTTTGGGAACAAGGAGATCTGGAGAGAACAGTGTTGCAGCAACA
ACCCATTCTATGATGGACAGAAACAAAAGAGATGAATTACCTAAACTTC
AAGTTGGATTTATTGATTTTGTGTGACTTTTGTATATAAGGAGTTCTCACG
GTTTCACAAAGAAATCACACCTATGCTGAGTGGTCTTCAGAATAACAGAGT
AGAATGGAAATCACTAGCTGATGAGTATGATGCAAAGATGAAGGTCATTG
AAGAGGAGGCAAAAAAGCAAGAAGGAGGAGCCGAAAAAGCTGCTGAAGA
TTCAGGAGGTGGTGATGACAAAAAGTCCAAAACATGTTTAATGTTGTAA

SEQ ID NO:10 - cADN *PDE6H*, NM_006205.2

ATGAGTGACAACACTACTCTGCCTGCTCCAGCTTCAAACCAGGGTCCTACC
ACCCACGCAAAGGCCCTCCCAAGTTCAAGCAGAGGCAGACTCGCCAATT
CAAGAGTAAACCTCCAAAGAAAGGTGTGAAAGGATTTGGAGATGACATTC
CAGGAATGGAGGGGCTAGGAACAGATATCACAGTGATTTGTCCATGGGAG
GCATTCAGCCACCTGGAATTGCATGAGCTCGCTCAGTTTGGGATTATCTGA

SEQ ID NO:11 - cADN *GNAT2*, NM_005272.3

ATGGGAAGTGGAGCCAGTGCTGAGGACAAAGAACTGGCCAAGAGGTCCA
AGGAGCTAGAAAAGAAGCTGCAGGAGGATGCTGATAAGGAAGCCAAGAC
TGTCAGCTGCTACTGCTGGGTGCTGGGGAGTCAGGAAAGAGCACCATCG
TCAAACAGATGAAGATCATTACCAGGATGGCTATTCACCAGAAGAATGC
CTGGAGTTCAAGGCTATCATCTATGGAAATGTGCTGCAGTCCATCCTGGCT
ATCATCCGGGCCATGACCACACTGGGCATCGATTATGCTGAACCAAGCTGT
GCGGATGACGGGCGACAGCTCAACAACCTGGCTGACTCCATTGAGGAGGG
AACCATGCCTCCTGAGCTCGTGGAGGTCATTAGGAGGTTGTGGAAGGATG

GTGGGGTGCAAGCCTGCTTCGAGAGAGCTGCAGAATACCAGCTTAATGAC
TCCGCATCTTACTACCTGAACCAATTAGAACGAATTACAGACCCTGAGTAC
CTCCCTAGTGAGCAAGATGTGCTCCGATCCAGAGTCAAAACCACGGGGCAT
CATTGAAACCAAGTTTTCCGTCAAAGACTTGAATTTTCAGGATGTTTGATGT
GGGAGGGCAGAGATCCGAGAGAAAGAAGTGGATCCACTGCTTCGAGGGA
GTCACCTGCATCATTTTTCTGTGCAGCCCTCAGTGCCTATGATATGGTGCTGG
TGGAAGATGACGAAGTGAATCGTATGCATGAGTCTTTGCATCTGTTCAACA
GCATATGTAACCACAAATTCTTTGCGGCTACTTCCATTGTCCTCTTTCTCAA
CAAGAAGGACCTCTTTGAGGAAAAAATCAAGAAAGTCCATCTCAGCATTT
GTTTTCCAGAGTATGATGGTAACAACCTCCTATGATGATGCGGGGAATTACA
TAAAGAGCCAGTTCCTTGACCTCAATATGCGAAAAGATGTCAAAGAAATC
TACAGTCACATGACCTGTGCTACAGATACACAGAATGTCAAATTTGTGTTT
GATGCAGTTACAGATATTATCATCAAAGAAAACCTCAAGGACTGCGGCCT
CTTCTAA

SEQ ID NO:12 - cADN *KCNV2*, NM_133497.3

ATGCTCAAACAGAGTGAGAGGAGACGGTCCTGGAGCTACAGGCCCTGGAA
CACGACGGAGAATGAGGGCAGCCAACACCGCAGGAGCATTTGCTCCCTGG
GTGCCCCGTTCCGGCTCCCAGGCCAGCATCCACGGCTGGACAGAGGGCAAC
TATAACTACTACATCGAGGAAGACGAAGACGGCGAGGAGGAGGACCAGT
GGAAGGACGACCTGGCAGAAGAGGACCAGCAGGCAGGGGAGGTCACCAC
CGCCAAGCCCGAGGGCCCCAGCGACCCTCCGGCCCTGCTGTCCACGCTGA
ATGTGAACGTGGGTGGCCACAGCTACCAGCTGGACTACTGCGAGCTGGCC
GGCTTCCCCAAGACGCGCCTAGGTTCGCTGGCCACCTCCACCAGCCGCAGC
CGCCAGCTAAGCCTGTGCGACGACTACGAGGAGCAGACAGACGAATACTT
CTTCGACCGCGACCCGGCCGTCTTCCAGCTGGTCTACAATTTCTACCTGTCC
GGGGTGCTGCTGGTGCTCGACGGGCTGTGTCCGCGCCGCTTCCTGGAGGAG
CTGGGCTACTGGGGCGTGCGGCTCAAGTACACGCCACGCTGCTGCCGCATC
TGCTTCGAGGAGCGGCGCGACGAGCTGAGCGAACGGCTCAAGATCCAGCA
CGAGCTGCGCGCGCAGGCGCAGGTCGAGGAGGCGGAGGAACTCTTCCGCG
ACATGCGCTTCTACGGCCCGCAGCGGCGCCGCCTCTGGAACCTCATGGAG
AAGCCATTCTCCTCGGTGGCCGCCAAGGCCATCGGGGTGGCCTCCAGCACC
TTCGTGCTCGTCTCCGTGGTGGCGCTGGCGCTCAACACCGTGGAGGAGATG

CAGCAGCACTCGGGGCAGGGCGAGGGCGGCCCAGACCTGCGGGCCCATCCT
GGAGCACGTGGAGATGCTGTGCATGGGCTTCTTCACGCTCGAGTACCTGCT
GCGCCTAGCCTCCACGCCCCGACCTGAGGCGCTTCGCGCGCAGCGCCCTCAA
CCTGGTGGACCTGGTGGCCATCCTGCCGCTCTACCTTCAGCTGCTGCTCGA
GTGCTTCACGGGCGAGGGCCACCAACGCGGGCCAGACGGTGGGCAGCGTGG
GTAAGGTGGGTCAGGTGTTGCGCGTCATGCGCCTCATGCGCATCTTCCGCA
TCCTCAAGCTGGCGCGCCACTCCACCGGACTGCGTGCCTTCGGCTTCACGC
TGCGCCAGTGCTACCAGCAGGTGGGCTGCCTGCTGCTCTTCATCGCCATGG
GCATCTTCACTTTCTCTGCGGCTGTCTACTCTGTGGAGCACGATGTGCCCA
GCACCAACTTCACTACCATCCCCACTCCTGGTGGTGGGCCGCGGTGAGCA
TCTCCACCGTGGGCTACGGAGACATGTACCCAGAGACCCACCTGGGCAGG
TTTTTTGCCTTCCTCTGCATTGCTTTTGGGATCATTCTCAACGGGATGCCCA
TTTCCATCCTCTACAACAAGTTTTCTGATTACTACAGCAAGCTGAAGGCTT
ATGAGTATAACCACCATACGCAGGGAGAGGGGAGAGGTGAACTTCATGCAG
AGAGCCAGAAAGAAGATAGCTGAGTGTTTGCTTGGAAGCAACCCACAGCT
CACCCCAAGACAAGAGAATTAG

SEQ ID NO:13 - cADN *CACNA2D4*, NM_172364.4

ATGGTCTGTGGCTGCTCTGCCCTCCTTCCCCTCCCCAACCCCAGGCCCACC
ATGCCTGCAACTCCCAACTTCCTCGCAAACCCCAGCTCCAGCAGCCGCTGG
ATTCCCCTCCAGCCAATGCCCCGTGGCCTGGGCCTTTGTGCAGAAGACCTCG
GCCCTCCTGTGGCTGCTGCTTCTAGGCACCTCCCTGTCCCCTGCGTGGGGA
CAGGCCAAGATTCTCTGGAAACAGTGAAGCTATGGGCTGACACCTTCGG
CGGGGACCTGTATAAACTGTGACCAAATACTCAGGCTCTCTCTTGCTGCA
GAAGAAGTACAAGGATGTGGAGTCCAGTCTGAAGATCGAGGAGGTGGATG
GCTTGAGCTGGTGAAGGAGTTCTCAGAGGACATGGAGAACATGCTGCGG
AGGAAAGTCGAGGCGGTCCAGAATCTGGTGAAGCTGCCGAGGAGGCCG
ACCTGAACCACGAATTCAATGAATCCCTGGTGTTCGACTATTACAACTCGG
TCCTGATCAACGAGAGGGACGAGAAGGGCAACTTCGTGGAGCTGGGCGCC
GAGTTCCTCCTGGAGTCCAATGCTCACTTCAGCAACCTGCCGGTGAACACC
TCCATCAGCAGCGTGCAGCTGCCACCAACGTGTACAACAAAGACCCAGA
TATTTTAAATGGAGTCTACATGTCTGAAGCCTTGAATGCTGTCTTCGTGGA
GAACTTCCAGAGAGACCCAACGTTGACCTGGCAATATTTTGGCAGTGCAA

CTGGATTCTTCAGGATCTATCCAGGTATAAAATGGACACCTGATGAGAATG
GAGTCATTACTTTTGACTGCCGAAACCGCGGCTGGTACATTCAAGCTGCTA
CTTCTCCCAAGGACATAGTGATTTTGGTGGACGTGAGCGGCAGTATGAAGG
GGCTGAGGATGACTATTGCCAAGCACACCATCACCACCATCTTGGACACCC
TGGGGGAGAATGACTTCATTAATATCATAGCGTACAATGACTACGTCCATT
ACATCGAGCCTTGTTTTAAAGGGATCCTCGTCCAGGCGGACCGAGACAATC
GAGAGCATTTCAAACCTGCTGGTGGAGGAGTTGATGGTCAAAGGTGTGGGG
GTCGTGGACCAAGCCCTGAGAGAAGCCTTCCAGATCCTGAAGCAGTTCCA
AGAGGCCAAGCAAGGAAGCCTCTGCAACCAGGCCATCATGCTCATCAGCG
ACGGCGCCGTGGAGGACTACGAGCCGGTGTTTGAGAAGTATAACTGGCCA
GACTGTAAGGTCCGAGTTTTCACTTACCTCATTGGGAGAGAAGTGTCTTTT
GCTGACCGCATGAAGTGGATTGCATGCAACAACAAAGGCTACTACACGCA
GATCTCAACGCTGGCGGACACCCAGGAGAACGTGATGGAATACCTGCACG
TGCTCAGCCGCCCCATGGTCATCAACCACGACCACGACATCATCTGGACAG
AGGCCTACATGGACAGCAAGCTCCTCAGCTCGCAGGCTCAGAGCCTGACA
CTGCTCACCCTGTGGCCATGCCAGTCTTCAGCAAGAAGAACGAAACGCG
ATCCCATGGCATTCTCCTGGGTGTGGTGGGCTCAGATGTGGCCCTGAGAGA
GCTGATGAAGCTGGCGCCCCGGTACAAGCTTGGAGTGCACGGATACGCCT
TTCTGAACACCAACAATGGCTACATCCTCTCCCATCCCGACCTCCGGCCCC
TGTACAGAGAGGGGAAGAACTAAAACCCAAACCTAACTACAACAGTGTG
GATCTCTCCGAAGTGGAGTGGGAAGACCAGGCTGAATCTCTGAGAACAGC
CATGATCAATAGGGAAACAGGTACTCTCTCGATGGATGTGAAGGTTCCGAT
GGATAAAGGGAAGCGAGTTCTTTTCTGACCAATGACTACTTCTTCACGGA
CATCAGCGACACCCCTTTCAGTTTGGGGGTGGTGTCTGTCCCGGGGCCACGG
AGAATACATCCTTCTGGGGAACACGTCTGTGGAAGAAGGCCTGCATGACTT
GCTTCACCCAGACCTGGCCCTGGCCGGTGACTGGATCTACTGCATCACAGA
TATTGACCCAGACACCAGGAAGCTCAGCCAGCTAGAGGCCATGATCCGCT
TCCTCACCAGGAAGGACCCAGACCTGGAGTGTGACGAGGAGCTGGTCCGG
GAGGTGCTGTTTGACGCGGTGGTGACAGCCCCCATGGAAGCCTACTGGAC
AGCGCTGGCCCTCAACATGTCCGAGGAGTCTGAACACGTGGTGGACATGG
CCTTCCTGGGCACCCGGGCTGGCCTCCTGAGAAGCAGCTTGTTTCGTGGGCT
CCGAGAAGGTCTCCGACAGGAAGTTCCTGACACCTGAGGACGAGGCCAGC

GTGTTACCCCTGGACCGCTTCCCGCTGTGGTACCGCCAGGCCTCAGAGCAT
CCTGCTGGCAGCTTCGTCTTCAACCTCCGCTGGGCAGAAGGACCAGAAAGT
GCGGGTGAACCCATGGTGGTGACGGCAAGCACAGCTGTGGCGGTGACCGT
GGACAAGAGGACAGCCATTGCTGCAGCCGCGGGCGTCCAAATGAAGCTGG
AATTCCTCCAGCGCAAATTCTGGGCGGCAACGCGGCAGTGCAGCACTGTG
GATGGGCCGTGCACACAGAGCTGCGAGGACAGTGATCTGGACTGCTTCGT
CATCGACAACAACGGGTTCATTCTGATCTCCAAGAGGTCCCGAGAGACGG
GAAGATTTCTGGGGGAGGTGGATGGTGCTGTCCTGACCCAGCTGCTCAGCA
TGGGGGTGTTTCAGCCAAGTGACTATGTATGACTATCAGGCCATGTGCAAAC
CCTCGAGTCACCACCACAGTGCAGCCCAGCCCCTGGTCAGCCCAATTTCTG
CCTTCTTGACGGCGACCAGGTGGCTGCTGCAGGAGCTGGTGCTGTTCTGCTG
TGGAGTGGAGTGTCTGGGGCTCCTGGTACGACAGAGGGGGCCGAGGCCAAA
AGTGTCTTCCATCACTCCCACAAACACAAGAAGCAGGACCCGCTGCAGCC
CTGCGACACGGAGTACCCCGTGTTTCGTGTACCAGCCGGCCATCCGGGAGG
CCAACGGGATCGTGGAGTGCGGGCCCTGCCAGAAGGTATTTGTGGTGCAG
CAGATTCCCAACAGTAACCTCCTCCTCCTGGTGACAGACCCACCTGTGAC
TGCAGCATCTTCCCACCAGTGCTGCAGGAGGCGACAGAAGTCAAATATAA
TGCCTCTGTCAAATGTGACCGGATGCGCTCCCAGAAGCTCCGCCGGCGACC
AGACTCCTGCCACGCCTTCCATCCAGAGGAGAATGCCCAGGACTGCGGGCG
GCGCCTCGGACACCTCAGCCTCGCCGCCCTACTCCTGCTGCCTGTGTGTG
CCTGGGGGCTACTGCCCAACTCCTGCGGTGA

SEQ ID NO:14 - cADN *CNGB3*, NM_019098.4

ATGTTTAAATCGCTGACAAAAGTCAACAAGGTGAAGCCTATAGGAGAGAA
CAATGAGAATGAACAAAGTTCTCGTCGGAATGAAGAAGGCTCTACCCAA
GTAATCAGTCTCAGCAAACCACAGCACAGGAAGAAAACAAAGGTGAAGA
GAAATCTCTCAAACCAAGTCAACTCCAGTCACGTCTGAAGAGCCACACA
CCAACATACAAGACAAACTCTCCAAGAAAAATTCCTCTGGAGATCTGACC
ACAAACCCTGACCCTCAAATGCAGCAGAACCAACTGGAACAGTGCCAGA
GCAGAAGGAAATGGACCCCGGGAAAGAAGGTCCAAACAGCCCACAAAAC
AAACCGCCTGCAGCTCCTGTTATAAATGAGTATGCCGATGCCCAGCTACAC
AACCTGGTGAAAAGAATGCGTCAAAGAACAGCCCTCTACAAGAAAAAGTT
GGTAGAGGGAGATCTCTCCTCACCCGAAGCCAGCCCACAAACTGCAAAGC

CCACGGCTGTACCACCAGTAAAAGAAAGCGATGATAAGCCAACAGAACAT
TACTACAGGCTGTTGTGGTTCAAAGTCAAAAAGATGCCTTTAACAGAGTAC
TTAAAGCGAATTAACTTCCAAACAGCATAGATTCATACACAGATCGACTC
TATCTCCTGTGGCTCTTGCTTGTCACCTTGCCTATAACTGGAAGTCTGGT
TTATACCACTGCGCCTCGTCTTCCCATATCAAACCGCAGACAACATACACT
ACTGGCTTATTGCGGACATCATATGTGATATCATCTACCTTTATGATATGCT
ATTTATCCAGCCCAGACTCCAGTTTGTAAGAGGAGGAGACATAATAGTGG
ATTCAAATGAGCTAAGGAAACACTACAGGACTTCTCCAAAATTTAGTTGG
ATGTCGCATCAATAATACCATTTGATATTTGCTACCTCTTCTTTGGGTTTAA
TCCAATGTTTAGAGCAAATAGGATGTTAAAGTACACTTCATTTTTTTGAATTT
AATCATCACCTAGAGTCTATAATGGACAAAGCATATATCTACAGAGTTATT
CGAACAACCTGGATACTTGCTGTTTATTCTGCACATTAATGCCTGTGTTTATT
ACTGGGCTTCAAACCTATGAAGGAATTGGCACTACTAGATGGGTGTATGATG
GGGAAGGAAACGAGTATCTGAGATGTTATTATTGGGCAGTTCGAACTTTAA
TTACCATTGGTGGCCTACCAGAACCACAACTTTATTTGAAATTGTTTTTCA
ACTCTTGAATTTTTTTTTCTGGAGTTTTTGTGTTCTCCAGTTTAATTGGTCAGA
TGAGAGATGTGATTGGAGCAGCTACAGCCAATCAGAACTACTTCCGCGCC
TGCATGGATGACACCATTGCCTACATGAACAATTACTCCATTCTAACTT
GTGCAAAAGCGAGTTCGGACTTGGTATGAATATACATGGGACTCTCAAAG
AATGCTAGATGAGTCTGATTTGCTTAAGACCCTACCAACTACGGTCCAGTT
AGCCCTCGCCATTGATGTGAACTTCAGCATCATCAGCAAAGTCGACTTGTT
CAAGGGTTGTGATACACAGATGATTTATGACATGTTGCTAAGATTGAAATC
CGTTCTCTATTTGCCTGGTGACTTTGTCTGCAAAAAGGGAGAAATTGGCAA
GGAAATGTATATCATCAAGCATGGAGAAGTCCAAGTTCTTGGAGGCCCTG
ATGGTACTAAAGTTCTGGTTACTCTGAAAGCTGGGTCTGGTGTGTTGGAGAAA
TCAGCCTTCTAGCAGCAGGAGGAGGAAACCGTCGAACTGCCAATGTGGTG
GCCACGGGTTTGCCAATCTTTTAACTCTAGACAAAAAGACCCTCCAAGAA
ATTCTAGTGCATTATCCAGATTCTGAAAGGATCCTCATGAAGAAAGCCAGA
GTGCTTTTAAAGCAGAAGGCTAAGACCGCAGAAGCAACCCCTCCAAGAAA
AGATCTTGCCCTCCTCTTCCCACCGAAAGAAGAGACACCCAACTGTTTAA
AACTCTCCTAGGAGGCACAGGAAAAGCAAGTCTTGCAAGACTACTCAAAT
TGAAGCGAGAGCAAGCAGCTCAGAAGAAAGAAAATTCTGAAGGAGGAGA

GGAAGAAGGAAAAGAAAATGAAGATAAACAAAAAGAAAATGAAGATAAA
 CAAAAAGAAAATGAAGATAAAGGAAAAGAAAATGAAGATAAAGATAAAG
 GAAGAGAGCCAGAAGAGAAGCCACTGGACAGACCTGAATGTACAGCAAG
 TCCTATTGCAGTGGAGGAAGAACCCCACTCAGTTAGAAGGACAGTTTTACC
 CAGAGGGACTTCTCGTCAATCACTCATTATCAGCATGGCTCCTTCTGCTGA
 GGGCGGAGAAGAGGTTCTTACTATTGAAGTCAAAGAAAAGGCTAAGCAAT
 AA

SEQ ID NO:15 - cấu trúc hG1.7(M8), mảnh LCR opsin 1,2 kb M/L, mảnh opsin
 500 bp M, UTR in nghiêng, đột biến M8 gạch chân

TAGGAATAGAAGGGTGGGTGCAGGAGGCTGAGGGGTGGGGAAAGGGCAT
 GGGTGTTCATGAGGACAGAGCTTCCGTTTCATGCAATGAAAAGAGTTTGG
 AGACGGATGGTGGTGA CTGGACTATACACTTACACACGGTAGCGATGGTA
 CACTTTGTATTATGTATATTTTACCACGATCTTTTAAAGTGTCAAAGGCAA
 ATGGCCAAATGGTTCCTTGTCTATAGCTGTAGCAGCCATCGGCTGTTAGT
 GACAAAGCCCCTGAGTCAAGATGACAGCAGCCCCATAACTCCTAATCGG
 CTCTCCCGCGTGGAGTCATTTAGGAGTAGTCGCATTAGAGACAAGTCCAAC
 ATCTAATCTTCCACCCTGGCCAGGGCCCCAGCTGGCAGCGAGGGTGGGAG
 ACTCCGGGCAGAGCAGAGGGCGCTGACATTGGGGCCCCGGCCTGGCTTGGG
 TCCCTCTGGCCTTTCCCCAGGGGCCCCTCTTTCCTTGGGGCTTTCTTGGGCCG
 CCACTGCTCCCGCTCCTCTCCCCCATCCCACCCCTCACCCCTCGTTCTT
 CATATCCTTCTCTAGTGCTCCCTCCACTTTCATCCACCCTTCTGCAAGAGTG
 TGGGACCACAAATGAGTTTTACCTGGCCTGGGGACACACGTGCCCCCAC
 AGGTGCTGAGTGACTTTCTAGGACAGTAATCTGCTTTAGGCTAAAATGGGA
 CTTGATCTTCTGTTAGCCCTAATCATCAATTAGCAGAGCCGGTGAAGGTGC
 AGAACCTACCGCCTTTCCAGGCCTCCTCCCACCTCTGCCACCTCCACTCTCC
 TTCCTGGGATGTGGGGGCTGGCACACGTGTGGCCCAGGGCATTGGTGGGA
 TTGCACTGAGCTGGGTCATTAGCGTAATCCTGGACAAGGGCAGACAGGGC
 GAGCGGAGGGCCAGCTCCGGGGCTCAGGCAAGGCTGGGGGCTTCCCCCAG
 ACACCCCACTCCTCCTCTGCTGGACCCCACTTCATAGGGCACTTCGTGTTC
 TCAAAGGGCTTCCAAATAGCATGGTGGCCTTGGATGCCCAGGGAAGCCTC
 AGAGTTGCTTATCTCCCTCTAGACAGAAGGGGAATCTCGGTCAAGAGGGA
 GAGGTCGCCCTGTTCAAGGCCACCCAGCCAGCTCATGGCGGTAATGGGAC

AAGGCTGGCCAGCCATCCCACCCTCAGAAGGGACCCGGTGGGGCAGGTGA
 TCTCAGAGGAGGCTCACTTCTGGGTCTCACATTCTTGGATCACAGGTATTT
 GCCACTAAGCCCAGCTAATTGTTTTTTATTTAGTAGAAACGGGGTTTCACC
 ATGTTAGTCAGGCTGGTCGGGAACCTCCTGACCTCAGGAGATCTACCCGCCT
 TGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGTGCCACTGTGCCCAGCCAC
 TTTTTTTTAGACAGAGTCTTGGTCTGTTGCCCAGGCTAGAGTTCAGTGGCGC
 CATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCCAGATTCAAGCGATTCTCCTGC
 CTCGACCTCCCAGTAGCTGGGATTACAGGTTTCCAGCAAATCCCTCTGAGC
 CGCCCCCGGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGGTGGGAGGAG
 GAGGTCTAAGTCCCAGGCCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTAGGATTTGG
 GAGCTTTTAAGGTGAAGAGGCCCGGGCTGATCCCCTGGCCGGTATAAAG
 CACCGTGACCCTCAGGTGACGCACCATCTAGAGCTGCCGTGCGGGACAGGG
CTTTCCATAGCC

SEQ ID NO:16 – Đột biến M8

TCTAGA

SEQ ID NO:17 – SEQ ID NO:2 2- mảnh gen khởi đầu opsin 2,0 kb M, mảnh 500 bp của SEQ ID NO:3 gạch chân, UTR in nghiêng, đột biến M8 gạch chân

TAAAAAGCAAGTCTTGCCAGGGCAGTGGTGTGCACCTGTGGTCCCAGCTA
 CTCAGGATGCTGAGGCAGGAGGATTACTTGTGCCCAGCAAGTAGAGGCTG
 CAGTGACCTGTGACTGTGCTACTGCCCTCCAACCTGGGTGACAGAGTGAGA
 CCTTGTCTCAAAAAAAAAAAGAGCGGGGGGGGGGGGGCCGGGCCGGGCGTG
 GTGGCTCACAGCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAAGCCAAGGCGGGTGGAT
 CACTTGAGGTCAGGAGTTTGAGACCATCATGGTCAACACTGCGAAACACT
 GTCCCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCGGGCATGGTGGCACACACCTGT
 AATCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAGCCGGGGA
 GACGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGACTGCGCCACTGCACTCCAGCCTGACT
 GACAAGAGTGAGATTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTAATCACTAGAAA
 AGAAGCTACATATGTACATAACATCCAAATAACCAAGAGGAGAAAAAAT
 GGGACTTGATTAATCAAAACAAAAACAAAAAAGAAAGAAAGAAAGGGGG
 AGAAAATAAAACAAGGGCTGGGTGTGCTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGC
 ACTTTGGAAGCCAAGGTGGGTGGATCTCTTGAGCTCAGGAGGTCAAGACC

AGCCTGGGCAACATGGCGAAACCCCGTCTCTATTAAAAAAAAAAATTAATA
 CAACAATTATCCTGGAGTGGTGGTGCACACCTGTAGTCCCAGCTACCCAGG
 ACGCTGAGACGGGAGGATCGCTTGATCCCGGGGATGTCGAGGCTGCCGTG
 ATCGCACCACTGCCCTCCAGCCAGGGTGGCAGACTGAGACCCCATCTCAA
 AAAATAAATAAATAAAAGCAAACAAGAAAAAAAAAAGGCTTGAAACATAT
 CTGATAGATAAAGGGCTAATCAACACAATATATAAAGAACTGCAAATCAG
 TAAACTAAGAGCAAATAACCCAATATAAAGACATTAAAGGGTAGCCACGG
 ACATCTCAGACGACGAAAAACAAAAGACAGTAAACGTATAATAAACATG
 TAATTGCAAGGTGATCCGGGAATAGTAAGCGAAAAGCAACAATTAAATAC
 TATTTTCTCATCCACCAGAACGCCAAAAATTAAAAAGCCTAACAATGTCCA
 GGGCTGGCGAGAATGTGGCAGAAGGTGATGTCACATACCCTGCAAGTGGG
 AATCTAAACAGATTTCAGGGTTTTGGTTTTTTTTTAATCGCAATTAGGTGGCC
 TGTAAATTTTTTTTTCTTGAGACAGAGTTTTGCTCTTGTTGCCCAGGCTGGA
 GTGCAATGGCTCGATCTTGGCTCACCGCAACCTCGACCTCCCAGGTACAAG
 CGATTCTCCTGTCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGAGTACAGGTATTTGCCA
CTAAGCCCAGCTAATTGTTTTTTATTTAGTAGAAACGGGGTTTCACCATGTT
AGTCAGGCTGGTCGGGAACCTGACCTCAGGAGATCTACCCGCCTTGGCC
TCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGTGCCACTGTGCCCAGCCACTTTTT
TTTAGACAGAGTCTTGGTCTGTTGCCCAGGCTAGAGTTCAGTGGCGCCATC
TCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCCAGATTCAAGCGATTCTCCTGCCTCG
ACCTCCCAGTAGCTGGGATTACAGGTTTCCAGCAAATCCCTCTGAGCCGCC
CCCGGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGGGGTGGGAGGAGGAGG
TCTAAGTCCCAGGCCCAATTAAGAGATCAGATGGTGTAGGATTTGGGAGCT
TTTAAGGTGAAGAGGCCCGGGCTGATCCCACTGGCCGGTATAAAGCACCG
TGACCCTCAGGTGACGCACCATCTAGAGCTGCCGTCGGGGACAGGGCTTCC
ATAGCC

Yêu cầu bảo hộ

1. Đơn vị kiểm soát phiên mã (TCU) dài lên đến 2500 nucleotit chứa theo hướng 5' đến 3':

(a) vùng kiểm soát quỹ tích (LCR) chứa

(i) SEQ ID NO 1; hoặc

(ii) trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự (a)(i) này; và

(b) thành phần gen khởi đầu chứa

(i) ít nhất 200 nucleotit cuối của SEQ ID NO: 17; hoặc

(ii) trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự (b)(i) này và chứa SEQ ID NO: 16;

TCU này biểu hiện hoạt động gen khởi đầu đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón.

2. TCU theo điểm 1, trong đó (b) chứa:

(i) ít nhất 500 nucleotit cuối của SEQ ID NO: 17, hoặc

(ii) trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự (i) này và chứa SEQ ID NO: 16;

TCU này biểu hiện hoạt động gen khởi đầu đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón.

3. TCU theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó (b) chứa ít nhất 200 nucleotit của SEQ ID NO: 3.

4. TCU theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó (b) chứa trình tự của ít nhất 10 nucleotit liên tiếp được chọn từ nucleotit 1 đến 35 của SEQ ID NO:3, hoặc trình tự chứa ít nhất 10 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với nucleotit 1 đến 35 của SEQ ID NO:3.

5. TCU theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó (b) chứa:

(i) SEQ ID NO: 3; hoặc

(ii) trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự (i) này;

TCU này biểu hiện hoạt động gen khởi đầu đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón.

6. TCU theo điểm 5, trong đó TCU chứa SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO:15.

7. TCU theo điểm 5, trong đó TCU chứa trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với SEQ ID NO:15.
8. TCU theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó thành phần gen khởi đầu chứa SEQ ID NO: 5.
9. TCU theo điểm 8, trong đó TCU chứa SEQ ID NO: 6.
10. TCU theo điểm 1, trong đó TCU chứa:
 - (a) LCR chứa SEQ ID NO: 1; và
 - (b) thành phần gen khởi đầu chứa SEQ ID NO: 3.
11. Cấu trúc biểu hiện chứa TCU theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, được liên kết có điều khiển với trình tự cần được biểu hiện theo cách đặc hiệu tế bào nhận sáng hình nón.
12. Cấu trúc biểu hiện theo điểm 11, trong đó trình tự được liên kết có điều khiển là *CNGA3*, *CNGB3*, *PDE6C*, *PDE6H*, *GNAT2*, *KCNV2* hoặc *CACNA2D4*.
13. Cấu trúc biểu hiện theo điểm 12, trong đó trình tự được liên kết có điều khiển chứa SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc 14, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hoặc 14 và có khả năng cứu chức năng tế bào nhận sáng hình nón.
14. Cấu trúc biểu hiện theo điểm 12 hoặc 13, trong đó trình tự được liên kết có điều khiển có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO: 8, hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất 95% với SEQ ID NO: 8, và có khả năng cứu chức năng tế bào nhận sáng hình nón.
15. Cấu trúc biểu hiện theo điểm 14, trong đó trình tự được liên kết có điều khiển chứa SEQ ID NO: 8, và có khả năng cứu chức năng tế bào nhận sáng hình nón.
16. Vector chứa TCU theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 hoặc cấu trúc biểu hiện theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 15.
17. Vector theo điểm 16, trong đó vector này là vector virus.
18. Vector theo điểm 17, trong đó vector này là vector virus liên hợp adeno (AAV).
19. Vector theo điểm 18, trong đó vector chứa hệ gen AAV hoặc dẫn xuất của nó.

20. Vectơ theo điểm 19, trong đó vectơ chứa hệ gen AAV hoặc dẫn xuất của nó, và trong đó capsit AAV có nguồn gốc từ AAV8.
21. Vectơ theo điểm 20, trong đó capsit AAV có nguồn gốc từ AAV8 và cấu trúc biểu hiện được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 15.
22. Vectơ theo điểm 21, trong đó trình tự được liên kết có điều khiển là *CNGA3*.
23. Vectơ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 19 đến 22, trong đó dẫn xuất này là dẫn xuất khảm, được bố trí lại hoặc được cải biến capsit.
24. Vectơ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 19 đến 23, trong đó hệ gen AAV này là từ kiểu huyết thanh có nguồn gốc tự nhiên hoặc thể phân lập hoặc nhánh của AAV.
25. Vectơ theo điểm 24, trong đó hệ gen AAV này là từ kiểu huyết thanh AAV 2 (AAV2), kiểu huyết thanh AAV 4 (AAV4), hoặc kiểu huyết thanh AAV 8 (AAV8) và/hoặc trong đó capsit có nguồn gốc từ AAV8.
26. Vectơ theo điểm 25, trong đó hệ gen có nguồn gốc từ AAV2 và capsit có nguồn gốc từ AAV8.
27. Tế bào chủ chứa vectơ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 26 hoặc sản xuất vectơ virus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 26.
28. Tế bào theo điểm 27, trong đó tế bào này là tế bào HEK293 hoặc HEK293T.
29. Dược phẩm chứa vectơ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 26 và chất mang được dụng.

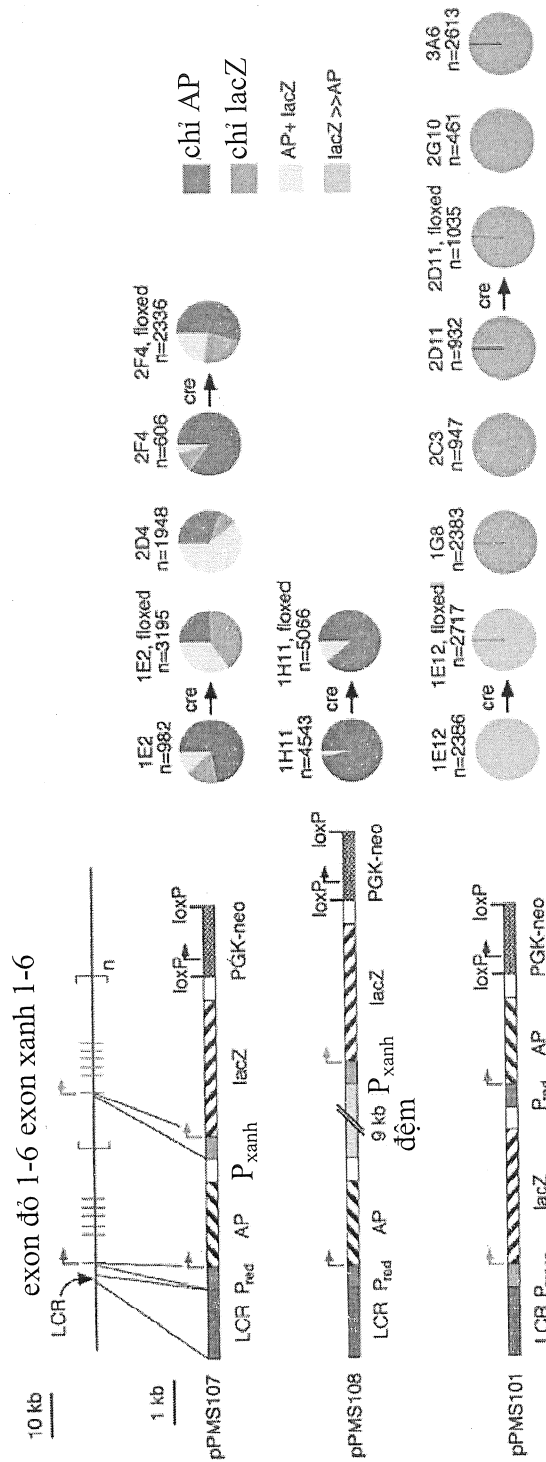
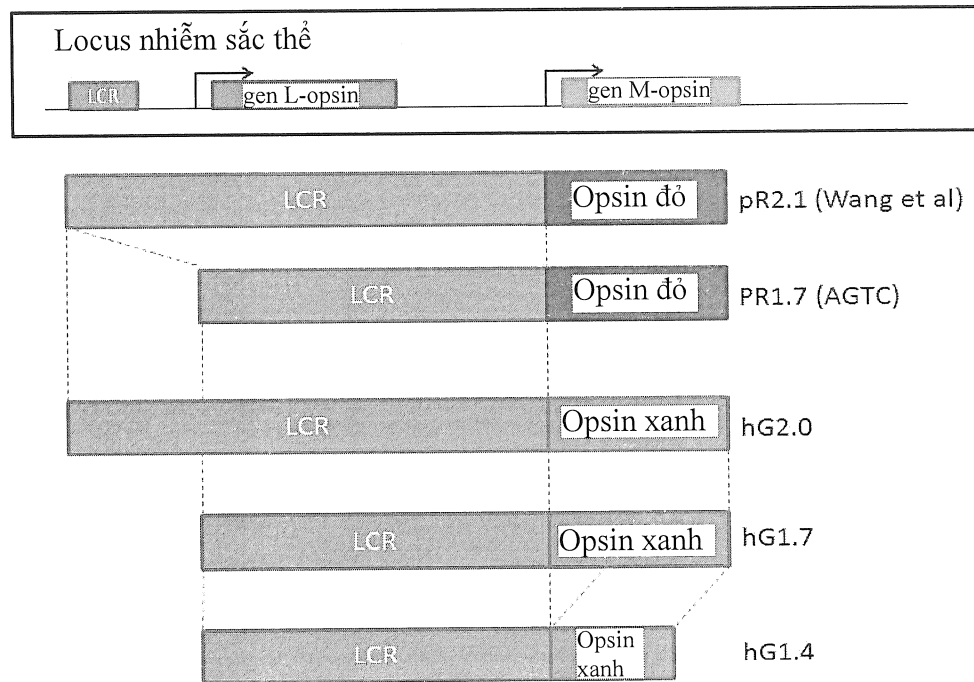


Fig. 1



_Fig. 2

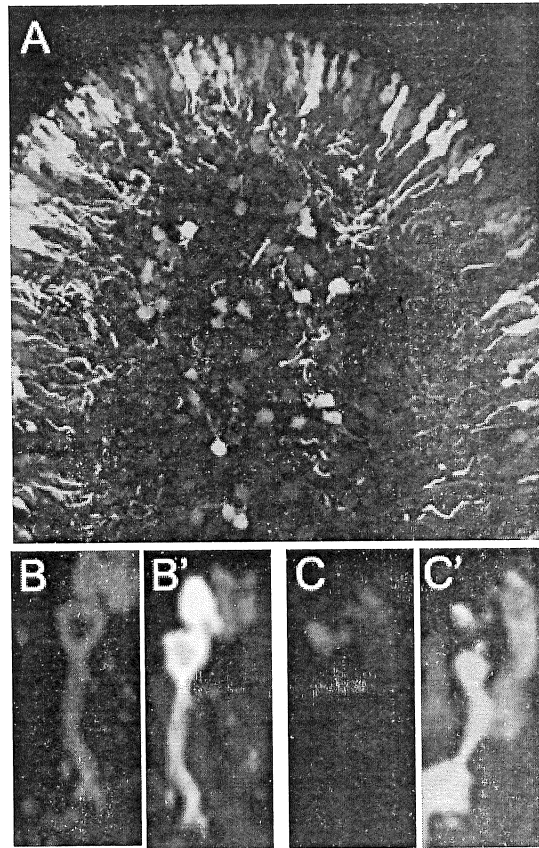


Fig. 3

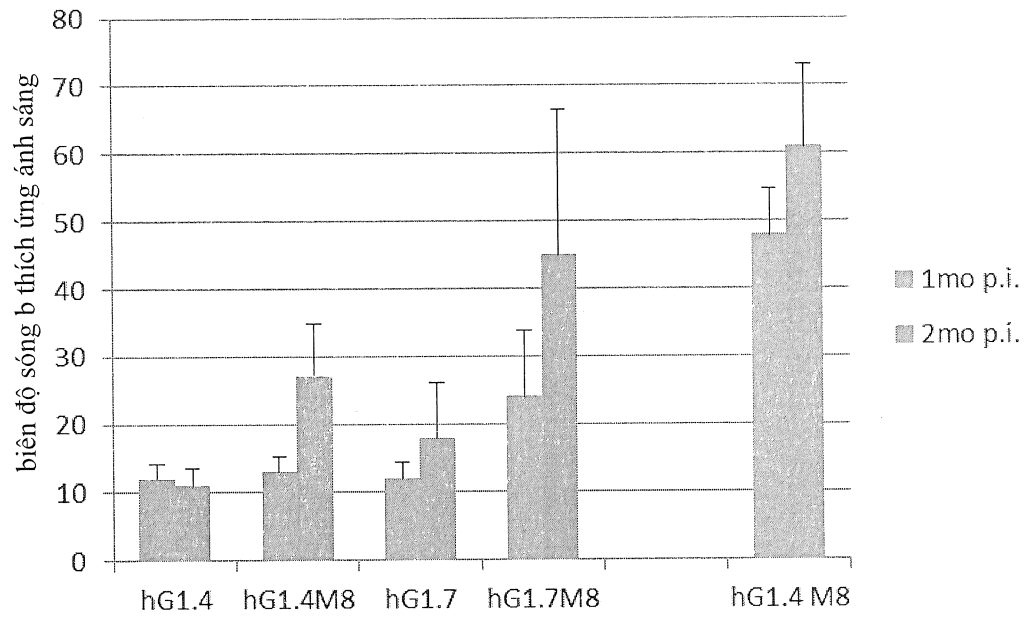


Fig. 4

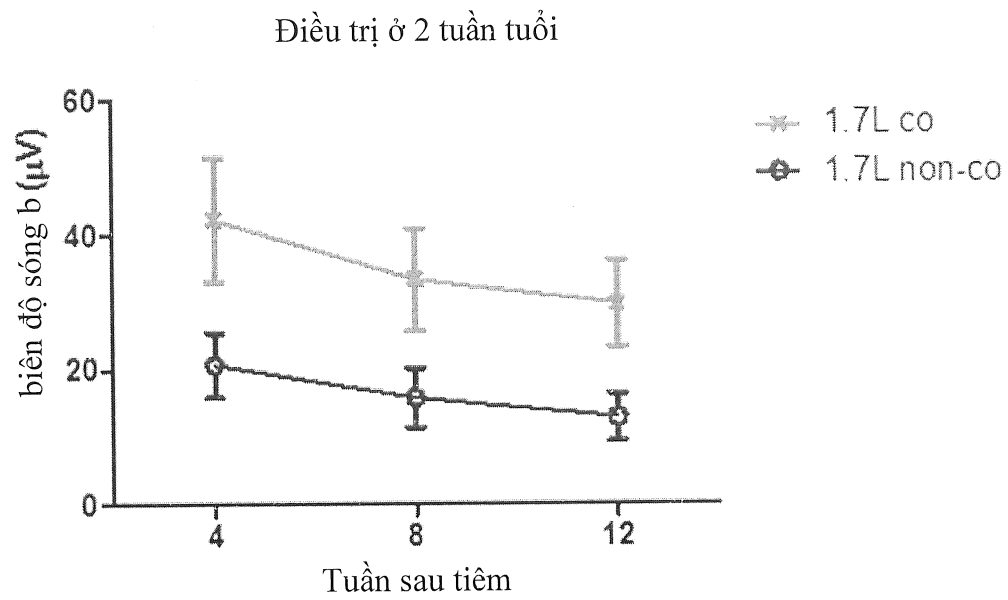


Fig. 5

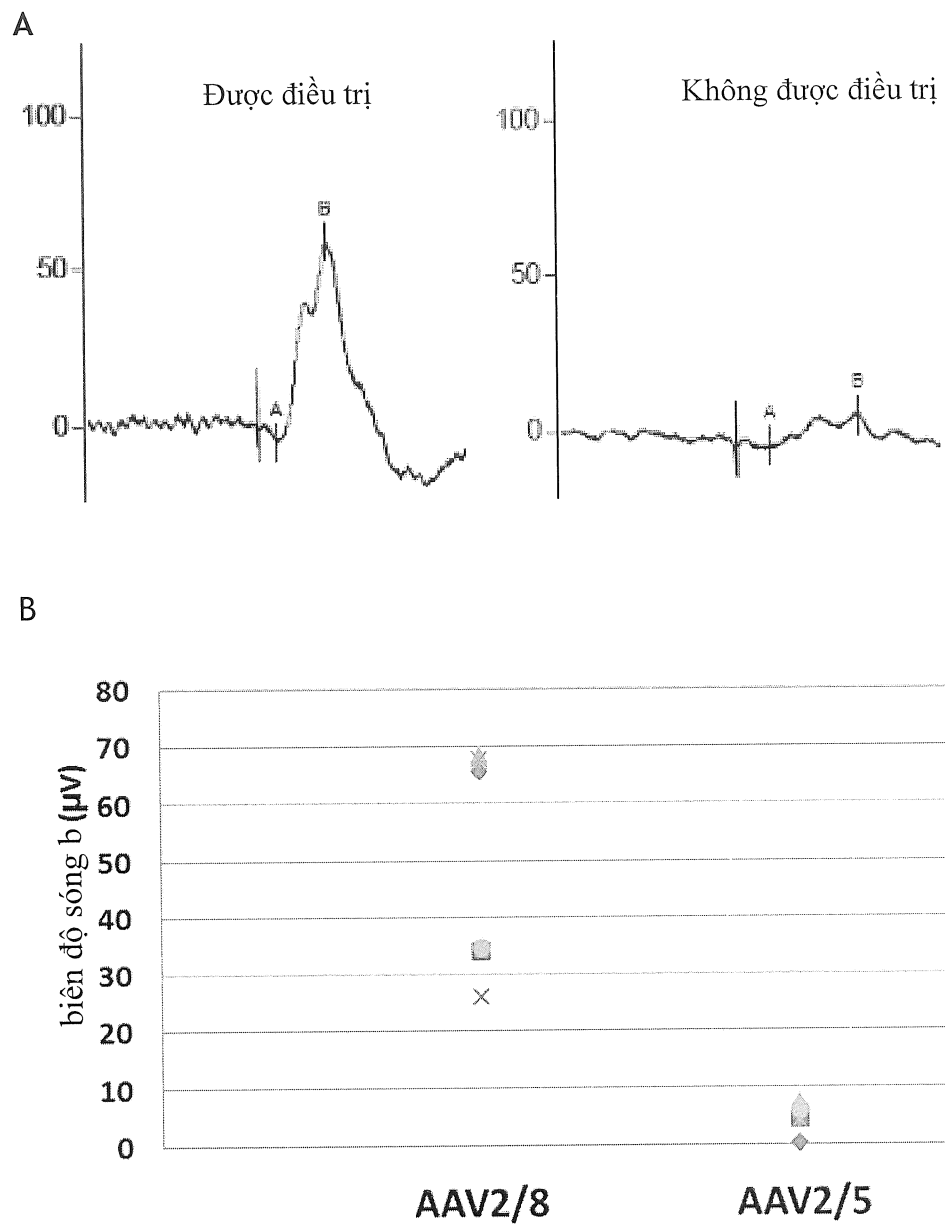


Fig. 6

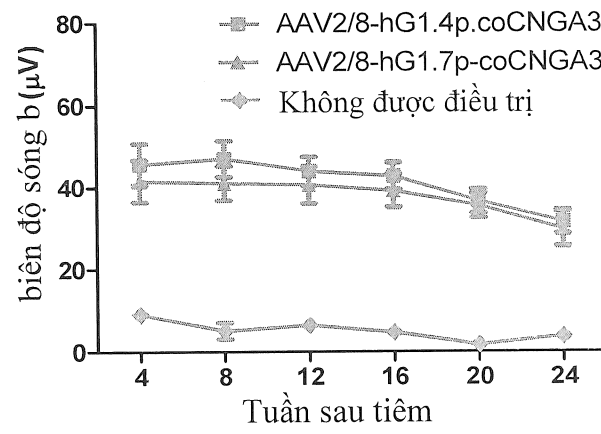


Fig. 7

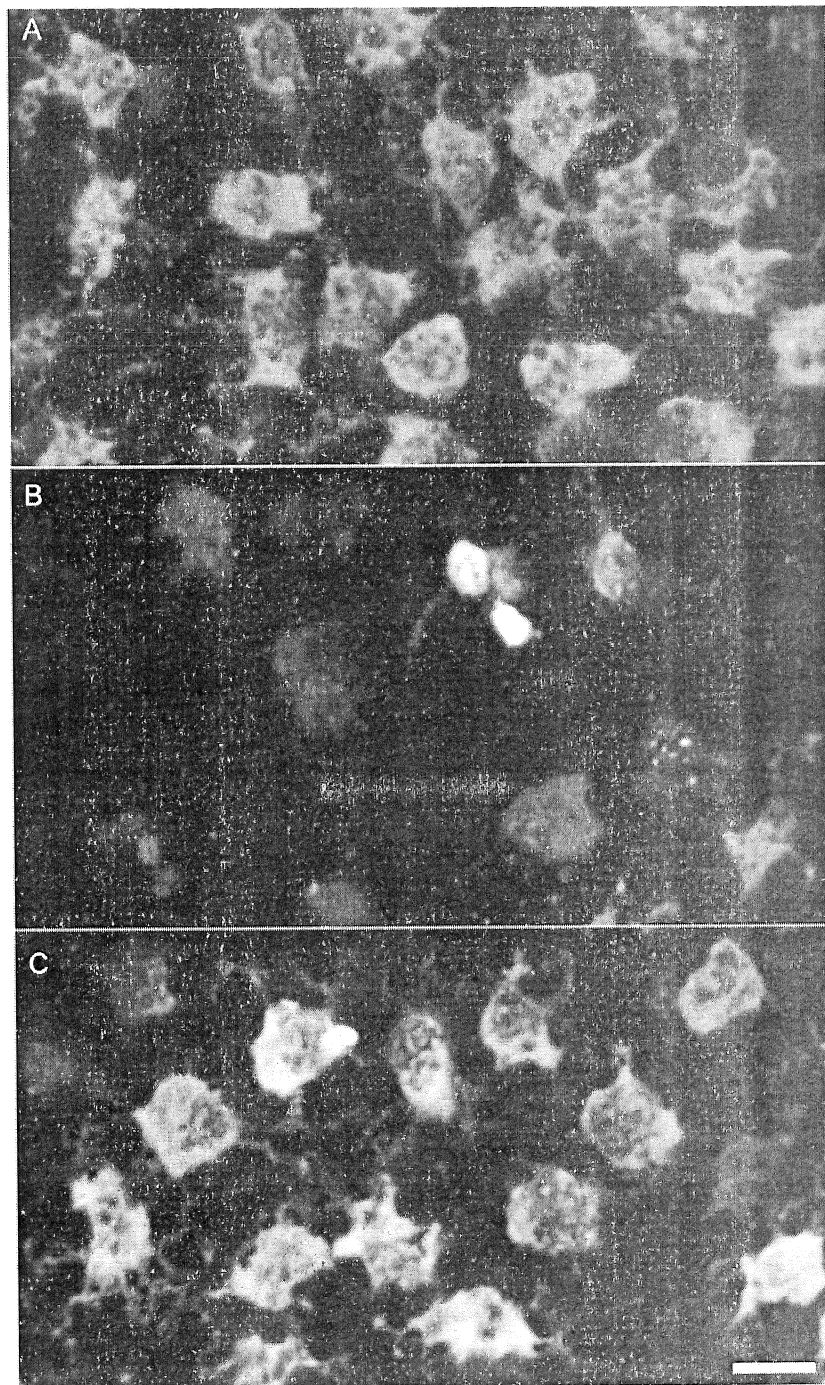


Fig. 8

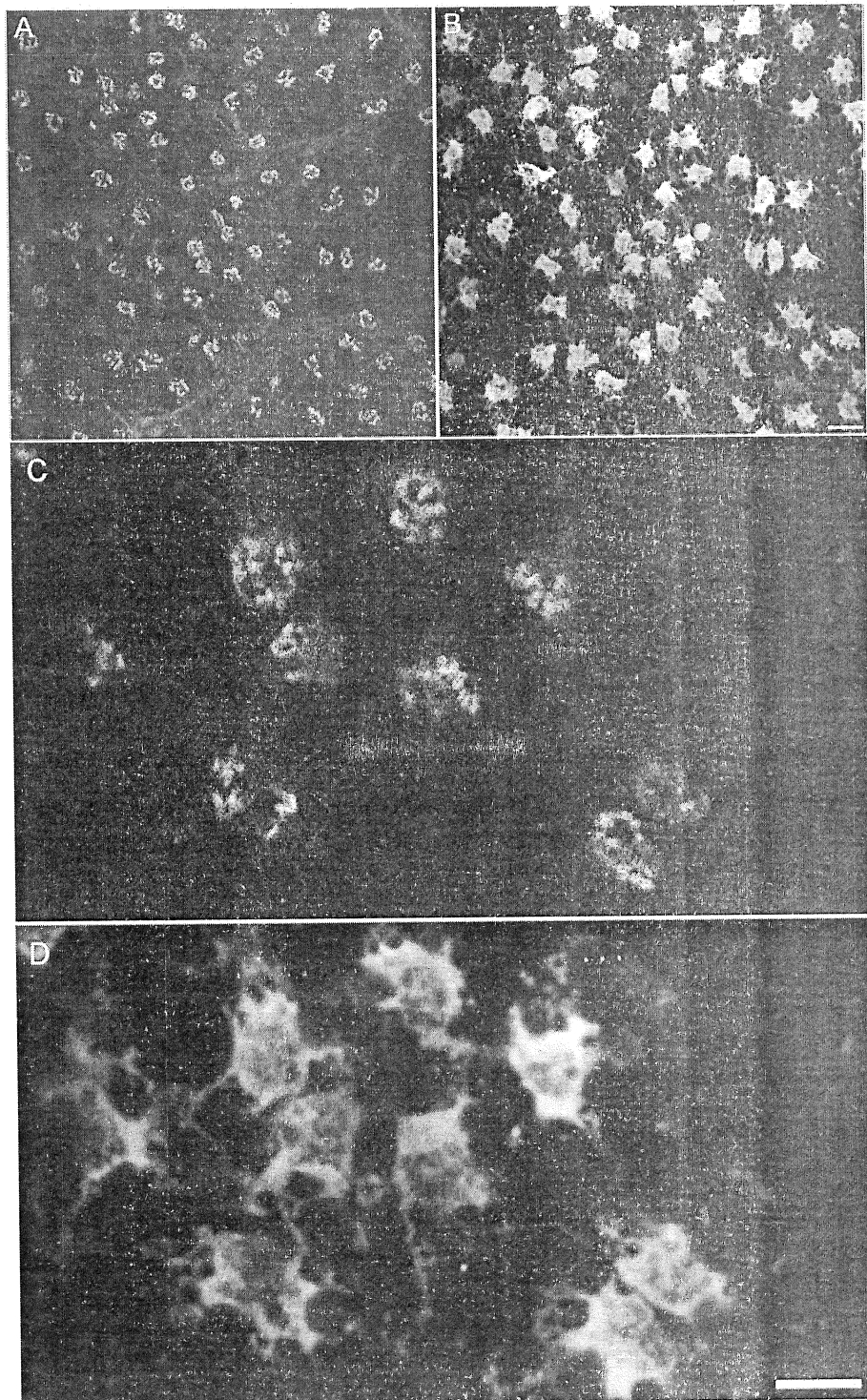


Fig. 9

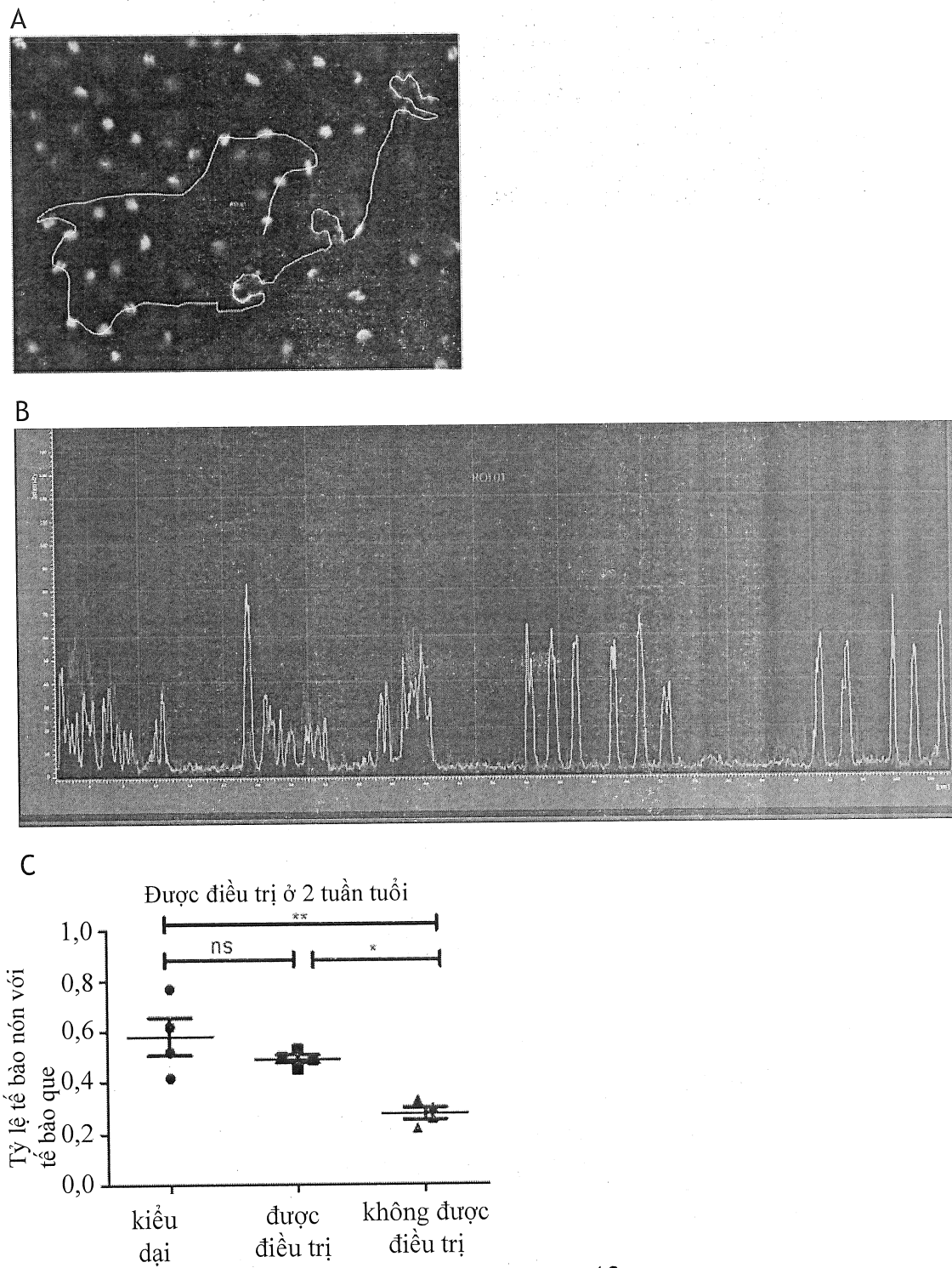
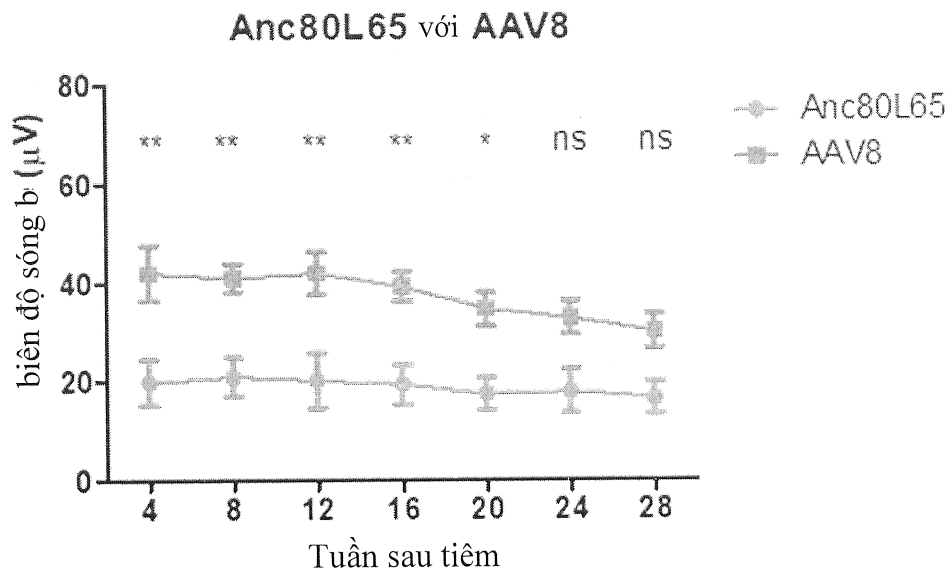


Fig. 10

A



B

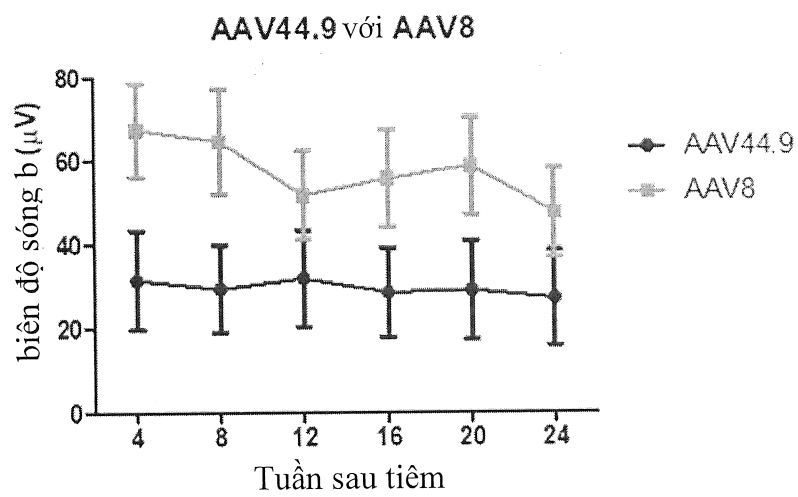


Fig. 11

C

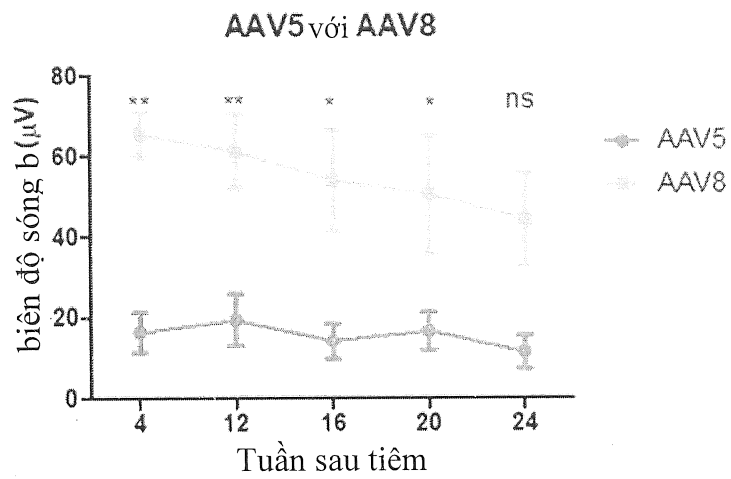
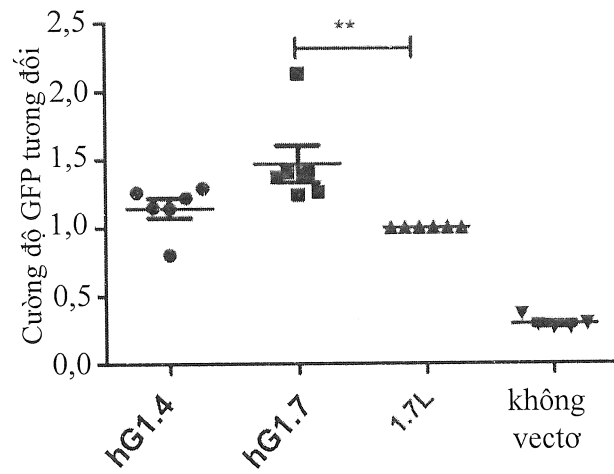


Fig. 11 (tiếp)

A

Cường độ huỳnh quang trung bình của tế bào dương GFP



B

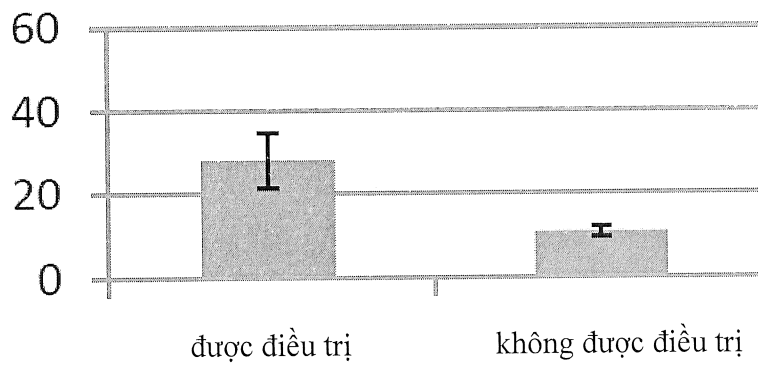


Fig. 12

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> UCL BUSINESS PLC.

<120> ĐƠN VỊ KIỂM SOÁT PHIÊN MÃ (TCU), VECTO CHỨA NÓ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA VECTO NÀY

<130> N409521WO

<150> GB 1800546.2

<151> 2018-01-12

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1253

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mảnh 1,2 kb của vùng kiểm soát quỹ tích (LCR) M/L opsin

<400> 1

taggaataga aggggtgggtg caggaggctg aggggtgggg aaagggcatg ggtgtttcat
60

gaggacagag cttccgtttc atgcaatgaa aagagtgttg agacggatgg tggtagactgg
120

actatacact tacacacggt agcgatggta cactttgtat tatgtatatt ttaccacgat
180

cttttttaaag tgtcaaaggc aaatggccaa atgggttcctt gtcctatagc tgtagcagcc
240

atcggctggt agtgacaaag cccctgagtc aagatgacag cagccccat aactccta
300

cggctctccc gcgtggagtc atttaggagt agtcgcatta gagacaagtc caacatctaa
360

tcttccaccc tggccagggc cccagctggc agcgagggtg ggagactccg ggcagagcag
420

agggcgctga cattggggcc cggcctggct tgggtccctc tggcctttcc ccagggggcc
480

tctttccttg gggctttctt gggccgccac tgctcccgct cctctcccc catccaccc
540

cctcaccccc tcgttcttca tctccttctc tagtgctccc tccactttca tccacccttc
600

tgcaagagtg tgggaccaca aatgagtttt cacctggcct ggggacacac gtgccccac
660

aggtgctgag tgacttttcta ggacagtaat ctgcttttagg ctaaaatggg acttgatctt
720

ctgttagccc taatcatcaa ttagcagagc cgggtgaaggt gcagaaccta ccgcctttcc
780

aggcctcttc ccacctctgc cacctccact ctccttcctg ggatgtgggg gctggcacac
840

gtgtggccca gggcattggt gggattgcac tgagctgggt cattagcgta atcctggaca
900

agggcagaca gggcgagcgg agggccagct ccggggctca ggcaaggctg ggggcttccc
960

ccagacaccc cactcctcct ctgctggacc cccacttcat agggcacttc gtgttctcaa
1020

agggcttcca aatagcatgg tggccttgga tgcccagga agcctcagag ttgcttatct
1080

ccctctagac agaaggggaa tctcgggtcaa gagggagagg tcgccctgtt caaggccacc
1140

cagccagctc atggcggtaa tgggacaagg ctggccagcc atcccaccct cagaaggagc
1200

ccggtggggc aggtgatctc agaggaggct cacttctggg tctcacattc ttg
1253

<210> 2
<211> 1970
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mảnh gen khởi động 2,0 kb M opsin, không có trình tự M8

<400> 2
taaaaagcaa gtcttgccag ggcagtgggtg tgcacctgtg gtcccagcta ctgaggatgc
60

tgaggcagga ggattacttg tgcccagcaa gtagaggctg cagtgcacctg tgactgtgct
120

actgccctcc aacctgggtg acagagtgag accttgtctc aaaaaaaaaa gagcggggggg
180

ggggggccgg gccgggctg gtggctcaca gctgtaatcc cagcactttg ggaagccaag
240

gcgggtggat cacttgaggt caggagtttg agaccatcat ggtcaacact gcgaaacact
300

gtccctacta aaaatacaaa aattagccgg gcatggtggc acacacctgt aatcccagct
360

actggggagg ctgaggcagg agaattgctt gagccgggga gacggagggtt gcagtgagcc
420

gagactgcgc cactgcactc cagcctgact gacaagagtg agattgtctc aaaaaaaaaa
480

aaaaagtaat cactagaaaa gaagctacat atgtacataa catccaaata accaagagga
540

gaaaaaaaaatg ggacttgatt aatcaaaaaca aaaacaaaaa agaaagaaag aaagggggag
600

aaaataaaac aagggtctggg tgtgctgggt catgcctgta atcccagcac tttggaagcc
660

aaggtgggtg gatctcttga gctcaggagg tcaagaccag cctgggcaac atggcgaaac
720

cccgctctcta ttaaaaaaaaa aattaatata acaattatcc tggagtgggtg gtgcacacct
780

gtagtcccag ctaccagga cgctgagacg ggaggatcgc ttgatcccgg ggatgtcgag
840

gctgccgtga tcgcaccact gccctccagc cagggtggca gactgagacc ccatctcaaa
900

aaataaataa ataaaagcaa acaagaaaaa aaaaggcttg aaacatatct gatagataaa
960

gggctaatac acacaatata taaagaactg caaatcagta aactaagagc aaataacca
1020

atataaagac attaaagggt agccacggac atctcagacg acgaaaaaca aaagacagta
1080

aacgtataat aaaacatgta attgcaagggt gatccgggaa tagtaagcga aaagcaacaa
1140

ttaaatacta ttttctcatc caccagaacg ccaaaaatta aaaagcctaa caatgtccag
1200

ggctggcgag aatgtggcag aaggatgatgt cacataccct gcaagtggga atctaaacag
1260

attcagggtt ttggtttttt tttaatcgca attaggtggc ctgttaaatt tttttcttg
1320

agacagagtt ttgctcttgt tgcccaggct ggagtgcaat ggctcgatct tggctcaccg
1380

caacctcgac ctcccaggta caagcgattc tcctgtctca gcctcccaag tagctgggag
1440

tacaggtatt tgccactaag cccagctaatt tgttttttat ttagtagaaa cggggtttca
1500

ccatgttagt caggctgggc gggaactcct gacctcagga gatctaccgc ccttggcctc
1560

ccaaagtgcg gggattacag gcgtgtgccg ctgtgccag ccactttttt ttagacagag
1620

tcttggctcg ttgccaggc tagagttcag tggcgccatc tcagctcact gcaacctccg
1680

cctcccagat tcaagcgatt ctctgcctc gacctcccag tagctgggat tacaggtttc
1740

cagcaaattc ctctgagccg cccccggggg ctgcctcag gagcaaggaa gcaaggggtg
1800

ggaggaggag gtctaagtcc caggcccaat taagagatca gatggtgtag gatttgggag
1860

cttttaaggt gaagaggccc gggctgatcc cactggccgg tataaagcac cgtgacctc
1920

aggtgacgca ccagggccg ctgccgtcgg ggacagggct ttccatagcc
1970

<210> 3
<211> 529
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mảnh 500 bp M opsin, có đột biến M8

<400> 3
acaggtatct gccactaagc ccagctaatt gttttttatt tagtagaaac ggggtttcac
60

catgttagtc aggctggctg ggaactcctg acctcaggag atctaccgc cttggcctcc
120

caaagtgcg ggtattacag cgtgtgccac tgtgccagc cacttttttt tagacagagt
180

cttggctctg tgcccaggct agagttcagt ggcgcatct cagctcactg caacctccgc
240

ctcccagatt caagcgattc tcctgcctcg acctcccagt agctgggatt acaggtttcc
300

agcaaattcc tctgagccgc cccccggggg tcgcctcagg agcaaggaag caaggggtgg
360

gaggaggagg tctaagtccc aggcccaatt aagagatcag atggtgtagg atttgggagc
420

ttttaaggtg aagaggcccg ggctgatccc actggccggt ataaagcacc gtgacctca
480

ggtgacgcac catctagagc tgccgtcggg gacagggctt tccatagcc
529

<210> 4
<211> 1782
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> biến thể của cấu trúc hG1.7, mảnh LCR 1,2 kb M/L opsin, mảnh 500 bp M opsin, có đột biến M8

<400> 4
taggaataga aggggtgggtg caggaggctg aggggtgggg aaagggcatg ggtgtttcat
60

gaggacagag cttccgtttc atgcaatgaa aagagtttgg agacggatgg tggtagctgg
120

actatacact tacacacggg agcgatggta cactttgtat tatgtatatt ttaccacgat
180

cttttttaaag tgtcaaaggc aaatggccaa atgggttcctt gtcctatagc tgtagcagcc
240

atcggctggt agtgacaaag cccctgagtc aagatgacag cagccccat aactcctaatt
300

cggctctccc gcgtaggagtc atttaggagt agtcgcatta gagacaagtc caacatctaa
360

tcttccaccc tggccagggc cccagctggc agcgaggggtg ggagactccg ggcagagcag
420

agggcgctga cattgggggc cggcctggct tgggtccctc tggcctttcc ccaggggccc
480

tctttccttg gggctttctt gggccgccac tgctcccgtt cctctcccc catcccaccc
540

cctcaccccc tcgttcttca tctccttctc tagtgctccc tccactttca tccacccttc
600

tgcaagagtg tgggaccaca aatgagtttt cacctggcct ggggacacac gtgccccac
660

aggtgctgag tgactttcta ggacagtaat ctgctttagg ctaaaatggg acttgatctt
720

ctgttagccc taatcatcaa ttagcagagc cgggtgaagg gcagaacctt ccgcctttcc
780

aggctcctc ccacctctgc cacctccact ctcttctctg ggatgtgggg gctggcacac
840

gtgtggccca gggcattggg gggattgcac tgagctgggt cattagcgta atcctggaca
900

agggcagaca gggcgagcgg agggccagct cgggggctca ggcaaggctg ggggcttccc
960

ccagacaccc cactcctcct ctgctggacc cccacttcat agggcacttc gtgttctcaa
1020

agggcttcca aatagcatgg tggccttgga tgcccaggga agcctcagag ttgcttatct
1080

ccctctagac agaaggggaa tctcgggtcaa gagggagagg tcgccctggt caaggccacc
1140

cagccagctc atggcggtaa tgggacaagg ctggccagcc atcccaccct cagaagggac
1200

ccggtggggc aggtgatctc agaggaggct cacttctggg tctcacattc ttgacaggta
1260

tttgccacta agcccagcta attgtttttt atttagtaga aacgggggtt caccatgtta
1320

gtcaggctgg tcgggaactc ctgacctcag gagatctacc cgccttggcc tcccaaagtg
1380

ctgggattac aggcgtgtgc cactgtgccc agccactttt ttttagacag agtcttggtc
1440

tgttgccag gctagagttc agtggcgcca tctcagctca ctgcaacctc cgcctcccag
1500

attcaagcga ttctcctgcc tcgacctccc agtagctggg attacagggt tccagcaaatt
1560

ccctctgagc cgccccggg ggctcgctc aggagcaagg aagcaagggg tgggaggagg
1620

aggtctaagt cccaggccca attaagagat cagatggtgt aggatttggg agcttttaag
1680

gtgaagaggc ccgggctgat cccactggcc ggtataaagc accgtgacct tcaggtgacg
1740

caccatctag agctgccgtc ggggacaggg ctttccatag cc
1782

<210> 5

<211> 247

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mảnh 200 bp M opsin, có đột biến M8

<400> 5

gatcgattac aggtttccag caaatccctc tgagccgccc ccgggggctc gcctcaggag
60

caaggaagca aggggtggga ggaggaggtc taagtcccag gcccaattaa gagatcagat
120

ggtgtaggat ttgggagctt ttaaggtgaa gaggcccggg ctgatcccac tggccggtat
180

aaagcacctg gaccctcagg tgacgcacca tctagagctg ccgtcgggga cagggttttc
240

catagcc
247

<210> 6
<211> 1500
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> cấu trúc hG1.4: mảnh LCR 1,2 kb M/L opsin, mảnh 200bp M opsin,
có đột biến M8

<400> 6
taggaataga aggggtgggtg caggaggctg aggggtgggg aaagggcatg ggtgtttcat
60

gaggacagag cttccgtttc atgcaatgaa aagagtttgg agacggatgg tggtgactgg
120

actatacact tacacacggt agcgatggtg cactttgtat tatgtatatt ttaccacgat
180

cttttttaaag tgtcaaaggc aaatggccaa atgggttcctt gtcctatagc tgtagcagcc
240

atcggctggt agtgacaaag cccctgagtc aagatgacag cagcccccat aactccta
300

cggctctccc gcgtggagtc atttaggagt agtcgcatta gagacaagtc caacatctaa
360

tcttccaccc tggccagggc cccagctggc agcgaggggtg ggagactccg ggcagagcag
420

agggcgctga cattggggcc cggcctgggt tgggtccctc tggcctttcc ccagggggccc
480

tctttccttg gggctttctt gggccgccac tgctcccgct cctctcccc catccacccc
540

cctcaccccc tegtcttca tctccttctc tagtgctccc tccactttca tccacccttc
600

tgcaagagtg tgggaccaca aatgagtttt cacctggcct ggggacacac gtgccccac
660

aggtgctgag tgactttcta ggacagtaat ctgctttagg ctaaaatggg acttgatctt
720

ctgttagccc taatcatcaa ttagcagagc cggatgaagg gcagaacctt cgcctttcc
780

aggcctcctc ccacctctgc cacctccact ctccttctg ggatgtggg gctggcacac
840

gtgtggccca gggcattggt gggattgcac tgagctgggt cattagcgta atcctggaca
900

agggcagaca gggcgagcgg agggccagct ccggggctca ggcaaggctg ggggcttccc
960

ccagacacct cactcctcct ctgctggacc ccacttcat agggcacttc gtgttctcaa
1020

agggcttcca aatagcatgg tggccttgga tgcccaggga agcctcagag ttgcttatct
1080

ccctctagac agaaggggaa tctcgggtcaa gagggagagg tcgccctgtt caaggccacc
1140

cagccagctc atggcggtaa tgggacaagg ctggccagcc atcccaccct cagaagggac
1200

ccggtggggc aggtgatctc agaggaggct cacttctggg tctcacattc ttggatcgat
1260

tacaggtttc cagcaaattc ctctgagccg cccccggggg ctgcctcag gagcaaggaa
1320

gcaaggggtg ggaggaggag gtctaagtcc caggcccaat taagagatca gatggtgtag
1380

gatttgggag cttttaagggt gaagaggccc gggctgatcc cactggccgg tataaagcac
1440

cgtgaccctc aggtgacgca ccacttagag ctgccgtcgg ggacagggct ttccatagcc
1500

<210> 7

<211> 2085

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CNGA3 cADN tối ưu hóa không codon

<400> 7

atggccaaga tcaacaccca atactccac ccctccagga ccacctcaa ggtaaagacc
60

tcagaccgag atctcaatcg cgctgaaaat ggctcagca gagccactc gtcaagttag
120

gagacatcgt cagtgctgca gccggggatc gccatggaga ccagaggact ggctgactcc
180

gggcagggct ccttcaccgg ccaggggatc gccaggctgt cgcgcctcat cttcttgctg
240

cgcaggtggg ctgccaggca tgtgcaccac caggaccagg gaccggactc ttttctgat
300

cgtttccgtg gagccgagct taaggagggtg tccagccaag aaagcaatgc ccaggcaaatt
360

gtgggcagcc aggagccagc agacagaggg agaagcgcct ggcccctggc caaatgcaac
420

actaacacca gcaacaacac ggaggaggag aagaagacga aaaagaagga tgcgatcgtg
480

gtggaccctg ccagcaacct gtactaccgc tggctgaccg ccatcgccct gcctgtcttc
540

tataactggg atctgcttat ttgcagggcc tgtttcgtat agctgcagtc cgagtacctg
600

atgctgtggc tggctctgga ctactcggca gatgtcctgt atgtcttgga tgtgcttgta
660

cgagctcgga caggttttct cgagcaaggc ttaatgggtca gtgataccaa caggctgtgg
720

cagcattaca agacgaccac gcagttcaag ctggatgtgt tgtccctggc cccacccgac
780

ctggcttact taaagggtggg cacaaactac ccagaagtga ggttcaaccg cctactgaag
840

ttttcccggc tctttgaatt ctttgaccgc acagagacaa ggaccaacta cccaatatg
900

ttcaggattg ggaacttggt cttgtacatt ctcatcatca tccactggaa tgcttgcac
960

tactttgcca tttccaagtt cattgggtttt gggacagact cctgggtcta cccaaacatc
1020

tcaatcccag agcatgggcg cctctccagg aagtacattt acagtctcta ctgggtccacc
1080

ttgaccctta ccaccattgg tgagacccca cccccgtga aagatgagga gtatctcttt
1140

gtggctgtag acttcttggt ggggtgtctg atttttgcca ccattgtggg caatgtgggc
1200

tccatgatct cgaatatgaa tgctcacgg gcagagttcc aggccaagat tgattccatc
1260

aagcagtaca tgcagttccg caaggtcacc aaggacttgg agacgcgggt tatccggtgg
1320

tttgactacc tgtgggcca caagaagacg gtggatgaga aggaggtgct caagagcctc
1380

ccagacaagc tgaaggctga gatcgccatc aacgtgcacc tggacacgct gaagaaggtt
1440

cgcattctcc aggactgtga ggcagggctg ctggtggagc tgggtgctgaa gctgcgaccc
1500

actgtgttca gccctgggga ttatatctgc aagaaggag atattgggaa ggagatgtac
1560

atcatcaacg agggcaagct ggccgtggtg gctgatgatg gggtcacca gttcgtggtc
1620

ctcagcgatg gcagctactt cggggagatc agcattctga acatcaaggg gagcaagtcg
1680

gggaaccgca ggacggcca catccgcagc attggctact cagacctgtt ctgcctctca
1740

aaggacgatc tcatggaggc cctcaccgag taccocgaag ccaagaaggc cctggaggag
1800

aaaggacggc agatcctgat gaaagacaac ctgatcgatg aggagctggc cagggcgggc
1860

gcggacccca aggaccttga ggagaaagtg gagcagctgg ggtcctccct ggacacctg
1920

cagaccaggt ttgcacgcct cctggctgag tacaacgcca cccagatgaa gatgaagcag
1980

cgtctcagcc aactggaaag ccaggtgaag ggtggtggg acaagccct ggctgatggg
2040

gaagttcccg gggatgctac aaaaacagag gacaaacaac agtga
2085

<210> 8

<211> 2085

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CNGA3 cADN tối ưu hóa codon

<400> 8

atggcaaaaa tcaataccca gtacagccac ccctcacgaa ctcacctgaa agtcaaaaaca
60

agcgatagag acctgaacag agccgagaac ggctgtcca gggcccacag ctccctctgag
120

gaaactagtt cagtgctgca gcctggaatc gctatggaga ccagagggct ggctgactct
180

ggccaaggaa gtttcacagg gcagggcatc gccaggctgt ctagactgat ttttctgctg
240

aggagatggg ccgctaggca tgtgcaccat caggaccagg gacccgatag tttccctgac
300

aggttcaggg gggccgaact gaaggaggtc agctcccagg aatctaacgc acaggccaat
360

gtgggcagtc aggagcccg c gatagagga cggctccgat ggcctctggc caagtgcaac
420

actaatcct ctaacaatac agaggaagag aagaaaacta agaaaaagga tgccatcgtg
480

gtcgaccctt ctagtaacct gtactatagg tggctgacag ctatcgact gccagtgttc
540

tacaattggt atctgctgat ttgcagagct tgttttgacg aactgcagag tgagtatctg
600

atgctgtggc tgggtgctgga ttactcagca gacgtgctgt atgtgctgga tgtcctggtg
660

cgcgcacgaa ctgggttcct ggagcagggc ctgatgggta gcgacaccaa cagactgtgg
720

cagcactaca aaaccacaac tcagtttaag ctggatgtcc tgtccctggg gccaaaccgac
780

ctggcctacc tgaaagtcgg cacaaactat cccgaggtgc ggttcaatcg cctgctgaag
840

ttctctcggc tgtttgagtt cttcgatagg acagagacta gaaccaacta cccaaatatg
900

ttccgcatcg gcaacctggg gctgtatatt ctgatcatta tccactggaa tgcttgatc
960

tactttgcaa tcagcaagtt cattggattt gggaccgaca gctgggtgta tccaaacatt
1020

tccatccccg aacatggacg actgagcagg aagtacatct attcactgta ctggagcaca
1080

ctgactctga ccacaattgg ggagaccccc cctccagtga aggatgaaga gtacctgttc
1140

gtggtcgtgg actttctggg cggcgtgctg atcttcgcaa caattgtcgg caatgtggga
1200

agtatgatct caaacatgaa tgccctacga gctgagttcc aggctaaaat tgacagcatc
1260

aagcagtata tgcagtttag aaaagtcact aaggatcttg agaccagagt gatccggtgg
1320

tttgactacc tgtgggcca caaaaagaca gtcgatgaaa aagaggtgct gaagagcctg
1380

cccgacaaac tgaaggcaga gattgccatc aatgtccatc tggatactct gaaaaaggtg
1440

cggatcttcc aggactgcga agcaggactg ctggtcgagc tggtgctgaa gctgcgcctt
1500

accgtgttta gcccaggcga ttatatctgt aaaaaggggg acattggcaa agaaatgtac
1560

attatcaacg aggggaagct ggctgtcgtg gcagacgatg gcgtgacca gttcgtcgtg
1620

ctgagcgatg gcagctatct tggggaaatt tccatcctga atatcaaagg ctccaagtct
1680

ggaaaccggc gcacagctaa tattcgggtcc atcggatatt ctgacctgtt ctgcctgtct
1740

aaggacgatc tgatggaggc actgactgaa taccctgagg ccaaaaaggc tctggaagag
1800

aaaggccggc agatcctgat gaaggataac ctgattgacg aagagctggc acgagctgga
1860

gcagacccta aagatctgga agagaaggtg gagcagctgg gatcaagcct ggataccctg
1920

cagacacgct tcgctcgact gctggcagaa tacaatgcca cccagatgaa aatgaagcag
1980

cgcctgagtc agctggagtc acaggtgaaa ggcggagggg acaagccctt ggcagatggc
2040

gaagtccttg gcgacgctac aaaaacagaa gataaacagc agtaa
2085

<210> 9

<211> 2577

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PDE6C cADN, NM_006204.3

<400> 9

atgggtgaga tcaaccaagt tgccgtggag aaatacctgg aggagaaccc tcagtttgcc
60

aaggagtact ttgacaggaa gttgcgggtg gaggtgctgg gagaaatctt caagaacagc
120

caggtgccag tccagtccag catgtccttc tctgagctga cccaggtgga ggagtcagcc
180

ctgtgcttgg agctgctgtg gaccgtgcag gaggaggggg gcaccccaga gcaggggggt
240

cacagggccc tgcagaggct ggcccacctg ctccaggctg accgctgcag catgttcctg
300

tgccggtccc ggaacggcat acctgaggtg gcctctaggt tgctggatgt cacccccacc
360

tccaagtttg aggacaacct ggtgggccct gacaaagaag ttgtgtttcc attggacatt
420

gggatagtgg gttgggctgc tcacacgaag aaaactcata atgtcccaga tgtgaaaaag
480

aacagccatt tttctgactt catggacaag caaactgggt atgtcactaa gaacctgctg
540

gcaaccccca tcgtggtggg caaggagggt cttgctgtga tcatggcagt taacaaagta
600

aatgcatctg aattttccaa acaggatgaa gaggtctttt ccaaatacct caactttgtg
660

tctatcatcc taaggcttca tcacaccagc tacatgtaca atattgaatc ccgaagaagc
720

cagatcctta tgtggtcagc caataaagta tttgaagaac tcacagatgt tgagcgacag
780

tttcacaaag cgctctacac ggttagatca tatctgaact gtgaacgata ctccattgga
840

ctgctggaca tgaccaagga gaaggaattc tacgatgaat ggccaatcaa gcttggagaa
900

gtagagcctt ataaagggtcc aaagacacct gatggcaggg aagtcaactt ttataaaatc
960

attgattaca ttttacatgg aaaagaagag atcaaagtga ttccgacgcc tcctgcagac
1020

cactggacac tcattagtgg gttgccaaca tatgttgctg aaaatggatt tatctgtaac
1080

atgatgaatg cccctgcgga tgaatacttc acatttcaga aaggacctgt agacgaaact
1140

ggttgggtca ttaagaatgt tttgtccctg cctattgtca acaagaaaga agatattgtg
1200

ggagtggcta cattttacaa caggaaggat ggaaaacctt tcgatgagca tgatgaatac
1260

attaccgaga ctctcacaca atttcttgga tgggtctctt taaatactga cacctacgat
1320

aagatgaata agctagaaaa cagaaaggac attgctcagg aaatgctcat gaaccaaacc
1380

aaagccactc ctgaagaaat taagtccatt ttgaaatttc aagagaagtt aaatgttgat
1440

gtaattgacg actgtgaaga aaaacaactt gttgcaattt tgaaagagga cttgccagac
1500

ccacgctcag cagaactgta cgaattccgc ttcagtgact tcccccttac agagcacgga
1560

ttgattaaat gtggaatacg actgtttttt gaaataaatg tgggtggagaa attcaaagta
1620

cctgtagagg ttcttaccag atggatgtac actgtgagga aagggtagcg agctgtcact
1680

taccacaatt ggcggcatgg gttcaacgtg gggcagacca tgtttacttt gctgatgaca
1740

ggaagattaa agaagtacta cacagatctc gaagcctttg ccatgcttgc tgctgctttc
1800

tgccatgata ttgaccacag aggcaccaat aatttgtacc agatgaaatc cacgtctcca
1860

ttagcaagac ttcattggtt ttctattttg gagaggcacc acctggagta cagtaagact
1920

ctgttgacgg atgagagttt aaacatcttc cagaacctaa ataagcggca gtttgaaaca
1980

gttattcatt tgttcgaggt cgcaataata gcaactgacc tggctttata tttcaagaag
2040

aggaccatgt ttcaaaaaat tgttgatgcc tgtgaacaaa tgcaaacgga agaagaagcc
2100

atcaaatatg taactgttga tccaaccaag aaagagatta tcatggcaat gatgatgacg
2160

gcatgtgact tgtctgctat taccaagccc tgggaggtgc aaagtcaggt agcacttatg
2220

gttgcaaatg aattttggga acaaggagat ctggagagaa cagtgttgca gcaacaaccc
2280

attcctatga tggacagaaa caaaagagat gaattaccta aacttcaagt tggatttatt
2340

gattttgttt gtacttttgt atataaggag ttctcacggt ttcacaaaga aatcacacct
2400

atgctgagtg gtcttcagaa taacagagta gaatggaaat cactagctga tgagtatgat
2460

gcaaagatga aggtcattga agaggaggca aaaaagcaag aaggaggagc cgaaaaagct
2520

gctgaagatt caggaggtgg tgatgacaaa aagtccaaaa catgtttaat gttgtaa
2577

<210> 10

<211> 252

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PDE6H cADN, NM_006205.2

<400> 10

atgagtgaca acactactct gcctgctcca gttcaaacc agggctctac caccacacgc
60

aaaggccctc ccaagttcaa gcagaggcag actcgccaat tcaagagtaa acctccaaag
120

aaaggtgtga aaggatttgg agatgacatt ccaggaatgg aggggctagg aacagatatc
180

acagtgattt gtccatggga ggcattcagc cacctggaat tgcattgagct cgctcagttt
240

gggattatct ga
252

<210> 11

<211> 1065

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> GNAT2 cADN, NM_005272.3

<400> 11

atgggaagtg gagccagtgc tgaggacaaa gaactggcca agaggtccaa ggagctagaa
60

aagaagctgc aggaggatgc tgataaggaa gccaagactg tcaagctgct actgctgggt
120

gctggggagt caggaaagag caccatcgtc aaacagatga agatcattca ccaggatggc
180

tattcaccag aagaatgcct ggagttcaag gctatcatct atggaaatgt gctgcagtcc
240

atcctggcta tcatccgggc catgaccaca ctgggcatcg attatgctga accaagctgt
300

gcggatgacg ggcgacagct caacaacctg gctgactcca ttgaggaggg aaccatgcct
360

cctgagctcg tggaggtcat taggaggttg tggaaggatg gtgggggtgca agcctgcttc
420

gagagagctg cagaatacca gcttaatgac tccgcatctt actacctgaa ccaattagaa
480

cgaattacag accctgagta cctccctagt gagcaagatg tgctccgatc cagagtcaaa
540

accacgggca tcattgaaac caagttttcc gtcaaagact tgaatttcag gatgtttgat
600

gtgggagggc agagatccga gagaaagaag tggatccact gcttcgaggg agtcacctgc
660

atcattttct gtgcagccct cagtgcctat gatatggtgc tgggtggaaga tgacgaagtg
720

aatcgtatgc atgagtcttt gcatctgttc aacagcatat gtaaccacaa attctttgcg
780

gctacttcca ttgtcctctt tctcaacaag aaggacctct ttgaggaaaa aatcaagaaa
840

gtccatctca gcatttgttt tccagagtat gatggtaaca actcctatga tgatgcgggg
900

aattacataa agagccagtt ccttgacctc aatatgcgaa aagatgtcaa agaaatctac
960

agtcacatga cctgtgctac agatacacag aatgtcaa attggtgttga tgcagttaca
1020

gatattatca tcaaagaaaa cctcaaggac tgcggcctct tctaa
1065

<210> 12

<211> 1638

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> KCNV2 cADN, NM_133497.3

<400> 12

atgctcaaac agagtgagag gagacgggtcc tggagctaca ggccctggaa cacgacggag
60

aatgagggca gccaacaccg caggagcatt tgctccctgg gtgcccgttc cggctcccag
120

gccagcatcc acggctggac agagggcaac tataactact acatcgagga agacgaagac
180

ggcgaggagg aggaccagtg gaaggacgac ctggcagaag aggaccagca ggcaggggag
240

gtcaccaccg ccaagcccga gggccccage gaccctccgg ccctgctgtc cacgctgaat
300

gtgaacgtgg gtggccacag ctaccagctg gactactgcg agctggccgg cttccccaag
360

acgcgcctag gtcgcctggc cacctccacc agccgcagcc gccagctaag cctgtgcgac
420

gactacgagg agcagacaga cgaatacttc ttcgaccgcg acccggccgt cttccagctg
480

gtctacaatt tctacctgtc cgggggtgctg ctgggtgctcg acgggctgtg tccgcgcgcg
540

ttcctggagg agctgggcta ctggggcgctg cggctcaagt acacgccacg ctgctgccgc
600

atctgcttcg aggagcggcg cgacgagctg agcgaacggc tcaagatcca gcacgagctg
660

cgcgcgacgg cgcaggtcga ggaggcggag gaactcttcc gcgacatgcg cttctacggc
720

ccgcagcggc gccgcctctg gaacctcatg gagaagccat tctcctcggg ggccgccaaag
780

gccatcgggg tggcctccag caccttcgtg ctcgctctccg tgggtggcgct ggcgctcaac
840

accgtggagg agatgcagca gcactcgggg cagggcgagg gcggcccaga cctgcggccc
900

atcctggagc acgtggagat gctgtgcatg ggcttcttca cgctcgagta cctgctgcgc
960

ctagcctcca cgccccacct gaggcgcttc gcgcgcagcg ccctcaacct ggtggacctg
1020

gtggccatcc tgccgctcta ccttcagctg ctgctcgagt gcttcacggg cgagggccac
1080

caacgcggcc agacggtggg cagcgtgggt aaggtgggtc aggtggtgcg cgtcatgcgc
1140

ctcatgcgca tcttccgcat cctcaagctg gcgcgccact ccaccggact gcgtgccttc
1200

ggcttcacgc tgcgccagtg ctaccagcag gtgggctgcc tgctgctctt catcgccatg
1260

ggcatcttca ctttctctgc ggctgtctac tctgtggagc acgatgtgcc cagcaccaac
1320

ttcactacca tccccactc ctggtggtgg gccgcggtga gcctctccac cgtgggctac
1380

ggagacatgt acccagagac ccacctgggc aggttttttg ccttcctctg cattgctttt
1440

gggatcattc tcaacgggat gccatttcc atcctctaca acaagttttc tgattactac
1500

agcaagctga aggettatga gtataccacc atacgcaggg agaggggaga ggtgaacttc
1560

atgcagagag ccagaaagaa gatagctgag tgtttgcttg gaagcaacc acagctcacc
1620

ccaagacaag agaattag
1638

<210> 13
<211> 3414
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CACNA2D4 cADN, NM_172364.4

<400> 13
atggtctgtg gctgctctgc cctccttccc ctccccaacc ccaggccac catgcctgca
60

actcccaact tcctcgcaaa cccagctcc agcagccgct ggattcccct ccagccaatg
120

cccgtggcct gggcctttgt gcagaagacc tcggccctcc tgtggctgct gcttctaggg
180

acctccctgt ccctgcgtg gggacaggcc aagattcctc tggaacaggt gaagctatgg
240

gctgacacct tcggcgggga cctgtataac actgtgacca aatactcagg ctctctcttg
300

ctgcagaaga agtacaagga tgtggagtcc agtctgaaga tcgaggaggt ggatggcttg
360

gagctggtga ggaagttctc agaggacatg gagaacatgc tcggaggaa agtcgaggcg
420

gtccagaatc tgggtggaagc tgccgaggag gccgacctga accacgaatt caatgaatcc
480

ctggtgttcg actattacaa ctcggtcctg atcaacgaga gggacgagaa gggcaacttc
540

gtggagctgg gcgccgagtt cctcctggag tccaatgctc acttcagcaa cctgccggtg
600

aacacctcca tcagcagcgt gcagctgccc accaacgtgt acaacaaaga cccagatatt
660

ttaaattggag tctacatgtc tgaagccttg aatgctgtct tcgtggagaa cttccagaga
720

gaccaaacgt tgacctggca atatTTTTggc agtgcaactg gattcttcag gatctatcca
780

ggtataaaat ggacacctga tgagaatgga gtcattactt ttgactgccg aaaccgcggc
840

tggtacattc aagctgctac ttctcccaag gacatagtga ttttgggtgga cgtgagcggc
900

agtatgaagg ggctgaggat gactattgcc aagcacacca tcaccaccat cttggacacc
960

ctgggggaga atgacttcat taatatcata gcgtacaatg actacgtcca ttacatcgag
1020

ccttgTTTTa aagggatcct cgtccaggcg gaccgagaca atcgagagca tttcaaactg
1080

ctggtggagg agttgatggt caaagggtgtg ggggtcgtgg accaagccct gagagaagcc
1140

ttccagatcc tgaagcagtt ccaagaggcc aagcaaggaa gcctctgcaa ccaggccatc
1200

atgctcatca gcgacggcgc cgtggaggac tacgagccgg tgtttgagaa gtataactgg
1260

ccagactgta aggtccgagt tttcacttac ctcatggga gagaagtgtc ttttgctgac
1320

cgcataaagt ggattgcatg caacaacaaa ggctactaca cgcagatctc aacgctggcg
1380

gacaccagg agaacgtgat ggaataacctg cacgtgctca gccgccccat ggtcatcaac
1440

cacgaccag acatcatctg gacagaggcc tacatggaca gcaagctcct cagctcgag
1500

gctcagagcc tgacactgct caccactgtg gccatgccag tcttcagcaa gaagaacgaa
1560

acgcgatccc atggcattct cctgggtgtg gtgggctcag atgtggccct gagagagctg
1620

atgaagctgg cgccccggtg caagcttgga gtgcacggat acgcctttct gaacaccaac
1680

aatggctaca tcctctccca tcccgaacctc cggccctgt acagagaggg gaagaaacta
1740

aaacccaaac ctaactacaa cagtgtggat ctctccgaag tggagtggga agaccaggct
1800

gaatctctga gaacagccat gatcaatagg gaaacaggta ctctctcgat ggatgtgaag
1860

gttccgatgg ataaagggaa gcgagttctt ttcctgacca atgactactt cttcacggac
1920

atcagcgaca cccctttcag tttgggggtg gtgctgtccc ggggccacgg agaatacato
1980

cttctgggga acacgtctgt ggaagaaggc ctgcatgact tgcttcaccc agacctggcc
2040

ctggccggtg actggatcta ctgcatcaca gatattgacc cagaccaccg gaagctcage
2100

cagctagagg ccatgatccg cttcctcacc aggaaggacc cagacctgga gtgtgacgag
2160

gagctggtcc gggaggtgct gtttgacgcg gtggtgacag ccccatgga agcctactgg
2220

acagcgctgg ccctcaacat gtccgaggag tctgaacacg tgggtggacat ggccttcctg
2280

ggcacccggg ctggcctcct gagaagcagc ttgttcgtgg gctccgagaa ggtctccgac
2340

aggaagttcc tgacacctga ggacgaggcc agcgtgttca ccctggaccg cttcccgtg
2400

tggtagcgcc aggcctcaga gcacctgct ggcagcttcg tttcaacct ccgtgggca
2460

gaaggaccag aaagtgcggg tgaacccatg gtggtgacgg caagcacage tgtggcggtg
2520

accgtggaca agaggacagc cattgctgca gccgcgggcg tccaaatgaa gctggaattc
2580

ctccagcgca aattctgggc ggcaacgcgg cagtgcagca ctgtggatgg gccgtgcaca
2640

cagagctgcg aggacagtga tctggactgc ttcgtcatcg acaacaacgg gttcattctg
2700

atctccaaga ggtcccgaga gacgggaaga tttctggggg aggtggatgg tgctgtcctg
2760

accagctgc tcagcatggg ggtgttcagc caagtgacta tgtatgacta tcaggccatg
2820

tgcaaaccct cgagtcacca ccacagtgc gccagcccc tggtcagccc aatttctgcc
2880

ttcttgacgg cgaccaggtg gctgctgcag gagctggtgc tgttcttgcg ggagtggagt
2940

gtctggggct cctggtacga cagagggggc gaggccaaaa gtgtcttcca tcactccac
3000

aaacacaaga agcaggaccc gctgcagccc tgcgacacgg agtaccctgt gttcgtgtac
3060

cagccggcca tccgggaggc caacgggatc gtggagtgcg ggccctgccg gaaggtattt
3120

gtggtgcagc agattcccaa cagtaacctc ctctctctgg tgacagaccc cacctgtgac
3180

tgcagcatct tcccaccagt gctgcaggag gcgacagaag tcaaataataa tgcctctgtc
3240

aaatgtgacc ggatgcgctc ccagaagctc cgccggcgac cagactcctg ccacgccttc
3300

catccagagg agaatgcca ggactgcggc ggcgctcgg acacctcagc ctgcccgcc
3360

ctactcctgc tgctgtgtg tgctggggg ctactgccc aactcctgcg gtga
3414

<210> 14

<211> 2430

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CNGB3 cADN, NM_019098.4

<400> 14

atgttttaa atcgctgacaaa agtcaacaag gtgaagccta taggagagaa caatgagaat
60

gaacaaagtt ctgctcgga tgaagaaggc tctcacccaa gtaatcagtc tcagcaaacc
120

acagcacagg aagaaaacaa aggtgaagag aaatctctca aaaccaagtc aactccagtc
180

acgtctgaag agccacacac caacatacaa gacaaactct ccaagaaaaa ttctcttgga
240

gatctgacca caaacctga ccctcaaaat gcagcagaac caactggaac agtgccagag
300

cagaaggaaa tggaccccg gaaagaaggt ccaaacagcc caaaaacaa accgcctgca
360

gtcctgttta taaatgagta tgccgatgcc cagctacaca acctggtgaa aagaatgcgt
420

caaagaacag ccctctacaa gaaaaagttg gtagagggag atctctcctc acccgaagcc
480

agcccacaaa ctgcaaagcc cacggctgta ccaccagtaa aagaaagcga tgataagcca
540

acagaacatt actacaggct gttgtggttc aaagtcaaaa agatgccttt aacagagtac
600

ttaaagcgaa ttaaacttcc aaacagcata gattcataca cagatcgact ctatctcctg
660

tggctcttgc ttgtcactct tgcctataac tggaactgct ggtttatacc actgcgcctc
720

gtcttcccat atcaaaccgc agacaacata cactactggc ttattgcgga catcatatgt
780

gatatcatct acctttatga tatgctattt atccagccca gactccagtt tgtaagagga
840

ggagacataa tagtggattc aaatgagcta aggaaacact acaggacttc tccaaaattt
900

cagttggatg tcgcatcaat aataccattt gatatttgct acctcttctt tgggtttaat
960

ccaatgttta gagcaaatag gatgttaaag tacacttcat tttttgaatt taatcatcac
1020

ctagagtcta taatggacaa agcatatatac tacagagtta ttcgaacaac tggatacttg
1080

ctgtttattc tgcacattaa tgcctgtgtt tattactggg cttcaaacta tgaaggaatt
1140

ggcactacta gatgggtgta tgatggggaa ggaaacgagt atctgagatg ttattattgg
1200

gcagttcgaa ctttaattac cattgggtggc ctaccagaac cacaaacttt atttgaaatt
1260

gtttttcaac tcttgaattt ttttctgga gtttttgtgt tctccagttt aattggtcag
1320

atgagagatg tgattggagc agctacagcc aatcagaact acttccgcgc ctgcatggat
1380

gacaccattg cctacatgaa caattactcc attcctaaac ttgtgcaaaa gcgagttcgg
1440

acttggatatg aatatacatg ggactctcaa agaatgctag atgagtctga tttgcttaag
1500

accctaccaa ctacgggtcca gttagccctc gccattgatg tgaacttcag catcatcagc
1560

aaagtcgact tgttcaaggg ttgtgataca cagatgattt atgacatggt gctaagattg
1620

aatccggttc tctatttgcc tgggtgacttt gtctgcaaaa agggagaaat tggcaaggaa
1680

atgtatatca tcaagcatgg agaagtccea gttcttggag gccctgatgg tactaaagtt
1740

ctggttactc tgaaagctgg gtcggtgttt ggagaaatca gccttctagc agcaggagga
1800

ggaaaccgtc gaactgcca tgtggtggcc cacgggtttg ccaatctttt aactctagac
1860

aaaaagaccc tccaagaaat tctagtgcac tatccagatt ctgaaaggat cctcatgaag
1920

aaagccagag tgctttttaa gcagaaggct aagaccgcag aagcaacccc tccaagaaaa
1980

gatcttgccc tcctcttccc accgaaagaa gagacacca aactgtttaa aactctccta
2040

ggaggcacag gaaaagcaag tcttgcaaga ctactcaa tgaagcgaga gcaagcagct
2100

cagaagaaag aaaattctga aggaggagag gaagaaggaa aagaaaatga agataaacia
2160

aaagaaaatg aagataaaca aaaagaaaat gaagataaag gaaaagaaaa tgaagataaa
2220

gataaaggaa gagagccaga agagaagcca ctggacagac ctgaatgtac agcaagtcct
2280

attgcagtgg aggaagaacc ccaactcagtt agaaggacag ttttaccag agggacttct
2340

cgtcaatcac tcattatcag catggctcct tctgctgagg gcggagaaga ggttcttact
2400

attgaagtca aagaaaaggc taagcaataa
2430

<210> 15

<211> 1786

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc hG1.7, mảnh LCR 1,2 kb M/L opsin, mảnh 500 bp M opsin,
có đột biến M8

<400> 15

taggaataga aggggtgggtg caggaggctg aggggtgggg aaagggcatg ggtgtttcat
60

gaggacagag cttccgtttc atgcaatgaa aagagtttgg agacggatgg tggtgactgg
120

actatacact tacacacggg agcgatggta cactttgtat tatgtatatt ttaccacgat
180

ctttttaaaag tgtcaaaggc aaatggccaa atggttcctt gtcctatagc tgtagcagcc
240

atcggctggt agtgacaaag cccctgagtc aagatgacag cagcccccat aactcctaata
300

cggctctccc gcgtggagtc atttaggagt agtcgcatta gagacaagtc caacatctaa
360

tcttccaccc tggccagggc cccagctggc agcgagggtg ggagactccg ggcagagcag
420

agggcgctga cattggggcc cggcctggct tgggtccctc tggcctttcc ccagggggcc
480

tctttccttg gggctttctt gggccgccac tgctcccgct cctctcccc catcccccc
540

cctcaccccc tcgttcttca tacccttctc tagtgctccc tccactttca tccacccttc
600

tgcaagagtg tgggaccaca aatgagtttt cacctggcct ggggacacac gtgccccac
660

aggtgctgag tgactttcta ggacagtaat ctgctttagg ctaaaatggg acttgatctt
720

ctgttagccc taatcatcaa ttagcagagc cgggtgaagg gcagaacctt ccgcctttcc
780

aggcctctc ccacctctgc cacctccact ctcttctctg ggatgtgggg gctggcacac
840

gtgtggccca gggcattggt gggattgcac tgagctgggt cattagcgta atcctggaca
900

agggcagaca gggcgagcgg agggccagct ccggggctca ggcaaggctg ggggcttccc
960

ccagacaccc cactcctcct ctgctggacc cccacttcat agggcacttc gtgttctcaa
1020

agggcttcca aatagcatgg tggccttgga tgcccaggga agcctcagag ttgcttatct
1080

ccctctagac agaaggggaa tctcgggtcaa gagggagagg tcgccctgtt caaggccacc
1140

cagccagctc atggcggtaa tgggacaagg ctggccagcc atccccacct cagaagggac
1200

ccggtggggc aggtgatctc agaggaggct cacttctggg tctcacattc ttggatcaca
1260

ggtatttgcc actaagccca gctaattggt ttttatttag tagaaacggg gtttcaccat
1320

gttagtcagg ctggtcggga actcctgacc tcaggagatc taccgcctt ggctcccaa
1380

agtgctggga ttacaggcgt gtgccactgt gccagccac ttttttttag acagagtctt
1440

ggtctgttgc ccaggctaga gttcagtggc gccatctcag ctactgcaa cctccgcctc
1500

ccagattcaa gcgattctcc tgcctcgacc tcccagtagc tgggattaca ggtttccagc
1560

aaatccctct gagccgccc cgggggctcg cctcaggagc aaggaagcaa ggggtgggag
1620

gaggaggtct aagtcacagg cccaattaag agatcagatg gtgtaggatt tgggagcttt
1680

taaggtgaag aggcccgggc tgatcccact ggccggtata aagcacctg accctcaggt
1740

gacgcaccat ctagagctgc cgtcggggac agggctttcc atagcc
1786

<210> 16
<211> 6
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đột biến M8

<400> 16
tctaga
6

<210> 17
<211> 1970
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mảnh gen khởi động 2,0 kb M opsin có đột biến M8

<400> 17
taaaaagcaa gtcttgccag ggcagtgggtg tgcacctgtg gtcccagcta ctcaggatgc
60

tgaggcagga ggattacttg tgcccagcaa gtagaggctg cagtgcctg tgactgtgct
120

actgccctcc aacctgggtg acagagttag accttgcttc aaaaaaaaa gagcgggggg
180

ggggggccgg gccgggcgtg gtggctcaca gctgtaatcc cagcactttg ggaagccaag
240

gcgggtgat cacttgaggt caggagtttg agaccatcat ggtcaacact gcgaaacact
300

gtccctacta aaaatacaaa aattagccgg gcatgggtggc acacacctgt aatcccagct
360

actggggagg ctgaggcagg agaattgctt gagccgggga gacggagggt gcagttagcc
420

gagactgcgc cactgcactc cagcctgact gacaagagtg agattgtctc aaaaaaaaa
480

aaaaagtaat cactagaaaa gaagctacat atgtacataa catccaaata accaagagga
540

gaaaaaaaaatg ggacttgatt aatcaaaaaca aaaacaaaaa agaaagaaag aaagggggag
600

aaaataaaaac aagggtggg tgtgctggct catgcctgta atcccagcac ttggaagcc
660

aagggtgggtg gatctcttga gctcaggagg tcaagaccag cctgggcaac atggcgaaac
720

cccgctctta ttaaaaaaaaa aattaatata acaattatcc tggagtgggt gtgcacacct
780

gtagtcccag ctaccagga cgctgagacg ggaggatcgc ttgatcccg ggatgtcgag
840

gctgccgtga tcgcaccact gccctccagc cagggtggca gactgagacc ccatctcaaa
900

aaataaataa ataaaagcaa acaagaaaaa aaaaggcttg aaacatatct gatagataaa
960

gggctaatac acacaatata taaagaactg caaatcagta aactaagagc aaataacca
1020

atataaagac attaaagggt agccacggac atctcagacg acgaaaaaca aaagacagta
1080

aacgtataat aaaacatgta attgcaagggt gatccgggaa tagtaagcga aaagcaacaa
1140

ttaaatacta ttttctcatc caccagaacg ccaaaaatta aaaagcctaa caatgtccag
1200

ggctggcgag aatgtggcag aaggatgatgt cacataccct gcaagtggga atctaaacag
1260

attcagggtt ttggtttttt tttaatcgca attaggtggc ctgttaaatt ttttttcttg
1320

agacagagtt ttgctcttgt tgcccaggct ggagtgcaat ggctcgatct tggctcaccg
1380

caacctcgac ctcccaggta caagcgattc tctgtctca gcctcccaag tagctgggag
1440

tacaggtatt tgccactaag cccagctaatt tgttttttat ttagtagaaa cggggtttca
1500

ccatgttagt caggctggtc gggaaactcct gacctcagga gatctaccgc ccttggcctc
1560

ccaaagtgtt gggattacag gcgtgtgcc a ctgtgccag ccactttttt ttagacagag
1620

tcttgggtctg ttgcccaggc tagagttcag tggcgccatc tcagctcact gcaacctccg
1680

cctcccagat tcaagcgatt ctctgcctc gacctccag tagctgggat tacaggtttc
1740

cagcaaatcc ctctgagccg cccccggggg ctgcctcag gagcaaggaa gcaaggggtg
1800

ggaggaggag gtctaagtcc caggcccaat taagagatca gatggtgtag gatttgggag
1860

cttttaaggt gaagaggccc gggctgatcc cactggccgg tataaagcac cgtgaccctc
1920

aggtgacgca ccattctagag ctgccgtcgg ggacagggct ttccatagcc
1970