



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

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

(11)



1-0045240

(51)^{2020.01} C12N 15/113; A61K 48/00; C12N 7/00; (13) B
C12N 15/86; A61K 35/761; A61P 25/28

(21) 1-2020-02236

(22) 21/09/2018

(86) PCT/US2018/052221 21/09/2018

(87) WO2019/060726 A1 28/03/2019

(30) 62/561,843 22/09/2017 US

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/12/2020 393A

(71) GENZYME CORPORATION (US)

50 Binney Street, Cambridge, Massachusetts 02142, US

(72) O'RIORDAN Catherine R. (US); PALERMO Adam (US); RICHARDS, Brenda (US); STANEK, Lisa M. (US).

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

(54) ARNI, CẤU TRÚC BIỂU HIỆN CÓ CHỨA AXIT NUCLEIC MÃ HÓA CHO
ARNI VÀ VẬT TRUYỀN CÓ CHỨA CẤU TRÚC NÀY

(21) 1-2020-02236

(57) Sáng chế đề xuất phân tử ARNi để điều trị bệnh Huntington. Sáng chế còn đề xuất các xét nghiệm, vật truyền (*ví dụ*, vật truyền rAAV, adenovirus tái tổ hợp, lentivirus tái tổ hợp, và HSV tái tổ hợp), tế bào, hạt virus, và dược phẩm chứa ARNi. Sáng chế còn đề xuất phương pháp và bộ kit liên quan đến việc sử dụng ARNi, ví dụ, để điều trị bệnh Huntington.

Tham khảo chéo đến đơn liên quan

Đơn này yêu cầu hưởng quyền ưu tiên của Đơn Tạm Thời Mỹ Số 62/561,843, nộp ngày 22 tháng 9 năm 2017, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó.

Nội danh mục trình tự trên tệp văn bản ASCII

Nội dung của việc nộp tệp văn bản ASCII sau đây được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó: dạng có thể đọc được trên máy tính (CRF) của Danh Mục Trình Tự (tên tệp: 159792014740SeqList.txt, ghi ngày: 20 tháng 9 năm 2018, kích thước: 19 KB).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

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

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

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

ARNi đã được nghiên cứu là liệu pháp để điều trị bệnh Huntington (HD). HD là bệnh thoái hóa thần kinh di truyền gây ra bởi sự mở rộng phân lặp CAG trong exon 1 của gen huntingtin (HTT). Sự mở rộng thu được của dải polyglutamin trong vùng đầu N tạo ra chức năng tạo độc cho protein huntingtin đột biến (mHtt). Khả năng làm câm biểu hiện mHtt là chiến lược chữa bệnh đối với HD được chứng minh lần đầu tiên ở mô hình chuột có điều kiện mắc bệnh (Yamamoto *et al.*, (2000) *Cell* 101:57-66.). Khi sự biểu hiện của mHtt được cảm ứng trong các con chuột này, sự khác thường bệnh lý và hành vi xuất hiện. Sự kìm hãm bởi được trung gian tetracyclin sau đó của gen chuyển mHtt làm đảo ngược sự bất thường này, cho thấy rằng việc làm giảm hàm lượng mHtt tạo ra cơ chế dọn sạch protein trong neuron để chuẩn hóa các thay đổi cảm ứng mHtt. Do đó, chiến lược trị liệu mà làm giảm hàm lượng mHtt có thể có tiềm năng làm dừng sự tiến triển bệnh và làm nhẹ bớt triệu chứng HD. miARN mà nhắm đích vào Htt được đề xuất trong WO 2016/130589, được kết hợp trong bản mô tả này với toàn bộ nội dung của nó.

Tất cả các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong bản mô tả này, bao gồm các đơn sáng chế và công bố sáng chế, được kết hợp bằng cách viện dẫn đến toàn bộ tài liệu đó.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất ARNi có chứa sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép; b) sợi thứ nhất có chứa vùng dẫn, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1) hoặc 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7); và c) sợi thứ hai có chứa vùng không dẫn. Theo một số phương án, vùng dẫn nucleic có chứa trình tự axit nucleic 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1) và vùng không dẫn có

chứa trình tự 5'- CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA-3' (SEQ ID NO:2). Theo một số phương án, sợi thứ nhất có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng khoảng 90% đối với SEQ ID NO:1 hoặc độ tương đồng khoảng 90% đối với SEQ ID NO:2. Theo phương án khác, vùng dẫn nucleic có chứa trình tự axit nucleic 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7) và vùng không dẫn có chứa trình tự 5'- UGCUUGUCAACCACACCGACU-3' (SEQ ID NO:8). Theo một số phương án, sợi thứ hai có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng khoảng 90% đối với SEQ ID NO:7 hoặc độ tương đồng khoảng 90% đối với SEQ ID NO:8. Theo một số phương án trong số các phương án nêu trên, sợi thứ nhất và sợi thứ hai được liên kết với nhau bởi cầu nối ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng. Theo một số phương án, cầu nối ARN có chứa từ 4 đến 50 nucleotit. Theo một số phương án, cấu trúc vòng có chứa từ 4 đến 20 nucleotit. Theo một số phương án, ARNi có chứa từ đầu 5' đến 3' là sợi thứ hai, cầu nối ARN, và sợi thứ nhất. Theo một số phương án, ARNi có chứa từ 5' đến 3' là sợi thứ nhất, cầu nối ARN, và sợi thứ hai. Theo một số phương án, ARNi có chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:10. Theo một số phương án, ARNi có chứa trình tự nucleotit tương đồng khoảng 90% đối với trình tự nucleotit SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:10. Theo một số phương án, ARNi là ARN ức chế nhỏ (siARN), microARN (miARN), hoặc ARN kẹp tóc nhỏ (shARN). Theo một số phương án, ARNi nhắm đích vào ARN mã hóa cho polypeptit liên quan đến bệnh Huntington. Theo một số phương án, polypeptit là huntingtin. Theo một số phương án, huntingtin có chứa đột biến liên quan đến bệnh Huntington.

Theo một số phương án của các khía cạnh và phương án nêu trên, sáng chế đề xuất cấu trúc biểu hiện có chứa axit nucleic mã hóa cho ARNi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa cho ARNi có chứa giá đỡ miARN. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa cho ARNi được liên kết có điều khiển với vùng khởi động. Theo một số phương án, vùng khởi động được chọn từ vùng khởi động rất sớm của virus cự bào (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, vùng khởi động phosphoglyxerat kinaza-1 (PGK), vùng khởi động virus khỉ 40 (SV40), vùng khởi động CK6, vùng khởi động transthyretin (TTR), vùng khởi động TK, vùng khởi động đáp ứng tetracyclin (TRE), vùng khởi động HBV, vùng khởi động hAAT, vùng khởi động LSP, vùng khởi động đặc hiệu gan khảm (LSP), vùng khởi động E2F, vùng khởi động telomeraza (hTERT); vùng khởi động

vùng tăng cường của virus cự bào/beta-actin ở gà/ β -globin ở thỏ (vùng khởi động CAG), vùng khởi động yếu tố kéo dài 1-alpha (vùng khởi động EFl-alpha), vùng khởi động β -glucuronidaza ở người, vùng khởi động β -actin ở gà (CBA), vùng khởi động LTR của virus sarcom Rous retrovirus (RSV), vùng khởi động dihydrofolat reductaza, và vùng khởi động 13-actin. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện còn bao gồm tín hiệu polyadenyl hóa. Theo một số phương án, tín hiệu polyadenyl hóa là tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò, tín hiệu polyadenyl hóa SV40, hoặc HSV TK pA.

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

Theo một số phương án của các khía cạnh và phương án nêu trên, vật truyền là vật truyền rAAV. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện được kẹp bởi một hoặc nhiều trình tự đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR) của AAV. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện được kẹp bởi hai ITR AAV. Theo các phương án nhất định, ITR AAV là AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, các ITR kiểu huyết thanh AAV của

dê, AAV của bò, hoặc AAV của chuột. Theo các phương án nhất định, ITR AAV là ITR AAV2. Theo một số phương án, vật truyền còn chứa axit nucleic nhồi. Theo một số phương án, axit nucleic nhồi nằm ngược dòng hoặc xuôi dòng của axit nucleic mã hóa cho ARNi. Theo một số phương án, vật truyền là vật truyền rAAV tự bổ sung. Theo một số phương án, vật truyền có chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa cho ARNi và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa cho phần bổ sung của ARNi, trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trên cùng sợi với trình tự axit nucleic thứ hai dọc theo hầu hết hoặc toàn bộ chiều dài của nó. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic thứ nhất và trình tự axit nucleic thứ hai được liên kết bằng ITR AAV đột biến, trong đó ITR AAV đột biến có chứa đột biến làm khuyết của vùng D và có chứa đột biến của trình tự phân giải cuối. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào có chứa vật truyền bất kỳ trong số các vật truyền (ví dụ như, các vật truyền rAAV) được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án của các khía cạnh và phương án nêu trên, sáng chế đề xuất hạt virut có chứa vật truyền bất kỳ trong số các vật truyền được mô tả trong bản mô tả này, trong đó hạt virut là hạt AAV bọc vật truyền rAAV, hạt adenovirut bọc vật truyền adenovirut tái tổ hợp, hạt lentivirut bọc vật truyền lentivirut tái tổ hợp hoặc hạt HSV bọc vật truyền HSV tái tổ hợp. Theo một số phương án, hạt virut là hạt adenovirut bọc vật truyền adenovirut tái tổ hợp. Theo một số phương án, hạt adenovirut có chứa capsit từ kiểu huyết thanh của Adenovirut 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad bò kiểu 3, Ad chó kiểu 2, Ad cừu, hoặc Ad lợn kiểu 3. Theo một số phương án, hạt adenovirut bao gồm capsit của kiểu huyết thanh adenovirut 2 hoặc biến thể của capsit của kiểu huyết thanh adenovirut 5. Theo một số phương án, hạt virut là hạt lentivirut bọc vật truyền lentivirut tái tổ hợp. Theo một số phương án, hạt lentivirut bao gồm capsit được tạo kiểu giả với virut gây viêm miệng có mụn nước (VSV), virut gây viêm màng não lympho bào (LCMV), virut sông Ross (RRV), virut Ebola, virut Marburg, virut Mokala, virut Rabies, RD114 hoặc các biến thể của chúng. Theo một số phương án, hạt virut là hạt HSV. Theo một số phương án, hạt HSV là hạt rHSV-1 hoặc hạt rHSV-2.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt AAV tái tổ hợp có chứa vật truyền bất kỳ trong số các vật truyền rAAV được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, hạt virus AAV có chứa AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV dê, thể khảm AAV1/AAV2, AAV bò, hoặc capsit AAV chuột nhắt, capsit rAAV2-HBKO (xem WO 2015/168666, mà được kết hợp ở đây để tham khảo). Theo một số phương án, ITR và capsit của hạt virus rAAV thu được từ cùng kiểu huyết thanh AAV. Theo một số phương án, ITR và capsit của hạt virus rAAV thu được từ các kiểu huyết thanh AAV khác nhau. Theo một số phương án, ITR thu được từ AAV2 và capsit của hạt rAAV thu được từ AAV1. Theo một số phương án, vật truyền rAAV có chứa từ 5' đến 3' là ITR AAV2, vùng khởi động, axit nucleic mã hóa cho ARNi, tín hiệu polyadenyl hóa, và ITR AAV2. Theo một số phương án, vùng khởi động là vùng khởi động CBA. Theo một số phương án, tín hiệu polyadenyl hóa là tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò. Theo một số phương án, vật truyền rAAV có chứa từ 5' đến 3' là toàn bộ hoặc một phần (ví dụ như, phần chức năng) của ITR AAV2, vùng khởi động CBA, intron (ví dụ như, intron khảm), axit nucleic mã hóa cho ARNi, tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò, và ITR AAV2. Theo một số phương án, vật truyền còn chứa axit nucleic nhồi. Theo một số phương án, axit nucleic nhồi còn chứa axit nucleic mã hóa cho polypeptit báo cáo (ví dụ như, protein huỳnh quang màu xanh lá cây (GFP)). Theo một số phương án, axit nucleic nhồi nằm ngược dòng hoặc xuôi dòng của axit nucleic mã hóa cho ARNi.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hợp phần (ví dụ như, dược phẩm) có chứa hạt virus bất kỳ trong số các hạt virus (ví dụ như, hạt rAAV) được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, hợp phần còn chứa chất mang dược dụng.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất bộ kit có chứa ARNi bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, bộ kit có chứa hạt virus bất kỳ trong số các hạt virus (ví dụ như, hạt rAAV) được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, bộ kit có chứa hợp phần bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, bộ kit còn chứa hướng dẫn sử dụng.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh Huntington ở động vật có vú có chứa việc dùng cho động vật có vú ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'- UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG -3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'- CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA -3' (SEQ ID NO:2) hoặc sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'- AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA -3' (SEQ ID NO:7) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'- UGCUUGUCAACCACACCGACU -3' (SEQ ID NO:8). Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự biểu hiện của htt ở động vật có vú mắc bệnh Huntington có chứa việc dùng cho động vật có vú ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'- UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG -3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'- CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA -3' (SEQ ID NO:2) hoặc sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'- AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA -3' (SEQ ID NO:7) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'- UGCUUGUCAACCACACCGACU -3' (SEQ ID NO:10). Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự tích lũy của htt ở tế bào của động vật có vú mắc bệnh Huntington có chứa việc dùng cho động vật có vú ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'- UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG -3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'- CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA -3' (SEQ ID NO:2) hoặc sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'- AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA -3' (SEQ ID NO:7) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'- UGCUUGUCAACCACACCGACU -3' (SEQ ID NO:8).

Theo một số phương án của phương pháp nêu trên, sợi thứ nhất có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng khoảng 90% đối với SEQ ID NO:1 hoặc độ tương đồng khoảng 90% đối với SEQ ID NO:7. Theo một số phương án, sợi thứ hai có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng khoảng 90% đối với SEQ ID NO:2 hoặc độ tương đồng khoảng 90% đối với SEQ ID NO:8. Theo một số phương án, sợi thứ nhất và sợi thứ hai được liên kết với nhau bởi cầu nối ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng. Theo một số phương án, cầu nối ARN có chứa từ 4 đến 50 nucleotit. Theo một số phương án, cấu trúc vòng có chứa từ 4

đến 20 nucleotit. Theo một số phương án, ARNi có chứa từ đầu 5' đến 3' là sợi thứ hai, cầu nối ARN, và sợi thứ nhất. Theo một số phương án, ARNi có chứa từ 5' đến 3' là sợi thứ nhất, cầu nối ARN, và sợi thứ hai. Theo một số phương án, ARNi có chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:10. Theo một số phương án, ARNi có chứa trình tự nucleotit tương đồng khoảng 90% đối với trình tự nucleotit SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:10.

Theo một số phương án của phương pháp nêu trên, ARNi được mã hóa trên cấu trúc biểu hiện. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa cho ARNi có chứa giá đỡ miARN. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa cho ARNi được liên kết có điều khiển với vùng khởi động. Theo một số phương án, vùng khởi động có khả năng biểu hiện ARNi trong não của động vật có vú. Theo một số phương án, vùng khởi động được chọn từ vùng khởi động rất sớm của virus cự bào (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, vùng khởi động phosphoglycerat kinaza-1 (PGK), vùng khởi động virus khi 40 (SV40), vùng khởi động CK6, vùng khởi động transthyretin (TTR), vùng khởi động TK, vùng khởi động đáp ứng tetracyclin (TRE), vùng khởi động HBV, vùng khởi động hAAT, vùng khởi động LSP, vùng khởi động đặc hiệu gan khảm (LSP), vùng khởi động E2F, vùng khởi động telomerase (hTERT); vùng khởi động vùng tăng cường của virus cự bào/beta-actin gà/ β -globin thỏ (CAG), vùng khởi động của vùng khởi động yếu tố kéo dài 1-alpha (EF1-alpha) và vùng khởi động β -glucuronidaza ở người. Theo một số phương án, vùng khởi động là vùng khởi động β -actin lai ở gà. Theo một số phương án, axit nucleic còn chứa toàn bộ hoặc một phần (ví dụ như, phần chức năng) của intron và tín hiệu polyadenyl hóa. Theo một số phương án, tín hiệu polyadenyl hóa là tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò, và intron là intron khảm.

Theo một số phương án của phương pháp nêu trên, ARNi được mã hóa trên vật truyền có chứa cấu trúc biểu hiện theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, vật truyền là vật truyền virus kết hợp adeno tái tổ hợp (rAAV), vật truyền adenovirus tái tổ hợp, vật truyền lentivirus tái tổ hợp hoặc vật truyền virus herpes simplex (HSV) tái tổ hợp. Theo một số phương án, vật truyền là vật truyền adenovirus tái tổ hợp. Theo một số phương án, vật truyền adenovirus tái tổ hợp thu được từ kiểu huyết thanh của Adenovirus 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34,

AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad bò kiểu 3, Ad chó kiểu 2, Ad cừu, hoặc Ad lợn kiểu 3. Theo một số phương án, vật truyền adenovirut tái tổ hợp thu được từ kiểu huyết thanh 2 của adenovirut hoặc biến thể của kiểu huyết thanh 5 của adenovirut. Theo một số phương án, vật truyền là vật truyền lentivirut tái tổ hợp. Theo một số phương án, vật truyền lentivirut tái tổ hợp thu được từ lentivirut được tạo kiểu giả với virut gây viêm miệng có mụn nước (VSV), virut gây viêm màng não lympho bào (LCMV), virut sông Ross (RRV), virut Ebola, virut Marburg, virut Mokala, virut Rabies, RD114 hoặc các biến thể của chúng. Theo một số phương án, vật truyền là vật truyền rHSV. Theo một số phương án, vật truyền rHSV thu được từ rHSV-1 hoặc rHSV-2.

Theo một số phương án của phương pháp nêu trên, vật truyền là vật truyền rAAV. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện được kẹp bởi một hoặc nhiều trình tự đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR) của AAV. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện được kẹp bởi hai ITR AAV. Theo các phương án nhất định, ITR AAV là AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, các ITR kiểu huyết thanh AAV của dê, AAV của bò, hoặc AAV của chuột. Theo các phương án nhất định, ITR AAV là ITR AAV2. Theo một số phương án, vật truyền còn chứa axit nucleic nhồi. Theo một số phương án, axit nucleic nhồi ở giữa vùng khởi động và axit nucleic mã hóa cho ARNi. Theo một số phương án, vật truyền là vật truyền rAAV tự bổ sung. Theo một số phương án, vật truyền có chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa cho ARNi và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa cho phần bổ sung của ARNi, trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trên cùng sợi với trình tự axit nucleic thứ hai dọc theo hầu hết hoặc toàn bộ chiều dài của nó. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic thứ nhất và trình tự axit nucleic thứ hai được liên kết bằng ITR AAV đột biến, trong đó ITR AAV đột biến có chứa đột biến làm khuyết của vùng D và có chứa đột biến của trình tự phân giải cuối. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào có chứa vật truyền bất kỳ trong số các vật truyền (ví dụ như, các vật truyền rAAV) được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án của phương pháp nêu trên, vật truyền mã hóa cho ARNi ở trong hạt virut, trong đó hạt virut là hạt AAV bọc vật truyền rAAV, hạt adenovirut bọc vật truyền adenovirut tái tổ hợp, hạt lentivirut bọc vật truyền lentivirut tái tổ hợp hoặc hạt HSV

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

Theo một số phương án của phương pháp nêu trên, sáng chế đề xuất hạt AAV tái tổ hợp có chứa vật truyền bất kỳ trong số các vật truyền rAAV được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, hạt virus AAV bao gồm AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV của dê, AAV1/AAV2 khảm, AAV của bò, hoặc capsid AAV của chuột capsid kiểu huyết thanh rAAV2/HBoV1. Theo một số phương án, ITR và capsid của hạt virus rAAV thu được từ cùng kiểu huyết thanh AAV. Theo một số phương án, ITR và capsid của hạt virus rAAV thu được từ các kiểu huyết thanh AAV khác nhau. Theo một số phương án, ITR thu được từ AAV2 và capsid của hạt rAAV thu được từ AAV1. Sáng chế đề xuất vật truyền có chứa cấu trúc biểu hiện theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, vật truyền là vật truyền virus kết hợp adeno tái tổ hợp (rAAV), vật truyền adenovirus tái tổ hợp, vật truyền lentivirus tái tổ hợp hoặc vật truyền virus herpes simplex (HSV) tái tổ hợp. Theo một số phương án, vật truyền là vật truyền adenovirus tái tổ hợp. Theo một số phương án, vật truyền adenovirus tái tổ hợp thu được từ kiểu huyết thanh của Adenovirus 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34,

AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad bò kiểu 3, Ad chó kiểu 2, Ad cừu, hoặc Ad lợn kiểu 3. Theo một số phương án, vật truyền adenovirut tái tổ hợp thu được từ kiểu huyết thanh 2 của adenovirut hoặc biến thể của kiểu huyết thanh 5 của adenovirut. Theo một số phương án, vật truyền là vật truyền lentivirut tái tổ hợp. Theo một số phương án, vật truyền lentivirut tái tổ hợp thu được từ lentivirut được tạo kiểu giả với virut gây viêm miệng có mụn nước (VSV), virut gây viêm màng não lympho bào (LCMV), virut sông Ross (RRV), virut Ebola, virut Marburg, virut Mokala, virut Rabies, RD114 hoặc các biến thể của chúng. Theo một số phương án, vật truyền là vật truyền rHSV. Theo một số phương án, vật truyền rHSV thu được từ rHSV-1 hoặc rHSV-2.

Theo một số phương án của các khía cạnh và phương án nêu trên, vật truyền là vật truyền rAAV. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện được kẹp bởi một hoặc nhiều trình tự đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR) của AAV. Theo một số phương án, cấu trúc biểu hiện được kẹp bởi hai ITR AAV. Theo các phương án nhất định, ITR AAV là AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, các ITR kiểu huyết thanh AAV của dê, AAV của bò, hoặc AAV của chuột. Theo các phương án nhất định, ITR AAV là ITR AAV2. Theo một số phương án, vật truyền còn chứa axit nucleic nhồi. Theo một số phương án, axit nucleic nhồi ở giữa vùng khởi động và axit nucleic mã hóa cho ARNi. Theo một số phương án, vật truyền là vật truyền rAAV tự bổ sung. Theo một số phương án, vật truyền có chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa cho ARNi và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa cho phần bổ sung của ARNi, trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trên cùng sợi với trình tự axit nucleic thứ hai dọc theo hầu hết hoặc toàn bộ chiều dài của nó. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic thứ nhất và trình tự axit nucleic thứ hai được liên kết bằng ITR AAV đột biến, trong đó ITR AAV đột biến có chứa đột biến làm khuyết của vùng D và có chứa đột biến của trình tự phân giải cuối. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào có chứa vật truyền bất kỳ trong số các vật truyền (*ví dụ như*, các vật truyền rAAV) được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án của các khía cạnh và phương án nêu trên, sáng chế đề xuất hạt virut có chứa vật truyền bất kỳ trong số các vật truyền được mô tả trong bản mô tả này, trong đó hạt virut là hạt AAV bọc vật truyền rAAV, hạt adenovirut bọc vật truyền adenovirut tái tổ

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

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt AAV tái tổ hợp có chứa vật truyền bất kỳ trong số các vật truyền rAAV được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, hạt virus AAV bao gồm AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV của dê, AAV1/AAV2 khảm, AAV của bò, hoặc capsit AAV của chuột capsit kiểu huyết thanh rAAV2/HBoV1. Theo một số phương án, ITR và capsit của hạt virus rAAV thu được từ cùng kiểu huyết thanh AAV. Theo một số phương án, ITR và capsit của hạt virus rAAV thu được từ các kiểu huyết thanh AAV khác nhau. Theo một số phương án, ITR thu được từ AAV2 và capsit của hạt rAAV thu được từ AAV1. Theo một số phương án, vật truyền rAAV có chứa từ 5' đến 3' là ITR AAV2, vùng khởi động, axit nucleic mã hóa cho ARNi, tín hiệu polyadenyl hóa, và ITR AAV2. Theo một số phương án, vùng khởi động là vùng khởi động CBA. Theo một số phương án, tín hiệu polyadenyl hóa là tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò. Theo một số phương án, vật truyền rAAV có chứa từ 5' đến 3' là ITR AAV2, vùng khởi động CBA, intron, axit nucleic mã hóa cho ARNi, tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò, và ITR AAV2. Theo một số phương án, vật truyền còn chứa

axit nucleic nhồi. Theo một số phương án, axit nucleic nhồi bao gồm axit nucleic mã hóa protein huỳnh quang màu xanh lá cây (GFP). Theo một số phương án, axit nucleic nhồi ở giữa vùng khởi động và axit nucleic mã hóa cho ARNi.

Theo một số phương án của phương pháp nêu trên, hạt virus (ví dụ như, hạt rAAV) ở trong hợp phần (ví dụ như, dược phẩm). Theo một số phương án, hợp phần còn chứa chất mang dược dụng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1A thể hiện trình tự ADN đối với Htt miARN 206 (SEQ ID NO:22) và Htt miARN 207 (SEQ ID NO:9). **Hình 1B** thể hiện bản đồ của ssAAV2/1miRHtt.de. **Hình 1C** thể hiện trình tự của sợi mã hóa của ssAAV2/1miRHtt.de (SEQ ID NO: 16) và sợi không mã hóa của ssAAV2/1miRHtt.de (SEQ ID NO:19).

Hình 2 thể hiện khả năng của Htt miARN 170XA, Htt miARN 206 và Htt miARN 207 để làm trung gian sự giảm Htt in vitro. Các giá trị đưa ra là giá trị trung bình $\pm$ SEM.

Hình 3A và Hình 3B thể hiện khả năng của AAV2/1-Htt miARN 206 và AAV2/1-Htt miARN 207 để làm trung gian sự giảm Htt như đo được bằng protein (**Hình 3A**) hoặc mRNA (**Hình 3B**). CTL-3 là đối chứng miARN không mã hóa. Các giá trị đưa ra là giá trị trung bình $\pm$ SEM. * chỉ ra sự khác biệt đáng kể so với chuột nhất CTL3, $p < 0,05$; ANOVA sau đó là kiểm định hậu kiểm Tukey.

Hình 4A và Hình 4B thể hiện khối lượng cơ thể (**Hình 4A**) và khối lượng não (**Hình 4B**) một tháng sau khi dùng AAV2/1-Htt miARN 206 và AAV2/1-Htt miARN 207. CTL-3 là đối chứng miARN không mã hóa. *Sự khác biệt đáng kể so với chuột nhất đối chứng CTL3, $p < 0,05$; ANOVA sau đó là kiểm định hậu kiểm Tukey.

Hình 5A-5D thể hiện Htt ở người được giảm đi đáng kể trong vùng vân của các con chuột nhất cùng lứa YAC128 được tiêm AAV2/1-miARN-Htt-207 và kiểu đại FVB. Hàm lượng protein Htt ở người được thể hiện trên **Hình 5A**. Hàm lượng protein HTT ở chuột nhất được thể hiện trên **Hình 5B**. Hàm lượng mRNA HTT ở người được thể hiện trên **Hình 5C**. Hàm lượng mRNA HTT ở chuột nhất được thể hiện trên **Hình 5D**.

Hình 6A và Hình 6B thể hiện rằng việc điều trị bằng AAV2/1-miARN-Htt-207 có thể điều chỉnh sự thiếu hụt phối hợp vận động ở chuột nhắt YAC128 như được xác định bằng thử nghiệm thanh quay (**Hình 6A**) và kiểu hình suy nhược ở chuột nhắt YAC128 như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bơi Porsolt (**Hình 6B**). Các con chuột nhắt là kiểu dại (WT còn được đề cập đến dưới dạng FVB) hoặc YAC128 (YAC) được điều trị bằng đối chứng ARN không mã hóa (CTL3) hoặc AAV2/1-miARN-Htt-207 (207). Hình 6 * chỉ ra sự thiếu hụt đáng kể ở chuột nhắt đối chứng miARN không mã hóa CTL3, $p < 0,05$; ANOVA sau đó là kiểm định hậu kiểm Tukey được so sánh với chuột nhắt kiểu dại, chuột nhắt kiểu dại được điều trị bằng AAV2/1-miARN-Htt-207, và chuột nhắt YAC128 được điều trị bằng AAV2/1-miARN-Htt-207.

Hình 7A và Hình 7B thể hiện khối lượng cơ thể (Hình 7A) và khối lượng não (Hình 7B) ba tháng sau lây nhiễm. Các con chuột nhắt là kiểu dại (WT) hoặc YAC128 (YAC) được điều trị bằng đối chứng ARN không mã hóa (CTL3) hoặc AAV2/1-miARN-Htt-207 (207).

Hình 8 thể hiện bản đồ của hệ gen vật truyền miRHtt 207 tự bổ sung. Vùng khởi động CMV enh/CBA là vùng khởi động của vùng tăng cường CMV/beta actin gà. Intron khảm Δ là intron khảm được rút ngắn. BGH là tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò. Δ ITR là ITR AAV thiếu trình tự phân giải ở đầu tận cùng.

Hình 9 thể hiện bản đồ của hệ gen vật truyền miRHtt 207 tự bổ sung thay thế. Vùng khởi động CBA là vùng khởi động beta actin gà. Intron khảm Δ là intron khảm được rút ngắn. BGH là tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất ARNi để điều trị bệnh Huntington, trong đó ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'-CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA-3' (SEQ ID NO:2), trong đó sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất ARNi để điều trị bệnh Huntington, trong đó ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'-UGCUUGUCAACCACACCGACU-

3' (SEQ ID NO:8), trong đó sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép. Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất các xét biểu hiện, vật truyền (ví dụ như, các vật truyền AAV tái tổ hợp, adenovirut, lentivirut, hoặc HSV), tế bào, hạt virut (ví dụ như, các hạt virut AAV, adenovirut, lentivirut, hoặc HSV), và được phẩm có chứa ARNi theo sáng chế. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh Huntington, ức chế biểu hiện của htt, và ức chế sự tích tụ của htt trong tế bào ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú được phẩm bao gồm ARNi theo sáng chế. Còn theo các khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất để sử dụng được phẩm bao gồm ARNi theo sáng chế để điều trị bệnh Huntington (ví dụ, cải thiện các triệu chứng của bệnh Huntington), ức chế biểu hiện của htt, hoặc ức chế sự tích tụ của htt trong tế bào ở động vật có vú mắc bệnh Huntington. Theo các khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất bộ kit để điều trị bệnh Huntington ở động vật có vú bao gồm ARNi theo sáng chế.

I. Các kỹ thuật chung

Các kỹ thuật và quy trình được mô tả hoặc được viện dẫn trong bản mô tả này nhìn chung đã được hiểu rõ và được áp dụng phổ biến bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng hệ phương pháp thông thường, như, ví dụ, các phương pháp được sử dụng rộng rãi được mô tả trong tài liệu *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al.* eds., 2003); loạt bài *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., 1995); *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow and Lane, eds., 1988); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley and Sons, 2010); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1996); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Current Protocols in*

Immunology (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., J. Wiley and Sons, 2002); *Immunobiology* (C.A. Janeway *et al.*, 2004); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); và *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 2011).

II. Định nghĩa

“Vật truyền,” như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ plasmit hoặc virus tái tổ hợp có chứa axit nucleic cần được chuyển vào tế bào chủ, trong ống nghiệm hoặc trong cơ thể.

Thuật ngữ "polynucleotit" hoặc "axit nucleic" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ dạng polyme của nucleotit có chiều dài bất kỳ, hoặc là ribonucleotit hoặc là deoxyribonucleotit. Do đó, thuật ngữ này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ADN hoặc ARN sợi đơn, sợi đôi hoặc đa sợi, ADN hệ gen, cADN, thể lai ADN-ARN, hoặc polyme có chứa bazơ purin và pyrimidin, hoặc các bazơ nucleotit tự nhiên, được cải biến về mặt hóa học hoặc hóa sinh, không tự nhiên, hoặc được tạo dẫn xuất khác. Khung polynucleotit có thể có chứa nhóm đường và phosphat (như có thể thường được tìm thấy trong ARN hoặc ADN), hoặc nhóm đường và phosphat được cải biến hoặc được thế. Theo cách khác, khung polynucleotit có thể có chứa polyme có các dưới đơn vị tổng hợp như phosphoramidat và do đó có thể là oligodeoxynucleosit phosphoramidat (P-NH₂) hoặc oligome phosphoramidat-phosphodiester hỗn hợp. Ngoài ra, polynucleotit cấu trúc kép có thể thu được từ sản phẩm polynucleotit sợi đơn của quá trình tổng hợp hóa học bằng cách tổng hợp sợi bổ sung và ủ các sợi này trong điều kiện thích hợp, hoặc bằng cách tổng hợp sợi bổ sung *de novo* bằng cách sử dụng ADN polymeraza với đoạn môi thích hợp.

Thuật ngữ "polypeptit" và "protein" được sử dụng thay thế lẫn nhau để chỉ polyme của các gốc axit amin, và không bị giới hạn ở chiều dài tối thiểu. Các polyme của các gốc axit amin như vậy có thể chứa các gốc axit amin tự nhiên hoặc không tự nhiên, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, peptit, oligopeptit, đime, trime, và multime của các gốc axit amin. Cả protein chiều dài đầy đủ và mảnh của nó đều được bao gồm bởi định nghĩa này. Thuật ngữ

này cũng bao gồm các cải biến sau khi biểu hiện của polypeptit, ví dụ, sự glycosyl hóa, sialyl hóa, axetyl hóa, phosphoryl hóa, và các cải biến tương tự. Ngoài ra, đối với các mục đích của sáng chế, "polypeptit" chỉ protein bao gồm các cải biến, như sự mất, sự thêm, và sự thể (thường là bảo toàn trong tự nhiên), đối với trình tự tự nhiên, với điều kiện là protein giữ được hoạt tính mong muốn. Các cải biến này có thể là chủ ý, như thông qua đột biến định hướng vị trí, hoặc có thể là ngẫu nhiên, như thông qua các đột biến của vật chủ sản xuất protein hoặc các lỗi do sự khuếch đại PCR.

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

"Vật truyền AAV tái tổ hợp (vật truyền rAAV)" dùng để chỉ vật truyền polynucleotit có chứa một hoặc nhiều trình tự khác loại (*tức là*, trình tự axit nucleic không có nguồn gốc từ AAV) mà được kẹp bởi ít nhất là một, và theo một số phương án hai, trình tự đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR) AAV. Các vật truyền rAAV như vậy có thể được sao chép và được đóng gói vào các hạt virus lây nhiễm khi có mặt trong tế bào chủ đã được lây nhiễm virus hỗ trợ thích hợp (hoặc tế bào chủ biểu hiện chức năng hỗ trợ thích hợp) và biểu hiện sản phẩm gen rep và cap AAV (*tức là* protein Rep và Cap AAV). Khi vật truyền rAAV được kết hợp vào polynucleotit lớn hơn (*ví dụ*, trong nhiễm sắc thể hoặc trong vật truyền khác như plasmid được sử dụng để tách dòng hoặc chuyển nhiễm), thì vật truyền rAAV có thể được gọi là "tiền vật truyền" mà có thể được "giải phóng" bởi sự sao chép và bao trong capsit với sự có mặt của chức năng đóng gói AAV và chức năng hỗ trợ thích hợp. Vật truyền rAAV có thể ở dạng bất kỳ trong một số dạng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, plasmid, nhiễm sắc thể nhân tạo mạch thẳng, được tạo phức hợp với lipit, được bao trong liposom, và được bao trong hạt virus, cụ thể là hạt AAV. Vật truyền rAAV có thể được đóng gói vào capsit virus AAV để tạo ra "hạt virus kết hợp adeno tái tổ hợp (hạt rAAV)".

"Vật truyền adenovirus tái tổ hợp" dùng để chỉ vật truyền polynucleotit bao gồm một hoặc nhiều trình tự khác loại (*tức là*, trình tự axit nucleic không có nguồn gốc adenovirus) mà được kẹp bởi ít nhất một trình tự đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR) của adenovirus. Theo một số phương án, axit nucleic tái tổ hợp được kẹp bởi hai trình tự đoạn lặp cuối ngược chiều

(ITR). Vật truyền virus tái tổ hợp này có thể được sao chép và được đóng gói vào hạt virus lây nhiễm khi có mặt trong tế bào chủ mà biểu hiện các gen adenovirus thiết yếu được làm khuyết từ hệ gen virus tái tổ hợp (*ví dụ như*, gen E1, gen E2, gen E4, v.v.). Khi vật truyền virus tái tổ hợp được kết hợp vào polynucleotit lớn hơn (*ví dụ*, trong nhiễm sắc thể hoặc trong vật truyền khác như plasmit được sử dụng để tách dòng hoặc chuyển nhiễm), thì vật truyền virus tái tổ hợp có thể được gọi là "tiền vật truyền" mà có thể được "giải phóng" bởi sự sao chép và bao trong capsit với sự có mặt của chức năng đóng gói adenovirus. Vật truyền virus tái tổ hợp có thể ở một dạng bất kỳ trong số nhiều dạng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, plasmit, nhiễm sắc thể nhân tạo mạch thẳng, được tạo phức với lipid, được bọc trong liposom, và được bao trong capsit trong hạt virus, ví dụ, hạt adenovirus. Vật truyền virus tái tổ hợp có thể được đóng gói vào capsit virus adenovirus để tạo ra "hạt adenovirus tái tổ hợp."

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

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

virut, ví dụ, hạt HSV. Vật truyền virut tái tổ hợp có thể được đóng gói vào capsit HSV để tạo ra "hạt virut herpes simplex tái tổ hợp."

"Khác loài" nghĩa là thu được từ thực thể khác biệt về mặt kiểu gen so với kiểu gen của phần còn lại của thực thể mà nó được so sánh với hoặc nó được đưa vào hoặc được kết hợp vào đó. Ví dụ, polynucleotit được đưa bởi kỹ thuật thiết kế di truyền vào loại tế bào khác là polynucleotit khác loại (và, khi được biểu hiện, có thể mã hóa polypeptit khác loại). Tương tự, trình tự tế bào (ví dụ, gen hoặc một phần của nó) được kết hợp vào vật truyền virut là trình tự nucleotit khác loại so với vật truyền này.

Thuật ngữ "gen chuyển" chỉ polynucleotit được đưa vào tế bào và có khả năng được phiên mã thành ARN và tùy ý, được dịch mã và/hoặc được biểu hiện trong điều kiện thích hợp. Theo một số khía cạnh, gen chuyển tạo ra tính chất mong muốn cho tế bào mà nó được đưa vào, hoặc theo cách khác dẫn đến kết quả chữa bệnh hoặc chẩn đoán mong muốn. Theo khía cạnh khác, nó có thể được phiên mã thành phân tử mà làm trung hòa sự can thiệp ARN, chẳng hạn như miARN, siARN, hoặc shARN.

"Vùng khởi động β -actin (CBA) ở gà" dùng để chỉ trình tự polynucleotit có nguồn gốc từ gen β -actin ở gà (ví dụ, *Gallus gallus* beta actin, được biểu diễn bởi GenBank Entrez Gene ID 396526). Như được sử dụng trong bản mô tả này, "vùng khởi động β -actin ở gà" có thể đề cập đến vùng khởi động có chứa yếu tố vùng tăng cường sớm virut cự bào (CMV), vùng khởi động và exon và intron thứ nhất của gen β -actin ở gà, và vật nhận ghép của gen beta-globin ở thỏ, như trình tự được mô tả trong Miyazaki, J. *et al.* (1989) *Gene* 79(2):269-77. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vùng khởi động CAG" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vùng tăng cường sớm CMV/vùng khởi động beta actin (CAG) ở gà" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau.

Thuật ngữ "hạt hệ gen (gp)," "thể tương đương hệ gen," hoặc "bản sao hệ gen" như được sử dụng liên quan đến độ chuẩn virut, đề cập đến số lượng virion chứa hệ gen ADN AAV tái tổ hợp, bất kể tính lây nhiễm hoặc chức năng. Số lượng của hạt hệ gen trong chế phẩm vật truyền cụ thể có thể được đo bằng quy trình chẳng hạn như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế trong bản mô tả này, hoặc ví dụ như, trong Clark *et al.* (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk *et al.* (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278.

Thuật ngữ "hệ gen vật truyền (vg)" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể dùng để chỉ một hoặc nhiều polynucleotit có chứa tập hợp của các trình tự polynucleotit của vật truyền, *ví dụ*, vật truyền virus. Hệ gen vật truyền có thể được bao trong capsit trong hạt virus. Tùy thuộc vào vật truyền virus cụ thể, hệ gen vật truyền có thể có chứa ADN sợi đơn, ADN sợi đôi, hoặc ARN sợi đơn, hoặc ARN sợi đôi. Hệ gen vật truyền có thể bao gồm các trình tự nội sinh kết hợp với vật truyền virus cụ thể và/hoặc trình tự khác loại bất kỳ được cài xen vào vật truyền virus cụ thể thông qua kỹ thuật tái tổ hợp. Ví dụ, hệ gen vật truyền AAV tái tổ hợp có thể bao gồm ít nhất là một trình tự ITR kẹp vùng khởi động, đoạn nhồi, trình tự được quan tâm (*ví dụ*, ARNi), và trình tự polyadenyl hóa. Hệ gen vật truyền hoàn chỉnh có thể bao gồm tập hợp hoàn chỉnh của các trình tự polynucleotit của vật truyền. Theo các phương án nhất định, độ chuẩn axit nucleic của vật truyền virus có thể được đo theo đơn vị vg/ml. Các phương pháp thích hợp để đo độ chuẩn này là đã biết trong lĩnh vực (*ví dụ*, PCR định lượng).

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

Các thuật ngữ "đơn vị lây nhiễm (iu)," "hạt lây nhiễm," hoặc "đơn vị sao chép," như dùng trong việc đề cập đến độ chuẩn virus, dùng để chỉ số lượng của hạt vật truyền AAV tái

tổ hợp lây nhiễm và có khả năng sao chép như đo được bằng thử nghiệm trung tâm lây nhiễm, còn được biết đến dưới dạng thử nghiệm trung tâm sao chép, như được mô tả, ví dụ như, trong McLaughlin *et al.* (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973.

Thuật ngữ "đơn vị tải nạp (tu)" như dùng trong việc đề cập đến độ chuẩn virus, dùng để chỉ số lượng của hạt vật truyền AAV tái tổ hợp lây nhiễm mà dẫn đến sự sản xuất của sản phẩm gen chuyển chức năng như đo được trong thử nghiệm chức năng chẳng hạn như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế trong bản mô tả này, hoặc ví dụ như, trong Xiao *et al.* (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124; hoặc trong Fisher *et al.* (1996) *J. Virol.*, 70:520-532 (thử nghiệm LFU).

Trình tự "đoạn lặp cuối ngược chiều" hoặc trình tự "ITR" là thuật ngữ đã được hiểu rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và chỉ trình tự tương đối ngắn được tìm thấy ở đầu tận cùng của hệ gen virus theo hướng ngược lại.

Trình tự "đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR) AAV", một thuật ngữ đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, là trình tự gồm khoảng 145 nucleotit có mặt ở cả hai đầu tận cùng của hệ gen AAV sợi đơn tự nhiên. 125 nucleotit ngoài cùng của ITR có thể có mặt trong một trong hai hướng, dẫn đến tính không đồng nhất giữa các hệ gen AAV khác nhau và giữa hai đầu của một hệ gen AAV. 125 nucleotit ngoài cùng này cũng chứa một vài vùng ngắn hơn tự bổ sung (được ký hiệu là vùng A, A', B, B', C, C' và D), cho phép xảy ra sự bắt cặp bazơ nội chuỗi trong phần này của ITR.

"Trình tự phân tách cuối" hoặc "trs" là trình tự trong vùng D của ITR AAV được phân cắt bởi protein rep AAV trong quá trình sao chép ADN virus. Trình tự phân tách cuối đột biến là chống lại sự phân cắt bởi protein rep AAV.

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

"Virus hỗ trợ" cho AAV dùng để chỉ virus cho phép AAV (là parvovirus khiếm khuyết) được sao chép và đóng gói bởi tế bào chủ. Virus hỗ trợ tạo ra "chức năng hỗ trợ" mà cho phép

sao chép AAV. Nhiều virus hỗ trợ này đã được xác định, bao gồm adenovirus, herpesvirus và, poxvirus như virus đậu mùa và baculovirus. Adenovirus bao gồm nhiều nhóm phụ khác nhau, mặc dù adenovirus typ 5 của nhóm phụ C (Ad5) được sử dụng phổ biến nhất. Nhiều adenovirus có nguồn gốc từ người, động vật có vú không phải người và chim là đã được biết đến và có sẵn ở các cơ quan lưu giữ như ATCC. Virus thuộc họ herpes, cũng có sẵn ở các cơ quan lưu giữ như ATCC, bao gồm, ví dụ, virus gây bệnh mụn giộp (HSV), virus Epstein-Barr (EBV), virus cự bào (CMV) và virus gây bệnh giả dại (PRV). Các ví dụ của chức năng hỗ trợ adenovirus cho sao chép AAV bao gồm chức năng E1A, chức năng E1B, chức năng E2A, chức năng VA và chức năng E4orf6. Baculovirus có sẵn ở các cơ quan lưu giữ bao gồm virus đa diện nhân *Autographa californica*.

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

"Tỷ lệ phần trăm (%) độ tương đồng trình tự" so với trình tự polypeptit hoặc axit nucleic tham chiếu được định nghĩa là phần trăm của các gốc axit amin hoặc nucleotit trong trình tự tương ứng giống với gốc axit amin hoặc nucleotit trong trình tự polypeptit hoặc axit nucleic tham chiếu, sau khi sắp xếp thẳng hàng các trình tự này và đưa vào các quãng cách, nếu cần, để đạt được phần trăm độ tương đồng trình tự tối đa, và không xem xét sự thay thế bảo toàn là một phần của độ tương đồng trình tự. Sự sắp xếp thẳng hàng để xác định tỷ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự axit amin hoặc axit nucleic có thể đạt được bằng nhiều cách thuộc kỹ năng trong lĩnh vực, ví dụ như, bằng cách sử dụng các chương trình phần mềm máy tính có sẵn công khai, ví dụ, các chương trình được mô tả trong tài liệu Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al*, eds, 1987), Supp. 30, phần 7.7.18, Bảng 7.7.1, và bao gồm phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Chương trình sắp thẳng hàng được ưu tiên là ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pennsylvania).

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các thông số thích hợp để xác định sự sắp xếp thẳng hàng, bao gồm thuật toán bất kỳ cần thiết để đạt được sự sắp xếp thẳng hàng tối đa trên toàn bộ chiều dài của các trình tự được so sánh. Đối với các mục đích trong bản mô tả này, % độ tương đồng trình tự axit amin của trình tự axit amin đã cho A so với trình tự axit amin đã cho B (mà theo cách khác có thể được diễn đạt là trình tự axit amin đã cho A có hoặc có chứa % độ tương đồng trình tự axit amin nhất định so với trình tự axit amin đã cho B) được tính như sau: 100 nhân với phân số X/Y , trong đó X là số lượng gốc axit amin được tính điểm là bất cặp tương đồng bởi chương trình sắp xếp thẳng hàng trình tự trong sự sắp xếp thẳng hàng của A và B theo chương trình đó, và trong đó Y là tổng số lượng gốc axit amin trong B. Cần phải hiểu rằng khi chiều dài của trình tự axit amin A không bằng chiều dài của trình tự axit amin B, % độ tương đồng trình tự axit amin của A so với B sẽ không bằng % độ tương đồng trình tự axit amin của B so với A. Cho các mục đích trong bản mô tả này, % độ tương đồng trình tự axit nucleic của trình tự axit nucleic C đã cho so với trình tự axit nucleic D đã cho (mà theo cách khác có thể diễn đạt là trình tự axit nucleic C đã cho có hoặc có chứa % độ tương đồng trình tự axit nucleic nhất định so với trình tự axit nucleic D đã cho) được tính như sau: 100 nhân với phân số W/Z , trong đó W là số lượng nucleotit được tính điểm là bất cặp tương đồng bởi chương trình sắp xếp thẳng hàng trình tự trong sự sắp xếp thẳng hàng C và D theo chương trình đó, và trong đó Z là tổng số lượng các nucleotit trong D. Cần phải hiểu rằng khi chiều dài của trình tự axit nucleic C không bằng chiều dài của trình tự axit nucleic D, % độ tương đồng trình tự axit nucleic của C so với D sẽ không bằng % độ tương đồng trình tự axit nucleic của D so với C.

Phân tử (ví dụ, axit nucleic hoặc protein) hoặc tế bào "được phân lập" nghĩa là nó được xác định và được tách riêng và/hoặc được thu hồi từ thành phần của môi trường tự nhiên của nó.

"Lượng có hiệu quả" là lượng đủ để tác dụng có lợi hoặc kết quả mong muốn, bao gồm kết quả lâm sàng (ví dụ, việc cải thiện triệu chứng, đạt được điểm cuối lâm sàng, và tương tự). Lượng hữu hiệu có thể được sử dụng trong một hoặc nhiều lần sử dụng. Đối với tình trạng bệnh, lượng hữu hiệu là lượng đủ để cải thiện, làm ổn định, hoặc làm chậm sự phát triển của bệnh.

“Cá thể” hoặc “đối tượng” là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật đã thuần hóa (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ, người và động vật linh trưởng không phải người như khỉ), thỏ, và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống). Theo các phương án nhất định nhất định, cá thể hoặc đối tượng là người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “điều trị” là phương pháp thu được kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn. Đối với mục đích của sáng chế này, các kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, làm giảm nhẹ các triệu chứng, làm giảm phạm vi của bệnh, làm ổn định (ví dụ, không xấu đi) tình trạng của bệnh, ngăn chặn sự lây lan (ví dụ, di căn) của bệnh, làm trễ hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc làm dịu tình trạng bệnh, và làm thuyên giảm (một phần hoặc toàn bộ), dù có thể phát hiện được hay không phát hiện được. “Điều trị” cũng có thể có nghĩa là kéo dài sự sống sót so với sự sống sót bình thường nếu không nhận được điều trị.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “điều trị dự phòng” dùng để chỉ việc điều trị, trong đó cá thể đã được biết là hoặc được nghi ngờ là có hoặc có nguy cơ có rối loạn nhưng không biểu hiện triệu chứng hoặc chỉ có các triệu chứng tối thiểu của rối loạn này. Cá thể trải qua điều trị dự phòng có thể được điều trị trước khi khởi phát các triệu chứng.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Việc viện dẫn đến "khoảng" giá trị hoặc thông số trong bản mô tả này bao gồm (và mô tả) các phương án nhằm vào *bản thân* giá trị hoặc thông số đó. Ví dụ, phần mô tả đề cập đến "khoảng X" bao gồm phần mô tả về "X."

Như được sử dụng trong bản mô tả này, dạng số ít bao gồm cả sự viện dẫn đến dạng số nhiều trừ khi có quy định khác.

Cần phải hiểu rằng các khía cạnh và phương án của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này bao gồm "có chứa," "gồm," và/hoặc "về cơ bản gồm" các khía cạnh và phương án.

III. ARNi

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất ARNi đã cải thiện nhắm đích htt ARN để điều trị bệnh Huntington. Theo một số phương án, ARNi là ARN ức chế nhỏ (siARN), microARN (miARN), hoặc ARN kẹp tóc nhỏ (shARN). ARN ức chế nhỏ hoặc can thiệp

(siARN) đã biết trong lĩnh vực là phân tử ARN sợi đôi có chiều dài khoảng 19-25 (ví dụ, 19-23) cặp bazơ mà tạo ra ARNi trong tế bào. ARN kẹp tóc nhỏ (shARN) đã biết trong lĩnh vực là phân tử ARN bao gồm khoảng 19-25 (ví dụ, 19-23) cặp bazơ của ARN sợi đôi được liên kết bởi vòng ngắn (ví dụ, ~4-11 nucleotit) mà cảm ứng ARNi trong tế bào. Theo một số phương án, ARNi có chứa sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép; b) sợi thứ nhất có chứa vùng dẫn, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1) hoặc 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7); và c) sợi thứ hai có chứa vùng không dẫn. Theo một số phương án, vùng dẫn nucleic có chứa trình tự axit nucleic 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1) và vùng không dẫn có chứa trình tự 5'-CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA-3' (SEQ ID NO:2). Theo phương án khác, vùng dẫn nucleic có chứa trình tự axit nucleic 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7) và vùng không dẫn có chứa trình tự 5'-UGCUUGUCAACCACACCGACU-3' (SEQ ID NO:8).

Theo một số phương án, sợi thứ nhất có chứa vùng dẫn, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% đối với 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1). Theo một số phương án, sợi thứ nhất có chứa vùng dẫn, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% đối với 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1) nhưng duy trì ít nhất là một mô típ CpG. Theo một số phương án, sợi thứ nhất có chứa vùng dẫn, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% đối với 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7). Theo một số phương án, sợi thứ nhất có chứa vùng dẫn, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% đối với 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7) nhưng duy trì ít nhất là một mô típ CpG. Theo một số phương án, sợi thứ hai có chứa vùng không dẫn, trong đó vùng không dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% đối với 5'-CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA-3' (SEQ ID NO:2). Theo một số phương án, sợi thứ hai có chứa vùng không dẫn, trong đó vùng không

dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% đối với 5'- CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA-3' (SEQ ID NO:2) nhưng duy trì ít nhất là một mô típ CpG. Theo một số phương án, sợi thứ hai có chứa vùng không dẫn, trong đó vùng không dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% đối với 5'- UGCUUGUCAACCACACCGACU-3' (SEQ ID NO:8). Theo một số phương án, sợi thứ hai có chứa vùng không dẫn, trong đó vùng không dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% đối với 5'- UGCUUGUCAACCACACCGACU-3' (SEQ ID NO:8) nhưng duy trì ít nhất là một mô típ CpG.

Theo một số phương án, ARNi có chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO:4. Theo một số phương án, ARNi có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% đối với SEQ ID NO:4. Theo một số phương án, ARNi có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% đối với SEQ ID NO:4 nhưng duy trì ít nhất là một trình tự (*ví dụ như*, trong trình tự mầm). Theo một số phương án, ARNi là miARN-207. Theo phương án khác, ARNi là miARN-206.

Theo một số phương án, ARNi có chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO:10. Theo một số phương án, ARNi có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% đối với SEQ ID NO:10. Theo một số phương án, ARNi có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% đối với SEQ ID NO:10 nhưng duy trì ít nhất là một trình tự CpG (*ví dụ như*, trong trình tự mầm). Theo một số phương án, ARNi là miARN-207. Theo một số phương án, ARNi là miARN-206.

microARN (miARN) đã biết trong lĩnh vực là phân tử ARN mà bao gồm ARNi trong tế bào bao gồm trình tự ngắn (*ví dụ*, 19-25 cặp bazơ) của ARN sợi đôi được liên kết bởi vòng và chứa một hoặc nhiều trình tự bổ sung của ARN sợi đôi bao gồm một hoặc nhiều phần lồi (*ví dụ*, cặp bazơ bắt cặp sai hoặc không bắt cặp). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "miARN" bao hàm miARN nội sinh cũng như miARN ngoại sinh hoặc khác loại. Theo một số phương án, "miARN" có thể đề cập đến pri-miARN hoặc pre-miARN. Trong

quá trình xử lý miARN, bản mã pri-miARN được tạo ra. pri-miARN được xử lý bằng Drosha-DGCR8 để tạo ra pre-miARN bằng cách nhắm một hoặc nhiều trình tự để phân cắt pre-miARN với vùng vùng hai bên 5', sợi dẫn, vùng vòng, vùng không dẫn, và vùng hai bên 3'; hoặc vùng hai bên 5', vùng không dẫn, vùng vòng, sợi dẫn, và vùng hai bên 3'. Sau đó pre-miARN được xuất đến tế bào chất và được xử lý bằng Dicer để tạo ra siARN với sợi dẫn và sợi không dẫn (hoặc đi kèm). Sau đó sợi dẫn được sử dụng bởi phức RISC để xúc tác làm câm gen, *ví dụ*, bằng cách nhận diện trình tự ARN đích bổ sung cho sợi dẫn. Mô tả thêm của các miARN có thể tìm thấy, *ví dụ*, trong WO 2008/150897. Sự nhận diện của trình tự đích bằng miARN được xác định chủ yếu bằng việc bắt cặp giữa đích và trình tự mầm miARN, *ví dụ như*, các nucleotit 1-8 (từ 5' đến 3') của sợi dẫn (xem, *ví dụ như*, Boudreau, R.L. *et al.* (2013) *Nucleic Acids Res.* 41:e9).

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

Trong quá trình xử lý miARN, miARN được phân cắt ở vị trí phân cắt liền kề với giao diện sợi dẫn:sợi không dẫn, do đó giải phóng cấu trúc kép siARN của sợi dẫn và sợi không dẫn. Theo một số phương án, miARN bao gồm phần lồi trong sợi có nghĩa hoặc đối nghĩa liền kề với vị trí phân cắt. Nói theo cách khác, theo một số phương án, miARN bao gồm phần lồi trong sợi dẫn hoặc sợi không dẫn liền kề với trình tự mầm. Xem **Hình 1A**.

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

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

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

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

Theo một số phương án, vùng không dẫn bao gồm trình tự lõi đối diện với bất kỳ một hoặc nhiều trong số các bazơ 1-N của vùng dẫn trong cấu trúc kép. Theo một số phương án, $N=7$ và phần lõi đối diện bazơ 1, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc 7 của vùng dẫn. Theo các phương án khác, $N=8$ và phần lõi đối diện bazơ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 hoặc 8 của vùng dẫn.

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

Theo một số phương án, ARNi có chứa sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó a) sợi thứ nhất và thứ hai tạo thành cấu trúc kép, b) sợi thứ nhất bao gồm vùng dẫn có ít nhất 9 bazơ,

trong đó vùng dẫn bao gồm vùng mầm bao gồm bazơ 2-7 hoặc 2-8 của sợi dẫn, và c) sợi thứ hai bao gồm vùng không dẫn có ít nhất 9 bazơ, trong đó vùng không dẫn bao gồm trình tự lồi đối diện với bazơ 1 của vùng dẫn trong cấu trúc kép.

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

Tính an toàn của liệu pháp trên cơ sở ARNi có thể đảm bảo bởi khả năng của ARN ức chế nhỏ (các siARN) liên kết với các mARN không định trước và làm giảm biểu hiện của chúng, tác động được biết là làm câm gen ngoài đích. Ngoài đích thường xảy ra khi vùng mầm (các nucleotit 2-8 của ARN nhỏ) bắt cặp với các trình tự trong các 3'-UTR của các mARN không mong muốn và trực tiếp ngăn cản và làm mất ổn định dịch mã của các bản mã đó. ARNi ngoài đích giảm có thể được thiết kế bằng cách thế bazơ trong các trình tự dẫn và trình tự không dẫn; *ví dụ*, bằng cách tạo ra mô típ CpG. Việc thế tiềm năng mà có thể tạo ra điểm ngoài đích thấp hơn đáng kể có thể được đánh giá bằng cách sử dụng thuật toán SiSPOTR, thuật toán thiết kế siARN tập trung đặc trưng mà xác định các trình tự ứng viên với các tiềm năng ngoài đích tối thiểu và khả năng làm câm tiềm năng (Boudreau *et al*, *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan; 41(1) e9. Điểm SiSPOTR giảm dự báo trình tự mà có điểm ngoài đích tiềm năng ở người thấp hơn so với phân tử ARNi bố mẹ. Theo một số phương án của sáng chế, ARNi được cải thiện để làm giảm câm gen ngoài đích. Theo một số phương án, ARNi có chứa một hoặc nhiều mô típ CpG. Theo một số phương án, ARNi có chứa một hoặc nhiều mô típ CpG trong vùng mầm.

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

tự A và C bổ sung hoặc bổ sung một phần sao cho chúng bắt cặp bazơ với nhau, nhưng các bazơ trong trình tự B không bắt cặp bazơ với nhau.

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

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

IV. Bệnh Huntington và mô hình thử nghiệm của nó

Bệnh Huntington (HD) là bệnh thoái hóa thần kinh di truyền gây ra do sự mở rộng phần lặp CAG trong exon 1 của gen huntingtin (HTT). Sự kéo dài thu được của dải polyglutamin trong vùng đầu tận cùng N mang lại chức năng tạo độc cho protein huntingtin đột biến (mHtt). Sự gây độc mHtt có thể phát sinh từ sự tạo thành của khối kết tập chứa mHtt không tan, rối loạn phiên mã, và nhiễu loạn nội cân bằng protein, tất cả chúng có thể dẫn đến chết dây thần kinh (Saudou *et al.* (1998) *Cell*, 95:55-66; Zuccato *et al.* (2003) *Nat. Genet.* 35:76-83; Schaffar *et al.* (2004) *Mol. Cell.* 15:95-105; Benn *et al.*, (2008) *J. Neurosci.* 28:10720-10733). Phát hiện bệnh lý ở bệnh nhân mắc HD bao gồm làm mỏng vỏ não và mất tiến triển phát động của neuron vận (Rosas *et al.*, (2002) *Neurology* 58:695-701). Khởi phát bệnh thường xảy ra trong khoảng thập kỷ thứ ba hoặc thứ tư của cuộc đời; các triệu chứng

bao gồm chuyển động múa giật, phối hợp suy yếu, phối hợp tăng dần, và mất cân bằng tâm thần khác (Vonsattel *et al.*, (1985) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44:559-577). Trong hầu hết các trường hợp, các triệu chứng bắt đầu xuất hiện ở độ tuổi từ 30 đến 40 với sự phát vỡ nhẹ về kỹ năng vận động, nhận thức, và tính cách. Qua thời gian, chúng tiến triển thành chuyển động giật, không kiểm soát được và mất kiểm soát cơ, chứng mất trí, và bệnh tâm thần như chứng trầm cảm, gây hấn, lo sợ, và hành vi tự ám ảnh. Thường bị chết 10-15 năm sau khi khởi phát triệu chứng. Ít hơn 10% trường hợp HD liên quan đến dạng khởi phát bệnh thiếu niên, khác biệt ở chỗ tiến triển bệnh nhanh hơn. Hiện rằng khoảng 1 trong 10.000 người Mỹ mắc HD.

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

Hầu hết các trường hợp HD liên quan đến việc mở rộng phân lặp trinucleotit CAG trong gen *HTT*. Số lượng phân lặp CAG trong gen *HTT* liên quan mạnh đến sự thể hiện của HD. Ví dụ, cá thể có 35 hoặc ít hơn phân lặp thường không phát triển HD, nhưng cá thể có từ 27 đến 35 phân lặp có nguy cơ cao là có con mắc. Cá thể có từ 36 đến 40-42 phân lặp có sự xâm nhập HD không đầy đủ, trong khi đó cá thể có nhiều hơn 40-42 phân lặp thể hiện xâm nhập đầy đủ. Các trường hợp HD khởi phát từ thiếu niên có thể liên quan đến kích thước phân lặp CAG bằng 60 hoặc hơn.

Protein Htt mở rộng polyQ tạo ra từ việc mở rộng phân lặp CAG này liên quan đến các tập hợp gen hoặc thể vùi, nhiễu loạn nội cân bằng protein, và rối loạn phiên mã. Mặc dù các kiểu hình gây độc này có thể được tìm thấy trong toàn bộ cơ thể, chúng thường có liên quan nhất đến sự chết tế bào thần kinh trong CNS. Bệnh nhân HD thường thấy là mỏng vỏ não và mất tiến triển vận động của neuron vận. Vùng vận dưỡng như là vùng dễ tổn thương nhất của não trong HD (cụ thể là neuron gai trung gian vùng vận), với tác dụng sớm được thấy trong hạch và nhân đuôi. Chết tế bào ở neuron gai vận, tăng số lượng tế bào hình sao, và hoạt hóa tiểu thần kinh đệm được thấy trong não của bệnh nhân HD. HD còn có thể tác động một số vùng trong số cá ngựa, vỏ não, đồi não, vùng dưới đồi, và tiểu não.

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

Để phá hỏng các mô tiềm năng này với ASO, sử dụng biểu hiện được trung gian AAV của ARNi (ví dụ, siARN), mà tạo ra khả năng tăng an toàn, tăng hiệu quả, và hiệu quả kéo dài, có thể có lợi. Do bệnh nhân HD biểu hiện cả các alen Htt đột biến và kiểu đại, đa số trình tự nhắm đích siARN sẽ có thể suy thoái cả hai alen. Tuy nhiên, việc làm câm Htt không đặc hiệu alen trong chuột HD được thể hiện là được dung chịu tốt và có thể tạo ra cùng lợi ích như việc chỉ làm giảm Htt đột biến (Boudreau *et al.*, (2009b) *Mol. Ther.* 17:1053-1063; Drouet *et al.*, (2009) *Ann. Neurol.* 65:276-285; Kordasiewicz *et al.*, (2012) *Neuron* 74(6):1031-1044). Tuy nhiên, sự kìm hãm một phần và duy trì của Htt kiểu đại trong hạch của động vật linh trưởng không phải người sau ARNi được trung gian AAV không báo cáo có bất kỳ tác động ngược, đề xuất rằng não người trưởng thành có thể chịu mức giảm Htt kiểu đại (McBride *et al.*, (2011) *Mol. Ther.* 19:2152-2162; Grondin *et al.*, (2012) *Brain* 135:1197-1209).

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

kể và rộng rãi của khối kết tụ Htt trong vùng vân vào 12 tháng tuổi (Slow *et al.*, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567, Pouladi *et al.*, (2012) *Hum. Mol. Genet.* 21:2219-2232).

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

V. Phương pháp điều trị bệnh Huntington

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

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp và hợp phần để cải thiện triệu chứng của HD, bao gồm cho dùng lượng có hiệu quả của hạt virus tái tổ hợp bao gồm vật truyền mã hóa cho ARNi theo sáng chế cho não của động vật có vú. Theo một số phương án, các triệu chứng của HD bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, múa giật, cứng nhắc, mất kiểm soát cử động cơ thể, mất kiểm soát cơ, thiếu sự phối hợp, hiếu động, cử động mắt chậm, điệu bộ bất thường, không ổn định, dáng đi loạn choạng, biểu hiện nét mặt không bình thường, có vấn đề về tiếng nói, khó nhai và/hoặc nuốt, rối loạn giấc ngủ, cơn tai biến ngập máu, chứng mất trí, sự thiếu hụt nhận thức (ví dụ, các khả năng liên quan đến lập kế hoạch, suy nghĩ tóm tắt, sự linh hoạt, sự tuân thủ quy tắc, sự nhạy cảm giữa các cá nhân, sự tự kiểm soát, sự chú ý, học tập, và ghi nhớ), chứng trầm cảm, chứng lo âu, sự thay đổi tính cách, sự gây sự, hành

vi ám ảnh, hành vi ám ảnh cưỡng chế, bị ám ảnh tình dục, chứng rối loạn tâm thần, tính lãnh đạm, tính dễ bị kích thích, có ý nghĩ tự sát, sụt cân, teo thần kinh cơ, suy tim, độ dung chịu glucoza giảm, teo tinh hoàn, và loãng xương.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc làm chậm sự tiến triển của HD. HD trội nhiễm sắc thể thường là bệnh di truyền mà có thể được xác định kiểu gen. Ví dụ, số lượng đoạn lặp CAG trong *HTT* có thể được xác định bằng phương pháp định cỡ đoạn lặp trên cơ sở PCR. Kiểu chẩn đoán này có thể được thực hiện ở giai đoạn bất kỳ của cuộc đời thông qua thử nghiệm trực tiếp thanh thiếu niên hoặc người trưởng thành (ví dụ, có xuất hiện các triệu chứng lâm sàng), sàng lọc trước sinh hoặc thử nghiệm loại trừ trước sinh (ví dụ, bằng cách lấy mẫu lông nhung màng đệm hoặc chọc ối), hoặc sàng lọc phôi trước cấy ghép. Như vậy, phương pháp được mô tả ở đây có thể được sử dụng để xử lý phòng bệnh HD vì chẩn đoán có thể xảy ra trước khi khởi phát triệu chứng. Ví dụ như, HD có thể được chẩn đoán bằng cách thử nghiệm di truyền (thử nghiệm trước sinh, thử nghiệm vào lúc sinh, v.v.) và được điều trị để phòng ngừa (ví dụ như, bằng cách sử dụng hạt rAAV được mô tả trong bản mô tả này) trước khi khởi phát triệu chứng (ví dụ như, sự mất tế bào CNS) để ngăn ngừa sự khởi phát và/hoặc sự tiến triển triệu chứng HD. Bệnh nhân HD có thể thể hiện sự co của nhân đuôi và/hoặc hạch và/hoặc vỏ não và/hoặc tâm thất mở rộng như thấy được bằng cách chụp ảnh não. Các triệu chứng này, kết hợp với tiền sử gia đình của HD và/hoặc các triệu chứng lâm sàng, có thể biểu thị HD.

Phương thức xác định sự cải thiện của các triệu chứng của HD là đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, Thang Phân Loại bệnh Huntington Hợp Nhất (UHDRS) có thể được sử dụng để đánh giá chức năng vận động, chức năng nhận thức, hành vi bất thường, và khả năng thực hiện chức năng (xem tài liệu, ví dụ, Huntington Study Group (1996) *Movement Disorders* 11:136-42). Thang phân loại này được phát triển để tạo ra thử nghiệm toàn diện, đồng đều đối với nhiều mặt của bệnh lý học, kết hợp các yếu tố từ các thử nghiệm chẳng hạn như Thang Cuộc Sống Hàng Ngày và Hoạt Động HD, thang mức độ trầm trọng của chứng múa giật Marsden và Quinn, thang Mức Độ Độc Lập và Tàn Phế Cơ Thể, thang phân loại vận động HD (HDMRS), thang khả năng thực hiện chức năng HD (HDFCS), và đánh giá thần kinh định lượng (QNE). Các thử nghiệm hữu dụng khác để xác định sự cải thiện của các triệu chứng HD có thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở Đánh Giá Nhận Thức Montreal, chụp

ảnh não (*ví dụ*, MRI), Thử Nghiệm Phân Loại Mức Độ Lưu Loát, Thử Nghiệm Tạo Vết, Tra Cứu Bản Đồ, Thử Nghiệm Đọc Từ Stroop, Nhiệm Vụ Gõ Nhẹ Tăng Tốc, và Thử Nghiệm Thẻ Thức Chữ Số Ký Hiệu.

Theo một số khía cạnh của sáng chế, các phương pháp và hợp phần được sử dụng để điều trị cho người mắc HD. Như được mô tả ở trên, HD được di truyền theo phương thức trội nhiễm sắc thể thường và gây ra bởi sự mở rộng đoạn lặp CAG trong gen *HTT*. HD khởi phát ở thiếu niên được di truyền nhiều nhất từ phía bố mẹ. Kiểu hình giống bệnh Huntington cũng tương quan với các locut di truyền khác, chẳng hạn như *HDL1*, *PRNP*, *HDL2*, *HDL3*, và *HDL4*. Người ta cho rằng các locut di truyền khác có thể cải biến sự biểu lộ của các triệu chứng HD, bao gồm các đột biến ở các gen *GRIN2A*, *GRIN2B*, *MSX1*, *GRIK2*, và *APOE*.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất ARNi cải tiến để nhắm đích mARN Htt ở động vật có vú mắc bệnh Huntington. Theo một số phương án, ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'-CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA-3' (SEQ ID NO:2). ARNi được mô tả ở đây (*ví dụ*, là một phần của vật truyền rAAV) có thể thấy được sử dụng, *không kể những cái khác*, trong điều trị bệnh Huntington.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất ARNi cải tiến để nhắm đích mARN Htt ở động vật có vú mắc bệnh Huntington. Theo một số phương án, ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'-UGCUUGUCAACCACACCGACU-3' (SEQ ID NO:8). ARNi được mô tả trong bản mô tả này (*ví dụ như*, là một phần của vật truyền rAAV) có thể được sử dụng, *không kể những cái khác*, trong việc điều trị bệnh Huntington.

Theo một số phương án của sáng chế, ARNi được cải thiện để làm giảm cân gen ngoài đích. Theo một số phương án, ARNi có chứa một hoặc nhiều mô tip CpG. Theo một số phương án, ARNi có chứa một hoặc nhiều mô tip CpG trong vùng mầm.

Theo một số phương án, sợi thứ nhất có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc

99% đối với SEQ ID NO:1 nhưng duy trì mô típ CpG. Theo một số phương án, sợi thứ hai có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với SEQ ID NO:2 nhưng duy trì mô típ CpG.

Theo một số phương án, sợi thứ nhất có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với SEQ ID NO:7 nhưng duy trì mô típ CpG. Theo một số phương án, sợi thứ hai có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng lớn hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với SEQ ID NO:8 nhưng duy trì mô típ CpG.

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

Theo một số phương án, miARN bao gồm trình tự dẫn mà có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, miARN bao gồm trình tự dẫn mà có khoảng giá trị bất kỳ trong số 90% tương đồng, 91% tương đồng, 92% tương đồng, 93% tương đồng, 94% tương đồng, 95% tương đồng, 96% tương đồng, 97% tương đồng, 98% tương đồng, 99% tương đồng, hoặc 100% tương đồng với SEQ ID NO:1.

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

Theo một số phương án, miARN bao gồm trình tự dẫn mà có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:7. Theo một số phương án, miARN bao gồm trình tự dẫn mà có khoảng giá trị bất kỳ trong số 90% tương đồng, 91% tương đồng, 92% tương đồng, 93% tương đồng,

94% tương đồng, 95% tương đồng, 96% tương đồng, 97% tương đồng, 98% tương đồng, 99% tương đồng, hoặc 100% tương đồng với SEQ ID NO:7.

Theo một số phương án, miARN bao gồm trình tự không dẫn mà có khoảng 90% tương đồng với SEQ ID NO:8. Theo một số phương án, miARN bao gồm trình tự không dẫn mà có khoảng giá trị bất kỳ trong số 90% tương đồng, 91% tương đồng, 92% tương đồng, 93% tương đồng, 94% tương đồng, 95% tương đồng, 96% tương đồng, 97% tương đồng, 98% tương đồng, 99% tương đồng, hoặc 100% tương đồng với SEQ ID NO:8.

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

Theo một số phương án, ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng có chứa từ 4 đến 50 nucleotit. Theo các phương án nhất định, ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng bao gồm 13 nucleotit. Theo phương án nhất định, ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng có chứa trình tự nucleotit GUUUUGGCCACUGACUGAC (SEQ ID NO:13). Theo một số phương án, hệ gen vật truyền có chứa trình tự nucleotit mà tương đồng ít nhất là khoảng giá trị bất kỳ trong số 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đối với trình tự SEQ ID NO:13.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp có chứa việc dùng cho động vật có vú (ví dụ như, động vật có vú mắc HD) ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'-CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA-3' (SEQ ID NO:2). Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp có chứa ARNi. Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp là hạt AAV bọc vật truyền rAAV, hạt adenovirus bọc vật truyền adenovirus tái tổ hợp, hạt lentivirus bọc vật truyền lentivirus tái tổ hợp hoặc hạt HSV bọc vật truyền HSV tái tổ hợp trong đó vật truyền rAAV, vật truyền adenovirus, vật truyền lentivirus hoặc vật truyền HSV mã hóa cho ARNi.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp có chứa việc dùng cho động vật có vú (ví dụ như, động vật có vú mắc HD) ARNi có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'- UGCUUGUCAACCACACCGACU-3' (SEQ ID NO:8). Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp có chứa ARNi. Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp là hạt AAV bọc vật truyền rAAV, hạt adenovirus bọc vật truyền adenovirus tái tổ hợp, hạt lentivirus bọc vật truyền lentivirus tái tổ hợp hoặc hạt HSV bọc vật truyền HSV tái tổ hợp trong đó vật truyền rAAV, vật truyền adenovirus, vật truyền lentivirus hoặc vật truyền HSV mã hóa cho ARNi.

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

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

(ví dụ, của ARNi theo sáng chế) có thể chịu tốt (ví dụ, tạo ra một vài hoặc không có tác dụng phụ không mong muốn).

Theo một số phương án, tế bào có chứa vật truyền (ví dụ, vật truyền có chứa cấu trúc biểu hiện mã hóa cho ARNi theo sáng chế). Theo một số phương án, vật truyền là vật truyền rAAV. Theo một số phương án, vật truyền là vật truyền adenovirus tái tổ hợp, vật truyền lentivirus tái tổ hợp hoặc vật truyền virus herpes simplex (HSV) tái tổ hợp. Theo một số phương án, tế bào là tế bào của hệ thần kinh trung ương (CNS).

Theo một số phương án, việc cho dùng lượng có hiệu quả của hạt virus tái tổ hợp bao gồm vật truyền mã hóa cho ARNi theo sáng chế chuyển đổi các neuron (ví dụ, neuron vận, như neuron gai) ở hoặc gần vị trí cho dùng. Theo một số phương án, lớn hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% hoặc 100% của các neuron được tải nạp. Theo một số phương án, từ khoảng 5% đến khoảng 100%, từ khoảng 10% đến khoảng 50%, từ khoảng 10% đến khoảng 30%, từ khoảng 25% đến khoảng 75%, từ khoảng 25% đến khoảng 50%, hoặc khoảng 30% đến khoảng 50% của neuron được chuyển nạp. Phương pháp để xác định các neuron được chuyển nạp bởi hạt virus tái tổ hợp biểu hiện miARN là đã biết trong lĩnh vực; ví dụ, hóa mô miễn dịch, dò ARN (ví dụ, qPCR, kỹ thuật thâm tách Northern, phương pháp giải trình tự ARN (ARN-seq), phương pháp lai tại chỗ, và tương tự) hoặc việc sử dụng chất đánh dấu đồng biểu hiện như protein huỳnh quang màu xanh lá cây cải tiến có thể được sử dụng để phát hiện sự biểu hiện.

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp bao gồm việc dùng vào não của động vật có vú lượng có hiệu quả của hạt virus tái tổ hợp bao gồm vật truyền mã hóa cho ARNi theo sáng chế để điều trị động vật có vú, ví dụ, người, mắc HD. Theo một số phương án, được phẩm được tiêm vào một hoặc nhiều vị trí trong não để cho phép biểu hiện ARNi theo sáng chế trong ít nhất là các neuron. Theo một số phương án, được phẩm được tiêm vào vị trí bất kỳ trong số một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười hoặc nhiều hơn mười vị trí trong não. Theo một số phương án, được phẩm được tiêm vào thể vân. Theo một số phương án, được phẩm được tiêm vào thể vân lưng. Theo một số phương án, được phẩm được tiêm vào hạch. Theo một số phương án, được phẩm được tiêm vào nhân đuôi. Theo một số phương án, được phẩm được tiêm vào hạch và vào nhân đuôi.

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

Theo một số phương án hạt virus tái tổ hợp được cho dùng vào nhiều hơn một vị trí đồng thời hoặc liên tục. Theo một số phương án, nhiều mũi tiêm của hạt virus tái tổ hợp cách nhau không lâu hơn một giờ, hai giờ, ba giờ, bốn giờ, năm giờ, sáu giờ, chín giờ, mười hai giờ hoặc 24 giờ.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị người mắc HD bằng cách cho dùng lượng có hiệu quả của dược phẩm bao gồm vật truyền virus tái tổ hợp mã hóa cho ARNi theo sáng chế để chặn hoạt tính của *HTT* đột biến. Theo một số phương án, dược phẩm có chứa một hoặc nhiều tá dược được dùng.

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

trong số 5×10^9 đến 10×10^9 , 10×10^9 đến 15×10^9 , 15×10^9 đến 25×10^9 , hoặc 25×10^9 đến 50×10^9 đơn vị tải nạp /ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virus của hạt virus (ví dụ như, hạt rAAV) ít nhất là bất kỳ trong số khoảng 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 10×10^{10} , 11×10^{10} , 15×10^{10} , 20×10^{10} , 25×10^{10} , 30×10^{10} , 40×10^{10} , hoặc 50×10^{10} đơn vị lây nhiễm/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virus của hạt virus (ví dụ như, hạt rAAV) ít nhất là bất kỳ trong số khoảng 5×10^{10} đến 6×10^{10} , 6×10^{10} đến 7×10^{10} , 7×10^{10} đến 8×10^{10} , 8×10^{10} đến 9×10^{10} , 9×10^{10} đến 10×10^{10} , 10×10^{10} đến 11×10^{10} , 11×10^{10} đến 15×10^{10} , 15×10^{10} đến 20×10^{10} , 20×10^{10} đến 25×10^{10} , 25×10^{10} đến 30×10^{10} , 30×10^{10} đến 40×10^{10} , 40×10^{10} đến 50×10^{10} , hoặc 50×10^{10} đến 100×10^{10} đơn vị lây nhiễm/ml. Theo một số phương án, độ chuẩn virus của hạt virus (ví dụ như, hạt rAAV) ít nhất là bất kỳ trong số khoảng 5×10^{10} đến 10×10^{10} , 10×10^{10} đến 15×10^{10} , 15×10^{10} đến 25×10^{10} , hoặc 25×10^{10} đến 50×10^{10} đơn vị lây nhiễm/ml.

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

Theo một số phương án, tổng hàm lượng của hạt virus được sử dụng cho cá thể ít nhất là khoảng giá trị bất kỳ trong số 1×10^9 đến khoảng 1×10^{14} bản sao hệ gen. Theo một số phương án, tổng lượng của hạt virus được sử dụng cho cá thể là khoảng giá trị bất kỳ trong số 1×10^9 đến khoảng 1×10^{14} bản sao hệ gen.

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

Theo một số phương án, thể tích thứ nhất của dược phẩm được tiêm vào vùng thứ nhất của não, và thể tích thứ hai của dược phẩm được tiêm vào vùng thứ hai của não. Ví dụ, theo một số phương án, thể tích thứ nhất của dược phẩm được tiêm vào nhân đuôi, và thể tích thứ hai của dược phẩm được tiêm vào hạch. Theo một số phương án, thể tích 1X của dược phẩm được tiêm vào nhân đuôi, và thể tích 1,5X, 2X, 2,5X, 3X, 3,5X, hoặc 4X của dược phẩm được tiêm vào hạch, trong đó X là thể tích mà lớn hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 1 μ l, 2 μ l, 3

μl , 4 μl , 5 μl , 6 μl , 7 μl , 8 μl , 9 μl , 10 μl , 15 μl , 20 μl , 25 μl , 50 μl , 75 μl , 100 μl , 200 μl , 300 μl , 400 μl , 500 μl , 600 μl , 700 μl , 800 μl , 900 μl , hoặc 1 ml, hoặc lượng bất kỳ giữa chúng.

Hợp phần theo sáng chế (ví dụ, hạt virus tái tổ hợp bao gồm vật truyền mã hóa cho ARNi theo sáng chế) có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân trị bệnh bổ sung để điều trị HD. Khoảng thời gian giữa các lần sử dụng liên tiếp có thể ít nhất là (hoặc, theo cách khác, ít hơn) vài phút, vài giờ, hoặc vài ngày.

V. Cấu trúc và vật truyền biểu hiện ARNi

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

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

Theo một số phương án, ARNi nhắm đích vào ARN mã hóa cho polypeptit liên quan đến bệnh Huntington (ví dụ như, *HTT* đột biến). Không mong muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, người ta cho rằng ARNi có thể được sử dụng để làm giảm hoặc triệt tiêu sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của polypeptit mà sự mang lại chức năng của nó có liên quan đến bệnh Huntington (ví dụ như, *HTT* đột biến).

Theo một số phương án, gen chuyển (ví dụ., ARNi theo sáng chế) liên kết có điều khiển với vùng khởi động. Vùng khởi động ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vùng khởi động rất sớm của virus cự bào (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, vùng khởi động phosphoglycerat kinaza- 1 (PGK), vùng khởi động virus khỉ 40 (SV40) và vùng khởi động CK6, vùng khởi động transthyretin (TTR), vùng khởi động TK, vùng khởi động đáp ứng tetracyclin (TRE), vùng khởi động HBV, vùng khởi động hAAT, vùng khởi động LSP, vùng

khởi động đặc hiệu gan khảm (LSP), vùng khởi động E2F, vùng khởi động telomeraza (hTERT); vùng tăng cường của virus cự bào/vùng khởi động beta-actin ở gà/ β -globin ở thỏ (vùng khởi động CAG; Niwa *et al.*, *Gene*, 1991, 108(2):193-9) và vùng khởi động yếu tố kéo dài 1-alpha (vùng khởi động EFl-alpha) (Kim *et al.*, *Gene*, 1990, 91(2):217-23 và Guo *et al.*, *Gene Ther.*, 1996, 3(9):802-10). Theo các phương án nhất định, vùng khởi động bao gồm vùng khởi động β -glucuronidaza của người hoặc vùng tăng cường virus cự bào được liên kết với vùng khởi động β -actin của gà (CBA). Vùng khởi động có thể là vùng khởi động cơ định, cảm ứng hoặc kim hãm. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vật truyền tải tổ hợp có chứa axit nucleic mã hóa cho gen chuyển khác loại theo sáng chế được liên kết có điều khiển với vùng khởi động CBA. Các vùng khởi động ví dụ và mô tả có thể tìm thấy, *ví dụ*, trong U.S. PG Pub. 20140335054. Theo một số phương án, vùng khởi động là vùng khởi động CBA, vùng khởi động CBA tối thiểu, vùng khởi động CMV hoặc vùng khởi động GUSB.

Ví dụ về vùng khởi động cấu trúc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vùng khởi động LTR virus sarcom Rous retrovirus (RSV) (tùy ý với vùng tăng cường RSV), vùng khởi động virus cự bào (CMV) (tùy ý với vùng tăng cường CMV) [xem, *ví dụ như*, Boshart *et al*, *Cell*, 41:521-530 (1985)], vùng khởi động SV40, vùng khởi động dihydrofolat reductaza, vùng khởi động 13-actin, vùng khởi động phosphoglycerol kinaza (PGK), và vùng khởi động EFla [Invitrogen].

Vùng khởi động cảm ứng cho phép điều hòa sự biểu hiện gen và có thể được điều hòa bằng các hợp chất được cung cấp từ bên ngoài, các yếu tố môi trường chẳng hạn như nhiệt độ, hoặc sự có mặt của tình trạng vật lý cụ thể, *ví dụ*, pha cấp tính, tình trạng biệt hóa cụ thể của tế bào, hoặc chỉ số tế bào đang sao chép. Vùng khởi động cảm ứng và hệ thống cảm ứng có sẵn từ nhiều nguồn thương mại, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Invitrogen, Clontech và Ariad. Nhiều hệ thống khác đã được mô tả và có thể dễ dàng chọn được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ về vùng khởi động cảm ứng được điều hòa bằng vùng khởi động được cung cấp từ bên ngoài bao gồm vùng khởi động metallothionin cừu cảm ứng kẽm (MT), vùng khởi động virus khối u tuyến vú chuột nhắt cảm ứng dexamethason (Dex) (MMTV), hệ thống vùng khởi động T7 polymeraza (WO 98/10088); vùng khởi động côn trùng ecdyson (No *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351 (1996)), hệ thống kim hãm tetracyclin (Gossen *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-

5551 (1992)), hệ thống cảm ứng tetracyclin (Gossen *et al*, *Science*, 268:1766-1769 (1995), cũng xem Harvey *et al*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998)), hệ thống cảm ứng RU486 (Wang *et al*, *Nat. Biotech.*, 15:239-243 (1997) và Wang *et al*, *Gene Ther.*, 4:432-441 (1997)) và hệ thống cảm ứng rapamycin (Magari *et al*, *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872 (1997)). Các loại khác nữa của vùng khởi động cảm ứng mà có thể hữu dụng trong trường hợp này là các vùng khởi động cảm ứng mà được điều hòa bởi tình trạng sinh lý cụ thể, *ví dụ*, nhiệt độ, pha cấp tính, tình trạng biệt hóa cụ thể của tế bào, hoặc chử tế bào đang sao chép.

Theo phương án khác, vùng khởi động tự nhiên, hoặc mảnh của chúng, đối với gen chuyển sẽ được sử dụng. Vùng khởi động tự nhiên có thể được ưu tiên khi mong muốn rằng biểu hiện của gen chuyển cần bắt chước biểu hiện tự nhiên. Vùng khởi động tự nhiên có thể được sử dụng khi sự biểu hiện của gen chuyển phải được điều hòa tạm thời hoặc theo sự phát triển, hoặc theo phương thức đặc hiệu mô, hoặc đáp ứng với kích thích phiên mã cụ thể. Theo phương án khác, các yếu tố kiểm soát sự biểu hiện tự nhiên khác, chẳng hạn như yếu tố tăng cường, vị trí polyadenyl hóa hoặc các trình tự liên ứng Kozak có thể còn được sử dụng để bắt chước sự biểu hiện tự nhiên.

Theo các phương án nhất định, các trình tự điều chỉnh truyền khả năng biểu hiện gen đặc hiệu mô. Trong một số trường hợp, các trình tự điều chỉnh đặc hiệu mô liên kết các yếu tố phiên mã đặc hiệu mô mà gây ra sự phiên mã theo phương thức đặc hiệu mô. Các trình tự điều hòa đặc hiệu mô này (*ví dụ*, vùng khởi động, vùng tăng cường, v.v.) đã được biết rõ trong lĩnh vực. Các trình tự điều hòa đặc hiệu mô ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các vùng khởi động đặc hiệu mô sau đây: vùng khởi động noron chẳng hạn như enolaza đặc hiệu noron (NSE) (Andersen *et al.*, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993)), vùng khởi động gen chuỗi nhẹ neurofilament (Piccioli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)), và vùng khởi động gen vgf đặc hiệu noron (Piccioli *et al.*, *Neuron*, 15:373-84 (1995)). Theo một số phương án, vùng khởi động đặc hiệu mô là vùng khởi động của gen được chọn từ: nhân noron (NeuN), protein axit tơ thần kinh đệm (GFAP), polip tuyến (APC), và phân tử chuyển tiếp liên kết canxi đã ion hóa 1 (Iba-1). Các vùng khởi động đặc hiệu mô thích hợp khác sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Theo một số phương án, vùng khởi động là vùng khởi động Beta-actin gà (CBA).

Theo một số phương án, vùng khởi động biểu hiện axit nucleic khác loài trong tế bào của CNS. Như vậy, theo một số phương án, polypeptit trị liệu hoặc axit nucleic trị liệu theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị rối loạn của CNS. Theo một số phương án, vùng khởi động làm biểu hiện axit nucleic khác loài trong tế bào não. Tế bào não có thể dùng để chỉ tế bào não bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở noron (chẳng hạn như noron cảm giác, noron vận động, noron gai trung gian, noron tiết dopamin, noron có gai trung bình, noron tiết cholin, noron tiết GABA, noron tháp, v.v.), noron đệm (chẳng hạn như tiểu thần kinh đệm, thần kinh đệm, tế bào hình sao, noron đệm ít gai, tế bào màng não thất, noron đệm hướng tâm, v.v.), tế bào nhu mô não, tế bào tiểu thần kinh đệm, tế bào màng não thất, và/hoặc tế bào Purkinje. Theo một số phương án, vùng khởi động biểu hiện axit nucleic khác loài trong noron và/hoặc noron đệm. Theo một số phương án, noron là noron gai môi trường của nhân đuôi, noron gai môi trường của hạch, noron của lớp vỏ não IV và/hoặc noron của lớp vỏ não V.

Các vùng khởi động khác nhau mà biểu hiện bản mã (ví dụ, gen chuyển khác loài) trong tế bào CNS, tế bào não, noron, và noron đệm là đã biết trong lĩnh vực và được mô tả ở đây. Vùng khởi động này có thể bao gồm các trình tự đối chứng thường liên quan đến gen được chọn hoặc các trình tự đối chứng khác loài. Thông thường, các trình tự đối chứng khác loài hữu dụng bao gồm các trình tự có nguồn gốc từ các trình tự mã hóa gen của động vật có vú hoặc gen của virus. Các ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vùng khởi động sớm SV40, vùng khởi động LTR virus khối u tuyến vú chuột nhắt, vùng khởi động muộn chính adenovirus (Ad MLP), vùng khởi động virus herpes simplex (HSV), vùng khởi động virus cự bào (CMV) chẳng hạn như vùng khởi động rất sớm CMV (CMVIE), vùng khởi động virus sarcom Rous (RSV), vùng khởi động tổng hợp, vùng khởi động lai, và dạng tương tự. Ngoài ra, trình tự có nguồn gốc từ gen không phải virus, như gen metallothionein ở chuột, cũng có thể được sử dụng. Trình tự của vùng khởi động này thường bán trên thị trường bởi, ví dụ, Stratagene (San Diego, CA). Vùng khởi động đặc hiệu CNS và vùng khởi động cảm ứng có thể được sử dụng. Các ví dụ của vùng khởi động đặc hiệu CNS bao gồm không giới hạn các vùng khởi động phân lập từ gen đặc hiệu CNS như protein bazơ myelin (MBP), protein axit sợi tơ thần kinh đệm (GFAP), và enolaza đặc hiệu noron (NSE). Các ví dụ của vùng khởi

động cảm ứng bao gồm các yếu tố đáp ứng ADN và đối với ecdyson, tetracyclin, metallothionein, và hypoxia, *không kể những cái khác*.

Sáng chế bao gồm việc sử dụng bộ gen virus tái tổ hợp để đưa một hoặc nhiều trình tự axit nucleic mã hóa đối với ARNi như được mô tả ở đây hoặc đóng gói vào hạt virus AAV. Hệ gen virus tái tổ hợp có thể bao gồm thành phần bất kỳ để thiết lập sự biểu hiện của ARNi, ví dụ như, tất cả hoặc phần chức năng của vùng khởi động, intron (*ví dụ như*, intron khảm)), axit nucleic khác loại, ITR, thành phần liên kết ribosom, vùng kết thúc, vùng tăng cường, chỉ thị chọn lọc, intron, tín hiệu polyA, và/hoặc điểm mở đầu sao chép. Theo một số phương án, vật truyền rAAV có chứa một hoặc nhiều thành phần trong số vùng tăng cường, intron (*ví dụ như*, cặp phần cho chỗ nối/phần nhận chỗ nối), vị trí gắn cơ chất, hoặc tín hiệu polyadenyl hóa. Nhiều intron để sử dụng trong sáng chế đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và bao gồm intron MVM, intron bị cắt cụt F IX 1, SD β -globin/SA chuỗi nặng globin miễn dịch, SD adenovirus/SA globin miễn dịch, SD/SA muện SV40 (19S/16S), và SD adenovirus/SA IgG lai. (Wu *et al.* 2008, Kurachi *et al.*, 1995, Choi *et al.* 2014), Wong *et al.* 1985, Yew *et al.* 1997, Huang and Gorman (1990).

Theo một số phương án, việc cho dùng lượng có hiệu quả của các hạt rAAV bao gồm vật truyền mã hóa cho ARNi chuyển nạp các tế bào (*ví dụ*, tế bào CNS, tế bào não, neuron, và/hoặc neuron đệm) ở hoặc gần vị trí cho dùng (*ví dụ*, thể vân và/hoặc vỏ não) hoặc xa hơn vị trí cho dùng. Theo một số phương án, lớn hơn khoảng giá trị bất kỳ trong số 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% hoặc 100% của các neuron được tải nạp. Theo một số phương án, từ khoảng 5% đến khoảng 100%, từ khoảng 10% đến khoảng 50%, từ khoảng 10% đến khoảng 30%, từ khoảng 25% đến khoảng 75%, từ khoảng 25% đến khoảng 50%, hoặc khoảng 30% đến khoảng 50% của neuron được chuyển nạp. Phương pháp để xác định các neuron được chuyển nạp bởi hạt virus tái tổ hợp biểu hiện miARN là đã biết trong lĩnh vực; ví dụ, hóa mô miễn dịch, dò ARN (*ví dụ*, qPCR, kỹ thuật tách Northern, phương pháp giải trình tự ARN (ARN-seq), phương pháp lai tại chỗ, và tương tự) hoặc việc sử dụng chất đánh dấu đồng biểu hiện như protein huỳnh quang màu xanh lá cây cải tiến có thể được sử dụng để phát hiện sự biểu hiện.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt virus bao gồm bộ gen tự bổ sung tái tổ hợp (*ví dụ*, vật truyền rAAV tự bổ sung). Hạt virus AAV với bộ gen vật truyền tự bổ sung và

phương pháp sử dụng bộ gen AAV tự bổ sung được mô tả trong Bằng sáng chế Mỹ số 6,596,535; 7,125,717; 7,465,583; 7,785,888; 7,790,154; 7,846,729; 8,093,054; và 8,361,457; và Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111, mỗi trong số chúng được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. rAAV bao gồm bộ gen tự bổ sung sẽ nhanh chóng tạo thành phân tử ADN sợi đôi bởi trình tự bổ sung một phần (*ví dụ*, bổ sung cho sợi mã hóa và không mã hóa của axit nucleic khác loài). Theo các phương án nhất định, vật truyền có chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa cho axit nucleic khác loài và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa cho trình tự bổ sung của axit nucleic, tại đó trình tự axit nucleic thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trong cùng một sợi với trình tự axit nucleic thứ hai dọc theo gần hết hoặc toàn bộ chiều dài của nó.

Theo một số phương án, trình tự axit nucleic khác loài thứ nhất mã hóa cho ARNi và trình tự axit nucleic khác loài thứ hai mã hóa cho phần bổ sung của ARNi được liên kết bởi ITR đột biến (*ví dụ*, ITR bên phải). Theo một số phương án, ITR có chứa trình tự polynucleotit 5'-

CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCG
CCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA
GAGGGA-3 (SEQ ID NO:15). ITR đột biến có chứa sự làm khuyết của vùng D có chứa trình tự phân giải ở đầu tận cùng. Kết quả là, trong quá trình sao chép hệ gen virus AAV, protein rep sẽ không phân cắt hệ gen virus ở ITR đột biến và như vậy, hệ gen virus tái tổ hợp có chứa trình tự sau theo thứ tự 5' đến 3' sẽ được đóng gói trong capsit virus: ITR AAV, trình tự polynucleotit khác loài thứ nhất bao gồm trình tự điều hòa, ITR AAV đột biến, polynucleotit khác loài thứ hai theo chiều ngược lại với polynucleotit khác loài thứ nhất và ITR AAV thứ ba.

VI. Hạt virus và phương pháp sản xuất hạt virus

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

Hạt virus

Sáng chế đề xuất hạt virus bao gồm ARNi như được bộc lộ ở đây. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt virus để phân phối ARNi theo sáng chế như được bộc lộ trong bản mô tả này. Ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng hạt virus tái tổ hợp để phân phối ARNi để điều trị bệnh hoặc rối loạn ở động vật có vú; ví dụ, các hạt rAAV bao gồm ARNi để điều trị HD. Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp là hạt AAV tái tổ hợp. Theo một số phương án, hạt virus là hạt AAV tái tổ hợp bao gồm axit nucleic bao gồm trình tự ARNi theo sáng chế được kẹp bởi một hoặc hai ITR. Axit nucleic được bao trong capsit trong hạt AAV. Hạt AAV cũng có chứa protein capsit. Theo một số phương án, axit nucleic bao gồm (các) trình tự mã hóa có lợi (ví dụ, axit nucleic của ARNi theo sáng chế) các thành phần được liên kết có điều khiển theo hướng phiên mã, các trình tự đối chứng bao gồm trình tự khởi đầu phiên mã và kết thúc phiên mã, nhờ đó tạo thành cát xét biểu hiện. Cát xét biểu hiện được kẹp trên đầu 5' và 3' bởi ít nhất một trình tự ITR AAV chức năng. "Trình tự ITR AAV chức năng" có nghĩa là trình tự ITR thực hiện chức năng đã định để giải phóng, sao chép và đóng gói hạt virus AAV. Xem Davidson *et al.*, *PNAS*, 2000, 97(7):3428-32; Passini *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):7034-40; và Pechan *et al.*, *Gene Ther.*, 2009, 16:10-16, tất cả các tài liệu này đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Để thực hiện một số khía cạnh của sáng chế, vật truyền tái tổ hợp có chứa ít nhất toàn bộ các trình tự của AAV cần thiết để bao trong capsit và các cấu trúc vật lý để lây nhiễm bởi rAAV. ITR AAV để sử dụng trong vật truyền theo sáng chế không cần phải có trình tự nucleotit kiểu đại (ví dụ như, như được mô tả trong Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5:793-801), và có thể được làm thay đổi bằng sự cài xen, sự làm khuyết hoặc sự thể của nucleotit hoặc ITR AAV có thể có nguồn gốc từ kiểu huyết thanh bất kỳ trong số một vài kiểu huyết thanh AAV. Hiện nay hơn 40 kiểu huyết thanh của AAV đã được biết, và các kiểu huyết thanh mới và biến thể của các kiểu huyết thanh hiện có tiếp tục được xác định. Xem Gao *et al.*, *PNAS*, 2002, 99(18): 11854-6; Gao *et al.*, *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6; và Bossis *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810. Việc sử dụng kiểu huyết thanh AAV bất kỳ được coi như là nằm trong phạm vi của sáng chế. Theo một số phương án, vật truyền rAAV là vật truyền có nguồn gốc từ kiểu huyết thanh AAV, bao gồm không giới hạn, ITR AAV là AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, ITR kiểu huyết thanh capsit AAV của dê, AAV của bò, hoặc AAV của chuột hoặc tương tự. Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV bao gồm ITR của AAV1, AAV2, AAV3, AAV4,

AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, ITR kiểu huyết thanh capsit AAV của dê, AAV của bò, hoặc AAV của chuột hoặc tương tự. Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV còn mã hóa cho ARNi như được mô tả ở đây. Ví dụ như, axit nucleic trong AAV có thể có chứa ít nhất là một ITR của kiểu huyết thanh AAV bất kỳ được dự tính trong bản mô tả này và có thể còn mã hóa cho ARNi có chứa một sợi mà có chứa vùng dẫn và sợi khác mà có chứa vùng không dẫn. Theo một phương án, axit nucleic trong AAV có thể có chứa ít nhất là một ITR của kiểu huyết thanh AAV bất kỳ và có thể còn mã hóa cho ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'-CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA-3' (SEQ ID NO:2). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV có chứa từ 5' đến 3' là axit nucleic mã hóa cho các thành phần sau đây: ITR (ví dụ như, ITR AAV2), vùng khởi động, axit nucleic mã hóa cho ARNi như được bộc lộ trong bản mô tả này, tín hiệu polyadenyl hóa, và ITR AAV (ví dụ như, ITR AAV2). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV có chứa từ 5' đến 3' là axit nucleic mã hóa cho các thành phần sau đây: ITR (ví dụ như, ITR AAV2), vùng khởi động, axit nucleic mã hóa cho ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'-CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA-3' (SEQ ID NO:2), tín hiệu polyadenyl hóa, và ITR AAV (ví dụ như, ITR AAV2). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV bao gồm axit nucleic 5' đến 3' mã hóa cho các thành phần sau đây: ITR (ví dụ, ITR AAV2), vùng khởi động CBA, axit nucleic mã hóa cho ARNi như được bộc lộ ở đây, tín hiệu polyadenyl hóa (ví dụ, polyA hoocmon tăng trưởng ở bò), và ITR AAV (ví dụ, ITR AAV2). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV có chứa từ 5' đến 3' là axit nucleic mã hóa cho các thành phần sau đây: tất cả hoặc phần chức năng của ITR (ví dụ như, ITR AAV2), vùng khởi động CBA, intron (ví dụ như, intron khảm), axit nucleic mã hóa cho ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1), và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'-CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA-3' (SEQ ID NO:2), tín hiệu polyadenyl hóa (ví dụ như, polyA hoocmon tăng trưởng của bò), và ITR AAV (ví dụ như, ITR AAV2). Theo một số phương án, sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép. Theo

một số phương án, sợi thứ nhất được liên kết vào sợi thứ hai bằng cầu nối. Theo một số phương án, cầu nối có chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO:13.

Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV có chứa từ 5' đến 3' là axit nucleic mã hóa cho các thành phần sau đây: ITR (*ví dụ như*, ITR AAV2), vùng khởi động CBA, axit nucleic mã hóa cho ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'- CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA-3' (SEQ ID NO:2), và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1), tín hiệu polyadenyl hóa (*ví dụ như*, polyA hoocmôn tăng trưởng của bò), và ITR AAV (*ví dụ như*, ITR AAV2). Theo một số phương án, sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép. Theo một số phương án, sợi thứ nhất được liên kết vào sợi thứ hai bằng cầu nối. Theo một số phương án, cầu nối có chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO:13.

Theo phương án khác, axit nucleic trong AAV có thể có chứa ít nhất là một ITR của kiểu huyết thanh AAV bất kỳ được dự tính trong bản mô tả này và có thể còn mã hóa cho ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'- UGCUUGUCAACCAACCGACU-3' (SEQ ID NO:8). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV bao gồm axit nucleic 5' đến 3' mã hóa cho các thành phần sau đây: ITR (*ví dụ*, ITR AAV2), vùng khởi động, axit nucleic mã hóa cho ARNi như được bộc lộ ở đây, tín hiệu polyadenyl hóa, và ITR AAV (*ví dụ*, ITR AAV2). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV có chứa từ 5' đến 3' axit nucleic mã hóa cho các thành phần sau đây: ITR (*ví dụ như*, ITR AAV2), vùng khởi động, axit nucleic mã hóa cho ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'- UGCUUGUCAACCAACCGACU-3' (SEQ ID NO:8), tín hiệu polyadenyl hóa, và ITR AAV (*ví dụ như*, ITR AAV2). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV có chứa từ 5' đến 3' axit nucleic mã hóa cho các thành phần sau đây: ITR (*ví dụ như*, ITR AAV2), vùng khởi động CBA, intron khảm, axit nucleic mã hóa cho ARNi như được bộc lộ trong bản mô tả này, tín hiệu polyadenyl hóa (*ví dụ như*, polyA hoocmôn tăng trưởng của bò), và ITR AAV (*ví dụ như*, ITR AAV2). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV có chứa từ 5' đến 3' axit nucleic mã hóa cho các thành phần sau đây: ITR (*ví dụ*

như, ITR AAV2), vùng khởi động CBA, intron khảm, axit nucleic mã hóa cho ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7), và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'- UGCUUGUCAACCACACCGACU-3' (SEQ ID NO:8), tín hiệu polyadenyl hóa (*ví dụ như*, polyA hoocmôn tăng trưởng của bò), và ITR AAV (*ví dụ như*, ITR AAV2). Theo một số phương án, sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép. Theo một số phương án, sợi thứ nhất được liên kết vào sợi thứ hai bằng cầu nối. Theo một số phương án, cầu nối có chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO:13.

Theo phương án khác, axit nucleic trong AAV có thể có chứa ít nhất là một ITR của kiểu huyết thanh AAV bất kỳ được dự tính trong bản mô tả này và có thể còn mã hóa cho ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'-UGCUUGUCAACCACACCGACU-3' (SEQ ID NO:8) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV có chứa từ 5' đến 3' axit nucleic mã hóa cho các thành phần sau đây: ITR (*ví dụ như*, ITR AAV2), vùng khởi động, axit nucleic mã hóa cho ARNi như được bộc lộ trong bản mô tả này, tín hiệu polyadenyl hóa, và ITR AAV (*ví dụ như*, ITR AAV2). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV có chứa từ 5' đến 3' axit nucleic mã hóa cho các thành phần sau đây: ITR (*ví dụ như*, ITR AAV2), vùng khởi động, intron, axit nucleic mã hóa cho ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'- UGCUUGUCAACCACACCGACU-3' (SEQ ID NO:8) và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7), tín hiệu polyadenyl hóa, và ITR AAV (*ví dụ như*, ITR AAV2). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV bao gồm axit nucleic 5' đến 3' mã hóa vùng sau đây: ITR (*ví dụ*, ITR AAV2), vùng khởi động CBA, axit nucleic mã hóa cho ARNi như được bộc lộ ở đây, tín hiệu polyadenyl hóa (*ví dụ*, polyA hoocmon tăng trưởng ở bò), và ITR AAV (*ví dụ*, ITR AAV2). Theo một số phương án, axit nucleic trong AAV có chứa từ 5' đến 3' axit nucleic mã hóa cho các thành phần sau đây: ITR (*ví dụ như*, ITR AAV2), vùng khởi động CBA, intron, axit nucleic mã hóa cho ARNi có chứa sợi thứ nhất có chứa axit nucleic thứ nhất có chứa trình tự 5'- UGCUUGUCAACCACACCGACU-3', và sợi thứ hai có chứa axit nucleic thứ hai có chứa trình tự 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7), tín hiệu polyadenyl hóa

(ví dụ như, polyA hoocmôn tăng trưởng của bò), và ITR AAV (ví dụ như, ITR AAV2). Theo một số phương án, sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép. Theo một số phương án, sợi thứ nhất được liên kết vào sợi thứ hai bằng cầu nối. Theo một số phương án, cầu nối có chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO:13.

Theo một số phương án, vật truyền có thể bao gồm (một hoặc nhiều) axit nucleic nhồi. Theo một số phương án, axit nucleic nhồi có thể có chứa trình tự mã hóa cho polypeptit báo cáo. Như sẽ được hiểu rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, axit nucleic nhồi có thể được định vị ở nhiều vùng ở trong vật truyền, và có thể gồm có trình tự liên tục (ví dụ như, axit nucleic nhồi đơn lẻ ở vị trí đơn lẻ) hoặc nhiều trình tự (ví dụ như, hơn một axit nucleic nhồi ở hơn một vị trí (ví dụ như, 2 vị trí, 3 vị trí, v.v.) ở trong vật truyền. Theo một số phương án, axit nucleic nhồi có thể được định vị xuôi dòng của trình tự ARNi. Theo các phương án, axit nucleic nhồi có thể được định vị ngược dòng của trình tự ARNi (ví dụ như, ở giữa vùng khởi động và axit nucleic mã hóa cho ARNi). Như cũng sẽ được hiểu rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực nhiều axit nucleic có thể được sử dụng làm axit nucleic nhồi. Theo một số phương án, axit nucleic nhồi có chứa toàn bộ hoặc một phần của trình tự nhồi alpha-1-kháng trypsin (AAT) ở người hoặc trình tự nhồi nhiễm sắc thể C16 P1 dòng 16 P1 (C16 ở người). Theo một số phương án, trình tự đoạn nhồi có chứa toàn bộ hoặc một phần của gen. Ví dụ như, trình tự đoạn nhồi có chứa một phần của trình tự AAT ở người. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng các phần khác nhau của gen (ví dụ như, trình tự AAT ở người) có thể được sử dụng làm mảnh nhồi. Ví dụ như, mảnh nhồi có thể từ đầu 5' của gen, đầu 3' của gen, đoạn giữa của gen, phần không mã hóa của gen (ví dụ như, intron), vùng mã hóa của gen (ví dụ như exon), hoặc hỗn hợp của phần không mã hóa và phần mã hóa của gen. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cũng sẽ nhận ra rằng toàn bộ hoặc một phần của trình tự nhồi có thể được sử dụng làm trình tự nhồi. Theo một số phương án, trình tự đoạn nhồi có chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO:18.

Theo các phương án khác, hạt rAAV bao gồm các protein capsit của AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8, AAVrh8R, AAVrh.10, AAV11, AAV12, hoặc đột biến của các protein capsit này. Theo các phương án nhất định, protein capsit đột biến duy trì được khả năng tạo thành capsit AAV. Theo các phương án nhất định, hạt rAAV bao gồm capsit đột biến tyrosin AAV5 (Zhong L. *et al.*, (2008) *Proc Natl*

Acad Sci U S A 105(22):7827-7832. Theo các phương án khác, hạt rAAV có chứa protein capsit của kiểu huyết thanh AAV từ các Nhánh A-F (Gao, *et al.*, *J. Virol.* 2004, 78(12):6381).

Các kiểu huyết thanh AAV khác nhau được sử dụng để tối ưu hóa sự chuyển nạp các tế bào đích cụ thể hoặc để nhắm đích các loại tế bào đặc hiệu trong mô đích cụ thể (ví dụ, mô bị bệnh). Hạt rAAV có thể có chứa protein virus và axit nucleic virus của cùng kiểu huyết thanh hoặc kiểu huyết thanh hỗn hợp. Ví dụ, theo một số phương án, hạt rAAV có thể có chứa protein capsit AAV1 và ít nhất một ITR AAV2 hoặc nó có thể có chứa protein capsit AAV2 và ít nhất một ITR AAV1. Hỗn hợp bất kỳ của các kiểu huyết thanh AAV để sản xuất hạt rAAV được đề xuất trong bản mô tả này như thể mỗi hỗn hợp đã được nêu một cách riêng rẽ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các hạt rAAV bao gồm capsit của AAV1 và vật truyền rAAV theo sáng chế (ví dụ, cắt xét biểu hiện bao gồm axit nucleic mã hóa cho ARNi theo sáng chế), được kẹp bằng ít nhất một ITR AAV2. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các hạt rAAV bao gồm capsit AAV2.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt virus có chứa hệ gen tự bổ sung tái tổ hợp. Các hạt virus AAV với hệ gen tự bổ sung và phương pháp sử dụng hệ gen AAV tự bổ sung được mô tả trong các bằng sáng chế Mỹ số 6,596,535; 7,125,717; 7,465,583; 7,785,888; 7,790,154; 7,846,729; 8,093,054; và 8,361,457; và Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111, mỗi tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. rAAV có chứa hệ gen tự bổ sung sẽ nhanh chóng tạo thành phân tử ADN cấu trúc kép do trình tự bổ sung một phần của nó (ví dụ, sợi mã hóa và không mã hóa bổ trợ của gen chuyển). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt virus AAV bao gồm bộ gen AAV, trong đó bộ gen rAAV bao gồm trình tự polynucleotit khác loài thứ nhất (ví dụ, ARNi theo sáng chế) và trình tự polynucleotit khác loài thứ hai (ví dụ, sợi đối nghĩa của ARNi theo sáng chế) trong đó trình tự polynucleotit khác loài thứ nhất có thể tạo thành các cặp bazơ trên cùng sợi với trình tự polynucleotit thứ hai dọc theo hầu hết hoặc toàn bộ chiều dài của nó. Theo một số phương án, trình tự polynucleotit khác loài thứ nhất và trình tự polynucleotit khác loài thứ hai được liên kết bởi trình tự xúc tiến sự bắt cặp bazơ nội chuỗi; ví dụ, cấu trúc ADN hình cặp tóc. Cấu trúc kẹp tóc là đã biết trong lĩnh vực, ví dụ trong phân tử miARN hoặc siARN. Theo một số phương án, trình tự polynucleotit khác loài thứ nhất và trình tự polynucleotit khác loài thứ hai được liên kết bởi ITR đột biến (ví dụ, ITR bên phải). Theo một số phương án, ITR có

chứa trình tự polynucleotit 5'-
 CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCG
 CCCGACGCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA
 GAGGGA-3 (SEQ ID NO:15). ITR đột biến có chứa sự làm khuyết của vùng D có chứa trình
 tự phân giải ở đầu tận cùng. Kết quả là, trong quá trình sao chép hệ gen virus AAV, protein
 rep sẽ không phân cắt hệ gen virus ở ITR đột biến và như vậy, hệ gen virus tái tổ hợp có chứa
 trình tự sau theo thứ tự 5' đến 3' sẽ được đóng gói trong capsit virus: ITR AAV, trình tự
 polynucleotit khác loại thứ nhất bao gồm trình tự điều hòa, ITR AAV đột biến, polynucleotit
 khác loại thứ hai theo chiều ngược lại với polynucleotit khác loại thứ nhất và ITR AAV thứ
 ba. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hạt virus AAV bao gồm bộ gen virus tái tổ hợp
 bao gồm ITR AAV2 chức năng, trình tự polynucleotit mã hóa cho ARNi thứ nhất theo sáng
 chế, ITR AAV2 đột biến bao gồm đột biến làm khuyết của vùng D và khuyết trình tự chức
 phân giải cuối, trình tự polynucleotit thứ hai bao gồm trình tự bổ sung cho trình tự mã hóa
 cho ARNi theo sáng chế, của trình tự polynucleotit thứ nhất và ITR AAV2 chức năng.

Theo một số phương án, hạt virus là hạt adenovirus. Theo một số phương án, hạt
 adenovirus là hạt adenovirus tái tổ hợp, ví dụ, vật truyền polynucleotit bao gồm ARNi theo
 sáng chế giữa hai ITR. Theo một số phương án, hạt adenovirus không có hoặc chứa bản sao
 khuyết của một hoặc nhiều gen E1, mà liên quan đến khiếm khuyết sao chép adenovirus.
 Adenovirus bao gồm bộ gen ADN sợi đôi, thẳng trong capsit hai mươi mặt không bọc, lớn
 (~950Å). Adenovirus có bộ gen lớn mà có thể kết hợp hơn 30kb trình tự khác loài (ví dụ, ở vị
 trí vùng E1 và/hoặc E3), làm chúng đều phù hợp để dùng với gen khác loài lớn hơn. Chúng
 còn được biết là gây nhiễm tế bào phân chia và không phân chia và không tích hợp một cách
 tự nhiên vào bộ gen chủ (mặc dù các biến thể lai có thể có khả năng này). Theo một số phương
 án, vật truyền adenovirus có thể là vật truyền adenovirus thể hệ thứ nhất với trình tự khác loài
 ở vị trí E1. Theo một số phương án, vật truyền adenovirus có thể là vật truyền adenovirus thể
 hệ thứ hai với các đột biến thêm hoặc đột biến làm khuyết ở E2A, E2B, và/hoặc E4. Theo
 một số phương án, vật truyền adenovirus có thể là vật truyền adenovirus thể hệ thứ ba hoặc
 phá hủy bên trong mà không có tất cả gen mã hóa virus, chỉ còn các ITR và tín hiệu đóng gói
 và cần adenovirus hỗ trợ *in trans* để sao chép, và đóng gói. Các hạt adenovirus được khảo sát
 để dùng làm vật truyền cho chuyển nhiễm tạm thời của tế bào động vật có vú cũng như vật

truyền liệu phép gen. Để mô tả thêm, tham khảo, *ví dụ*, Danthinne, X. and Imperiale, M.J. (2000) *Gene Ther.* 7:1707-14 và Tatsis, N. và Ertl, H.C. (2004) *Mol. Ther.* 10:616-29.

Theo một số phương án, hạt virus là hạt adenovirus tái tổ hợp bao gồm axit nucleic mã hóa cho ARNi theo sáng chế. Sử dụng bất kỳ kiểu huyết thanh nào của adenovirus được xem là thuộc phạm vi của sáng chế. Theo một số phương án, vật truyền adenovirus tái tổ hợp là vật truyền có nguồn gốc từ kiểu huyết thanh của adenovirus, bao gồm không giới hạn, AdHu2, AdHu3, AdHu4, AdHu5, AdHu7, AdHu11, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad bò kiểu 3, Ad chó kiểu 2, Ad cừu, và Ad lợn kiểu 3. Hạt adenovirus còn bao gồm các protein capsit. Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp bao gồm hạt adenovirus kết hợp với một hoặc nhiều protein capsit virus lạ. Các kết hợp này có thể được gọi là hạt adenovirus tái tổ hợp kiểu giả. Theo một số phương án, các protein capsit virus lạ được dùng trong hạt adenovirus tái tổ hợp kiểu giả thu được từ các virus lạ hoặc từ kiểu huyết thanh khác của adenovirus. Theo một số phương án, các protein capsit virus lạ có nguồn gốc từ, bao gồm không giới hạn, reovirus loại 3. Các ví dụ của vật truyền và kết hợp protein capsit dùng trong các hạt adenovirus kiểu giả có thể tìm thấy trong tài liệu sau (Tatsis, N. *et al.* (2004) *Mol. Ther.* 10(4):616-629 và Ahi, Y. *et al.* (2011) *Curr. Gene Ther.* 11(4):307-320). Kiểu huyết thanh khác của adenovirus có thể được sử dụng để tối ưu hóa sự chuyển nạp của gen đích cụ thể hoặc để nhắm đích loại gen đặc hiệu trong mô đích cụ thể (*ví dụ*, mô bị bệnh). Mô hoặc tế bào được nhắm đích bởi kiểu huyết thanh đặc hiệu của adenovirus, bao gồm không giới hạn, phổi (*ví dụ* HuAd3), lá lách và gan (*ví dụ* HuAd37), cơ trơn, hoạt dịch khớp, tế bào đuôi gai, tế bào tim mạch, dòng tế bào u (*ví dụ* HuAd11), và tế bào đuôi gai (*ví dụ* HuAd5 được tạo kiểu giả với *reovirus loại 3*, *HuAd30*, hoặc *HuAd35*). Để mô tả thêm, tham khảo Ahi, Y. *et al.* (2011) *Curr. Gene Ther.* 11(4):307-320, Kay, M. *et al.* (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40, và Tatsis, N. *et al.* (2004) *Mol. Ther.* 10(4):616-629. Vật truyền adenovirus được dùng bằng cách dùng trong thể vôn (tham khảo, *ví dụ*, Mittoux, V. *et al.* (2002) *J. Neurosci.* 22:4478-86).

Theo một số phương án, hạt virus là hạt lentivirus. Theo một số phương án, hạt lentivirus là hạt lentivirus tái tổ hợp, *ví dụ*, vật truyền polynucleotit mã hóa cho ARNi theo sáng chế giữa hai LTR. Lentivirus là retrovirus ssARN, dương -có nghĩa với bộ gen bằng khoảng 10 kb. Lentivirus được biết là tích hợp vào bộ gen của tế bào phân chia và không phân

chia. Hạt lentivirus có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách chuyển nhiễm nhiều plasmit (thường bộ gen lentivirus và gen cần cho sao chép và/hoặc đóng gói được tách riêng để phòng ngừa sao chép virus) vào dòng tế bào đóng gói, mà đóng gói bộ gen lentivirus cải biến vào hạt lentivirus. Theo một số phương án, hạt lentivirus có thể đề cập đến vật truyền thể hệ thứ nhất không có protein bọc. Theo một số phương án, hạt lentivirus có thể đề cập đến vật truyền thể hệ thứ hai mà không có tất cả gen trừ các vùng gag/pol và tat/rev. Theo một số phương án, hạt lentivirus có thể đề cập đến vật truyền thể hệ thứ ba mà chỉ chứa gen rev, gag, và pol nội sinh và có LTR khả năng để chuyển nạp không có gen tat (xem Dull, T. *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:8463-71). Để mô tả thêm, tham khảo Durand, S. and Cimarelli, A. (2011) *Viruses* 3:132-59.

Theo một số phương án, hạt virus là hạt lentivirus tái tổ hợp bao gồm axit nucleic mã hóa cho ARNi theo sáng chế. Sử dụng any lentivirus vật truyền được xem là thuộc phạm vi của sáng chế. Theo một số phương án, vật truyền lentivirus thu được từ lentivirus bao gồm, không giới hạn, virus-1 gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV-1), virus-2 gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV-2), virus gây suy giảm miễn dịch ở khỉ (SIV), virus gây suy giảm miễn dịch ở mèo (FIV), virus gây bệnh thiếu máu lây nhiễm ở ngựa (EIAV), virus gây suy giảm miễn dịch ở bò (BIV), virus gây bệnh Jembrana (JDV), virus visna (VV), và virus gây viêm não ở dê (CAEV). Hạt lentivirus also bao gồm các protein capsit. Theo một số phương án, hạt virus tái tổ hợp bao gồm vật truyền lentivirus kết hợp với một hoặc nhiều các protein capsit virus lạ. Tổ hợp này có thể được gọi là hạt lentivirus tái tổ hợp kiểu giả. Theo một số phương án, các protein capsit virus lạ được sử dụng trong hạt lentivirus tái tổ hợp kiểu giả thu được từ virus lạ. Theo một số phương án, protein capsit virus lạ us được sử dụng trong hạt lentivirus tái tổ hợp kiểu giả là virus gây viêm miệng có mụn nước glycoprotein (VSV-GP). VSV-GP tương tác với thụ thể tế bào khắp nơi, tạo ra tính hướng kích thích mô rộng cho hạt lentivirus tái tổ hợp kiểu giả. Ngoài ra, VSV-GP được cho là tạo ra tính ổn định cao cho hạt lentivirus tái tổ hợp kiểu giả. Theo phương án khác, protein capsit virus lạ thu được từ, bao gồm nhưng không giới hạn ở, virus Chandipura, virus Rabies, virus Mokola, virus gây viêm màng não lympho bào (LCMV), virus Sông Ross (RRV), virus Sindbis, virus Rừng Semliki (SFV), virus viêm não ngựa Venezuela, virus Ebola Reston, virus Ebola Zaire, virus Marburg, virus Lassa, virus bệnh bạch cầu ở chim (ALV), retrovirus cừu Jaagsiekte (JSRV), virus bệnh bạch cầu ở

chuột Moloney (MLV), virus bệnh bạch cầu ở chuột không đuôi Gibbon (GALV), retrovirus nội sinh ở mèo (RD114), virus T-lymphotropic ở người 1 (HTLV-1), virus bọt ở người, virus Maedi-visna (MVV), SARS-CoV, virus Sendai, virus hợp bào hô hấp (RSV), virus cảm lạnh ở người loại 3, virus viêm gan C (HCV), virus cúm, virus dịch hạch ở gà (FPV), hoặc virus đa nhân đa diện *Autographa californica* (AcMNPV). Các ví dụ của tổ hợp vật truyền và protein capsit được dùng trong các hạt lentivirus kiểu giả có thể tìm thấy, ví dụ, trong Cronin, J. *et al.* (2005). *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398. Các hạt lentivirus tái tổ hợp kiểu giả có thể được sử dụng để tối ưu hóa sự chuyển nạp của tế bào đích cụ thể hoặc nhắm đích các loại tế bào đặc hiệu trong mô đích cụ thể (ví dụ, mô bị bệnh). Ví dụ, mô được nhắm đích bởi hạt lentivirus tái tổ hợp kiểu giả đặc hiệu, bao gồm không giới hạn, gan (ví dụ được tạo kiểu giả với protein VSV-G, LCMV, RRV, hoặc SeV F), phổi (ví dụ được tạo kiểu giả với protein Ebola, Marburg, SeV F và HN, hoặc JSRV), tế bào mảnh tủy (ví dụ được tạo kiểu giả với protein LCMV), hệ thần kinh trung ương (ví dụ được tạo kiểu giả với protein VSV-G, LCMV, Rabies, hoặc Mokola), võng mạc (ví dụ được tạo kiểu giả với protein VSV-G hoặc Mokola), bạch cầu đơn nhân hoặc cơ (ví dụ được tạo kiểu giả với protein Mokola hoặc Ebola), hệ tạo huyết (ví dụ được tạo kiểu giả với protein RD114 hoặc GALV), hoặc tế bào ung thư (ví dụ được tạo kiểu giả với protein GALV hoặc LCMV). Để mô tả thêm, tham khảo Cronin, J. *et al.* (2005). *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398 và Kay, M. *et al.* (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40.

Theo một số phương án, hạt virus là hạt virus herpes đơn dạng (HSV). Theo một số phương án, hạt HSV là hạt rHSV, ví dụ, vật truyền polynucleotit mã hóa cho ARNi theo sáng chế giữa hai TR. HSV là virus ADN sợi đôi, được bọc với bộ gen bằng khoảng 152 kb. Có lợi là, khoảng một nửa gen của nó là không thiết yếu và có thể xóa bỏ để điều tiết trình tự khác loài. Hạt HSV lây nhiễm các tế bào không phân chia. Ngoài ra, chúng thiết lập một cách tự nhiên thời gian đợi trong neuron, di chuyển bằng cách chuyển tải lùi, và có thể chuyển qua khớp thần kinh, làm chúng có lợi để chuyển nhiễm neuron và/hoặc nghiên cứu liệu pháp gen liên quan đến hệ thần kinh. Theo một số phương án, hạt HSV có thể sao chép thiếu hoặc sao chép đủ (ví dụ, đủ cho chu kỳ sao chép đơn thông qua bất hoạt một hoặc nhiều gen muộn). Để mô tả thêm, tham khảo Manservigi, R. *et al.* (2010) *Open Virol. J.* 4:123-56.

Theo một số phương án, hạt virus là hạt rHSV bao gồm axit nucleic mã hóa cho ARNi theo sáng chế. Sử dụng bất kỳ vật truyền HSV được coi là thuộc phạm vi của sáng chế. Theo

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

Sản xuất hạt virus

Các hạt rAAV có thể được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Xem, ví dụ như, Bằng sáng chế Mỹ số 6,566,118; 6,989,264; và 6,995,006. Trong thực hành sáng chế, tế bào chủ để sản xuất hạt rAAV bao gồm tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, vi sinh vật và nấm men. Tế bào chủ cũng có thể là tế bào đóng gói trong đó gen rep và cap AAV được duy trì ổn định trong tế bào chủ hoặc tế bào sản xuất trong đó hệ gen vật truyền AAV được duy trì ổn định. Tế bào sản xuất và tế bào đóng gói nên làm ví dụ thu được từ tế bào 293, tế bào A549 hoặc tế bào HeLa. Vật truyền AAV được tinh chế và bào chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phương pháp đã biết trong lĩnh vực để sản xuất vật truyền rAAV bao gồm nhưng không giới hạn ở chuyển nhiễm, tạo ra dòng tế bào ổn định, và hệ sản xuất virus lai lây nhiễm mà bao gồm thể lai adenovirus-AAV, thể lai herpesvirus-AAV (Conway, JE *et al.*, (1997) *J. Virology* 71(11):8780-8789) và thể lai baculovirus-AAV. môi trường sản xuất rAAV để sản

xuất hạt virus rAAV đều yêu cầu; 1) tế bào chủ thích hợp, bao gồm, ví dụ, dòng tế bào có nguồn gốc từ người như tế bào HeLa, A549, hoặc 293, hoặc dòng tế bào có nguồn gốc từ côn trùng như SF-9, trong trường hợp hệ sản xuất baculovirus; 2) chức năng virus hỗ trợ thích hợp, được cung cấp bởi adenovirus kiểu dại hoặc đột biến (như adenovirus nhạy cảm nhiệt độ), herpes virus, baculovirus, hoặc cấu trúc plasmid cung cấp chức năng hỗ trợ; 3) Gen rep và cap AAV và sản phẩm gen; 4) axit nucleic (như axit nucleic chữa bệnh) được kẹp bởi ít nhất một trình tự ITR AAV ; và 5) môi trường thích hợp và thành phần của môi trường để hỗ trợ sản xuất AAV. Theo các phương án nhất định, sản phẩm gen rep và cap AAV có thể từ bất kỳ kiểu huyết thanh AAV. Thông thường, nhưng không bắt buộc, sản phẩm gen rep AAV là của cùng kiểu huyết thanh như các ITR của hệ gen vật truyền rAAV cho đến khi sản phẩm gen rep có thể thực hiện chức năng để được sao chép và đóng gói hệ gen rAAV. Môi trường thích hợp đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng để sản xuất vật truyền rAAV. Các môi trường này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, môi trường được sản xuất bởi Hyclone Laboratories và JRH bao gồm Môi Trường Eagle Cải Biến (MEM), Môi Trường Eagle Cải Biến Dulbecco (DMEM), các hợp phần theo đặt hàng chẳng hạn như các hợp phần được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6,566,118, và môi trường Sf-900 II SFM như được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6,723,551, mỗi tài liệu này được nêu ở đây chỉ để tham khảo, cụ thể là đối với hợp phần môi trường theo đặt hàng để sử dụng trong việc sản xuất vật truyền AAV tái tổ hợp. Theo các phương án nhất định, chức năng hỗ trợ AAV được cung cấp bởi adenovirus hoặc HSV. Theo một số phương án, chức năng hỗ trợ AAV được cung cấp bởi baculovirus và tế bào chủ là tế bào côn trùng (ví dụ, tế bào *Spodoptera frugiperda* (SF9)).

Theo một số phương án, các hạt rAAV có thể được tạo ra bởi phương pháp chuyển nhiễm ba lần, như phương pháp chuyển nhiễm ba lần ví dụ được đề xuất dưới đây. Một cách vắn tắt, plasmid chứa gen rep và gen capsid, cùng với plasmid adenovirus trợ giúp, có thể được chuyển nhiễm (ví dụ như, bằng cách sử dụng phương pháp canxi photphat) vào dòng tế bào (ví dụ như, tế bào HEK-293), và virus có thể được thu gom và tùy ý được tinh chế. Như vậy, theo các phương án nhất định, hạt rAAV được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm ba lần axit nucleic mã hóa vật truyền rAAV, axit nucleic mã hóa rep và cap AAV, và chức năng virus hỗ trợ AAV vào tế bào chủ, trong đó chuyển nhiễm của axit nucleic vào tế bào chủ tạo ra tế bào chủ có khả năng tạo ra các hạt rAAV.

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

Theo một số khía cạnh, phương pháp được đề xuất để sản xuất bất kỳ hạt rAAV như được bộc lộ ở đây bao gồm (a) nuôi cấy tế bào dưới các điều kiện mà các hạt rAAV tạo ra, trong đó tế bào chủ bao gồm (i) một hoặc nhiều gen đóng gói AAV, trong đó mỗi gen đóng gói AAV này mã hóa sao chép AAV và/hoặc protein bao trong capsit; (ii) tiền vật truyền rAAV bao gồm axit nucleic mã hóa cho ARNi theo sáng chế như được mô tả ở đây được kẹp bởi ít nhất một ITR AAV, và (iii) chức năng trợ giúp AAV; và (b) thu hồi các hạt rAAV được tạo ra bởi tế bào chủ. Theo một số phương án, ARNi có chứa trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO:7. Theo một số phương án, ít nhất một ITR AAV này được chọn từ nhóm bao gồm ITR AAV là AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, ITR kiểu huyết thanh capsit AAV của dê, AAV của bò, hoặc AAV của chuột hoặc tương tự. Theo một số phương án, protein bao trong capsit này được chọn từ nhóm bao gồm AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 (ví dụ, capsit AAV6 kiểu đại, hoặc capsit AAV6 biến thể như ShH10, như được mô tả trong U.S. PG Pub. 2012/0164106), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9 (ví dụ, capsit AAV9 kiểu đại, hoặc capsit AAV9 cải biến như được mô tả trong U.S. PG Pub. 2013/0323226), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, thể đột biến capsit tyrosin, thể đột biến capsit liên kết heparin, capsit AAV2R471A, capsit AAVAAV2/2-7m8, capsit AAV DJ (ví

dự, capsit AAV-DJ/8, capsit AAV-DJ/9, hoặc capsit bất kỳ khác trong số các capsit được mô tả trong U.S. PG Pub. 2012/0066783), capsit N587A AAV2, capsit E548A AAV2, capsit N708A AAV2, capsit V708K AAV, capsit AAV của dê, capsit khảm AAV1/AAV2, capsit AAV của bò, capsit AAV của chuột, capsit rAAV2/HBoV1, hoặc capsit AAV được mô tả trong Bằng sáng chế Mỹ số 8,283,151 hoặc Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO/2003/042397. Theo các phương án nhất định, protein capsit đột biến duy trì được khả năng tạo thành capsit AAV. Theo một số phương án, protein bao trong capsit là protein capsit đột biến tyrosin AAV5. Theo các phương án khác, hạt rAAV bao gồm các protein capsit của kiểu huyết thanh AAV từ nhánh gai nối A-F. Theo một số phương án, các hạt rAAV bao gồm capsit của AAV1 và bộ gen tái tổ hợp bao gồm ITR AAV2, ITR AAV2 đột biến và axit nucleic mã hóa cho ARNi theo sáng chế. Theo phương án khác, hạt rAAV được tinh chế. Thuật ngữ "được tinh chế" như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm việc chuẩn bị hạt rAAV không có ít nhất một số thành phần khác mà cũng có thể có mặt khi hạt rAAV có trong tự nhiên hoặc được điều chế ban đầu từ các thành phần này. Do đó, ví dụ, hạt rAAV được phân lập có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật tinh chế để làm giàu nó từ hỗn hợp nguồn, như hợp chất dung giải nuôi cấy hoặc dịch nổi bề mặt nuôi cấy sản xuất. Việc làm giàu có thể được xác định theo nhiều cách khác nhau, như, ví dụ, bởi tỷ lệ của các hạt bền với ADNza (DRP) hoặc các bản sao hệ gen (gc) có mặt trong dung dịch, hoặc bởi tính lây nhiễm, hoặc nó có thể được xác định trong mối liên quan với chất can thiệp tiềm năng, thứ hai có mặt trong hỗn hợp nguồn, như các chất nhiễm tạp, bao gồm các chất nhiễm tạp trong quá trình nuôi cấy sản xuất hoặc các chất nhiễm tạp trong quá trình xử lý, bao gồm virus hỗ trợ, các thành phần của môi trường, và các chất tương tự.

Nhiều phương pháp là đã biết trong lĩnh vực để sản xuất hạt vật truyền của adenovirus. Ví dụ, đối với vật truyền adenovirus phá hủy bên trong, bộ gen vật truyền adenovirus và bộ gen adenovirus trợ giúp có thể được chuyển nhiễm vào dòng tế bào đóng gói (ví dụ, dòng tế bào 293). Theo một số phương án, bộ gen adenovirus trợ giúp có thể gồm có các vị trí tái tổ hợp kẹp tín hiệu đóng gói của nó, và cả bộ gen có thể được chuyển nhiễm vào dòng tế bào đóng gói mà biểu hiện recombinaza (ví dụ, hệ Cre/loxP có thể được sử dụng), sao cho vật truyền adenovirus có lợi được đóng gói hiệu quả hơn adenovirus trợ giúp (tham khảo, ví dụ, Alba, R. *et al.* (2005) *Gene Ther.* 12 Suppl 1:S18-27). Vật truyền adenovirus có thể được thu

hoạch và được tinh chế sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn, như các phương pháp được mô tả ở đây.

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

Nhiều phương pháp là đã biết trong lĩnh vực để sản xuất hạt HSV. Vật truyền HSV có thể được thu hoạch và được tinh chế sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn, như các phương pháp được mô tả ở đây. Ví dụ như, đối với vật truyền HSV khiếm khuyết sao chép, hệ gen HSV được quan tâm mà thiếu tất cả các gen rất sớm (IE) có thể được chuyển nhiễm vào dòng tế bào bổ sung mà cung cấp các gen cần thiết cho sự sản xuất virus, chẳng hạn như ICP4, ICP27, và ICP0 (xem, ví dụ như, Samaniego, L.A. *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:3307-20). Vật truyền HSV có thể được thu hoạch và được tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả (ví dụ, Goins, WF *et al.*, (2014) *Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology* 1144:63-79).

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

Theo một số phương án, được phẩm bao gồm hạt virus tái tổ hợp bao gồm gen chuyển mã hóa cho ARNi theo sáng chế được mô tả ở đây và chất mang được dụng thích hợp để dùng cho người. Các chất mang như vậy là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, pp. 1035-1038 và 1570-1580). Theo một số phương án, được phẩm bao gồm rAAV được mô tả ở đây và chất mang được dụng thích

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

Các chất mang được dụng như vậy có thể là chất lỏng vô trùng, như nước và dầu, bao gồm các dầu có nguồn gốc từ dầu mỏ, động vật, thực vật hoặc tổng hợp, như dầu lạc, dầu đậu tương, dầu khoáng, và các dầu tương tự. Dung dịch nước muối và dung dịch dextroza, polyetylen glycol (PEG) và glyxerol bazơ nước cũng có thể được sử dụng làm chất mang lỏng, cụ thể cho dung dịch dùng để tiêm. Dược phẩm có thể còn chứa các thành phần bổ sung, ví dụ chất bảo quản, chất đệm, chất đẳng trương, chất chống oxy hóa và chất làm ổn định, chất làm trong hoặc chất thẩm ướt không ion, chất làm tăng độ nhớt, và các chất tương tự. Dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được đóng gói trong các liều lượng đơn vị đơn hoặc ở dạng đa liều. Dược phẩm nhìn chung được bào chế dưới dạng dung dịch vô trùng và gần như đẳng trương.

VII. Vật phẩm sản xuất và bộ kit

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

Sáng chế cũng đề xuất bộ kit có chứa hợp phần được mô tả trong bản mô tả này và có thể còn chứa (các) hướng dẫn về phương pháp sử dụng hợp phần này, như các cách sử dụng được mô tả trong bản mô tả này. Bộ kit được mô tả trong bản mô tả này có thể còn bao gồm các nguyên liệu khác được mong muốn trên quan điểm thương mại và của người sử dụng,

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được hiểu một cách đầy đủ hơn dựa vào các ví dụ sau. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng các ví dụ này không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế. Cần phải hiểu rằng các ví dụ và phương án được mô tả trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích minh họa và nhiều cải biến hoặc thay đổi khác nhau của các ví dụ và phương án này sẽ được đề xuất bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và được bao gồm trong tinh thần và phạm vi của sáng chế và phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ đính kèm.

Ví dụ 1: AAV2/1-miARN-Htt làm giảm biểu hiện Htt *in vitro*.

ARN can thiệp (ARNi) đề xuất nghiên cứu để điều trị nhiều bệnh ở người. Tuy nhiên, độ an toàn của liệu pháp chữa bệnh trên cơ sở ARNi có thể bởi khả năng của ARN ức chế nhỏ (các siARN) liên kết với các mARN không mong muốn và làm giảm biểu hiện của chúng, tác động được biết là cam gen ngoài đích. Ngoài đích thường xảy ra khi vùng mầm (các nucleotit 2–8 của ARN nhỏ) bắt cặp với các trình tự trong các 3'-UTR của các mARN không mong muốn và dẫn đến sự ngăn cản và làm mất ổn định dịch mã của các bản mã đó. Đến nay, hầu hết các trình tự ARNi chữa bệnh được chọn chủ yếu vì hiệu quả làm cam gen, và sau đó được đánh giá về độ an toàn. Hai siARN được tạo ra để điều trị bệnh Huntington (HD), rối loạn thoái hóa thần kinh trội, với khả năng nhắm đích nhằm tối thiểu (*tức là*, chúng thiếu các thành phần mầm ở trong tất cả các 3'-UTR người và khỉ rhesus đã biết) mà chúng tỏ việc làm cam huntingtin hiệu nghiệm trong ở não chuột nhất với biên dạng nhắm đích nhằm *in silico*

thấp (Bảng 1, Hình 1A). Một trình tự (207) được thử nghiệm về khả năng của nó để cứu chữa các kiểu hình hành vi trong YAC128 ở mô hình chuột nhắt của HD. Sự phân phối qua thể vân của AAV2/1-miARN-Htt-207 không chỉ làm giảm hàm lượng mARN và protein Htt trong não, mà còn hiệu chỉnh biên dạng hành vi khác thường ở chuột nhắt YAC128 và chứng tỏ hoạt tính sợi dẫn cao và việc xử lý 5' chính xác, giảm thiểu tiềm năng đối với tác dụng nhắm đích nhầm.

BẢNG 1. Các trình tự miARN và bổ sung ngược (đích) đối với 206 và 207 cũng như là các trình tự trên và dưới để tách dòng, bao gồm các phần nhô ra vị trí giới hạn.

miARN ID	Thành phần	Trình tự	SEQ ID NO:
206	trình tự miARN (đối nghĩa, 5'→3')	uGGCCGUCCAUCUUGGACCCG	1
206	bổ sung ngược (có nghĩa, 5'→3')	CGGGUCCAAGAUGGACGGCCa	2
206	trình tự ADN mã hóa cho cấu trúc kép miARN	GTGGCCGTCCATCTTGGACC CGGTTTTGGCCACTGACTGA CCGGGTCCAATGGACGGCCA	3
206	trình tự ARN của cấu trúc kép miARN	GUGGCCGUCCAUCUUGGACC CGGUUUUGGCCACUGACUGA CCGGGUCCA AUGGACGGCCA	4
206	trình tự trên để tách dòng (5'→3') vòng thân mà chứa trình tự miARN thực sự, bao gồm phần nhô ra vị trí giới hạn để tách dòng*	<u>TGCTGTGGCCGTCCATCTTG</u> GACCCGGTTTTGGCCACTGA CTGACC GGGTCCAATGGACG <i>GCCA</i>	5

206	trình tự dưới để tách dòng (5'→3') bổ sung ngược của trình tự trong cột sang bên trái, bao gồm các phần nhô ra vị trí giới hạn để tách dòng*	<u>CCTGTGGCCGTCCATTGGAC</u> CCGGTCAGTCAGTGGCCAAA ACCGGGTCCAAGATGGACGG CCAC	6
207	trình tự miARN (đối nghĩa, 5'→3')	AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA	7
207	bổ sung ngược (có nghĩa, 5'→3')	UGCUUGUCAACCCACACCGACU	8
207	trình tự ADN mã hóa cho cấu trúc kép miARN	AGTCGGTGTGGTTGACAAGCA GTTTTGGCCACTGACTGACTG CTTGTCCCACACCGACT	9
207	trình tự ARN của cấu trúc kép miARN	AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA GUUUUGGCCACUGACUGACUG CUUGUCCCACACCGACU	10
207	trình tự trên để tách dòng (5'→3') vòng thân mà chứa trình tự miARN thực sự, bao gồm phần nhô ra vị trí giới hạn để tách dòng*	<u>TGCTGAGTCGGTGTGGTTGA</u> CAAGCAGTTTTGGCCACTGA CTGACTGCTTGTCCCACACC GACT	11
207	trình tự dưới để tách dòng (5'→3') bổ sung ngược của trình tự trong cột sang bên trái, bao	<u>CCTGAGTCGGTGTGGGACAA</u> GCAGTCAGTCAGTGGCCAAA ACTGCTTGTC AACCACACCG ACTC	12

	gồm các phần nhô ra vị trí giới hạn để tách dòng*		
--	---	--	--

*Đối với trình tự để tách dòng-Các phần nhô ra vị trí giới hạn để tách dòng được gạch chân; trình tự miARN được in đậm; trình tự vòng là chữ văn bản; các bazơ 1-8 của miARN bổ sung ngược được in đậm, nghiêng; cá bazơ 11-21 (11-20 đối với 170XX) của miARN bổ sung ngược được in nghiêng.

Khả năng của AAV2/1-miARN-Htt 206 và 207 để làm trung gian sự giảm mARN huntingtin người được thử nghiệm in vitro bằng cách sử dụng tế bào thận phôi người (HEK293). Các plasmit biểu hiện AAV2/1-miARN-206 và 207, cũng như là plasmit đối chứng dương (170XA) chứa trình tự miARN đã được thể hiện trước đây để làm giảm hàm lượng Htt bằng xấp xỉ 50%, được chuyển nhiễm tế bào HEK293 (8 bản sao trong mỗi lần xử lý). Các tế bào được chuyển nhiễm sử dụng chất phản ứng chuyển nhiễm Eugene và được thu hoạch 48 giờ sau. Tổng ARN được phân lập sử dụng bộ kit TaqMan® Cells-to-CT™ (Ambion). Các hàm lượng ARN được đo bằng RT-PCR thời gian thực định lượng (được thực hiện và phân tích trên Thiết bị dò trình tự ABI Prism 7500 (Applied Biosystems)). Các mức biểu hiện được chuẩn hóa đến PPIA của người (peptidylprolyl isomerase). Như thể hiện trên Hình 2, hàm lượng mARN Htt ở người được giảm đi sau khi chuyển nhiễm bằng cả hai plasmit 206 và 207 được so sánh với đối chứng không được điều trị. Mức độ giảm Htt gần như tương đương so với đối chứng dương 170XA.

Ví dụ 2: AAV2/1-miARN-Htt làm giảm sự biểu hiện Htt *in vivo*.

Khả năng của AAV2/1-miARN- 206 và 207 để làm giảm hàm lượng protein HTT trong vùng vân của chuột nhất HD YAC128 được thử nghiệm. Chuột nhất YAC128 trưởng thành tiếp nhận tiêm trong thể vân hai bên của AAV2/1-miARN-Htt 206 (1e10 vg/vị trí) hoặc AAV2/1-miARN-Htt 207 (1e10 vg/vị trí), hoặc AAV2/1-CTL3 (đối chứng miARN không mã hóa) (1e10 vg/vị trí). Một tháng sau khi tiêm AAV, các con vật bị giết chết và được truyền với PBS. Não được gom để phân tích mô học và sinh hóa. Đối với phân tích sinh hóa vùng vân của một bán cầu được vi cắt và làm đông nhanh trong nitơ lỏng. Hàm lượng trong thể vân của mARN Htt và protein HTT ở người và ở chuột nhất đột biến được đánh giá lần lượt

bằng QPCR và thẩm tách Western. mARN Htt ở người và Htt ở chuột nhất đột biến được giảm đi đáng kể ở chuột nhất được tiêm AAV2/1-miARN-Htt 206 và AAV2/1-miARN-Htt 207 khi được so sánh với con đối chứng CTL3 (Hình 3A). PPIA dùng làm gen đối chứng chuẩn hóa cho tất cả các thử nghiệm QPCR. Protein HTT ở người và ở chuột nhất đột biến được giảm đi đáng kể ở tất cả các con chuột nhất được tiêm AAV2/1-miARN-Htt khi được so sánh với con đối chứng CTL3 và mức độ giảm đi tương đương (xấp xỉ 50%, $p < 0,05$) được ghi nhận ở tất cả các lần xử lý (Hình 3B). Beta-tubulin dùng làm gen đối chứng chuẩn hóa cho tất cả các kỹ thuật thẩm tách Western.

Tác dụng của AAV2/1-miARN-Htt 206 và 207 lên não và khối lượng cơ thể của chuột nhất YAC128 được đánh giá. Khối lượng cơ thể của con vật vào ngày phẫu thuật được so sánh với khối lượng cơ thể ghi nhận vào ngày giết chết, 1 tháng sau khi tiêm (Hình 4A). Không có sự khác biệt giữa AAV2/1-miARN-Htt 206 và 207 so với đối chứng CTL3. Tất cả các con chuột xuất hiện khỏe mạnh, tỉnh táo, và đáp ứng tốt một tháng sau khi điều trị và không giảm khối lượng được quan sát thấy ở nhóm điều trị bất kỳ. Tình trạng ẩm của não ứ đọng được ghi nhận sau khi truyền PBS và mổ não. Sự tăng lên đáng kể về mặt thống kê của khối lượng não của chuột nhất YAC128 được điều trị bằng AAV2/1-miARN-Htt 206 và 207 được quan sát thấy so với trên đối chứng được điều trị CTL3 (Hình 4B).

Ví dụ 3: AAV2/1-miARN-Htt hiệu chỉnh khiếm khuyết hành vi và phối hợp ở chuột nhất YAC128

Khả năng của sự phân phối qua thể vân của AAV2/1-miARN-Htt-207 để điều chỉnh kiểu hình hành vi bất thường ở chuột nhất YAC128 được đánh giá. Ảnh hưởng của sự giảm đi qua trung gian AAV2/1-miARN-Htt 207 của hàm lượng Htt đột biến trên khiếm khuyết kiểu hình đã được xác định đặc điểm rõ ràng có mặt trong mô hình chuột nhất YAC128 của HD cũng được xét nghiệm. Các con chuột nhất cùng lứa YAC128 và kiểu đại FVB độ tuổi ngang bằng (3 tháng tuổi) tiếp nhận tiêm trong thể vân hai bên bằng AAV2/1-miARN-Htt-207 (2×10^9 vg/vị trí) hoặc vật truyền đối chứng AAV2/1-CTL3 (2×10^9 vg/vị trí). Các con chuột tiếp nhận kiểm tra hành vi và bị giết chết 3 tháng sau khi điều trị. Phân tích thẩm tách Western của dịch đồng nhất não cho thấy hàm lượng của protein Htt người đột biến được giảm đi đáng kể trong vùng vân của các con chuột nhất cùng lứa YAC128 được tiêm AAV2/1-miARN-Htt-207 và kiểu đại FVB (giảm xấp xỉ 50%, $p < 0,01$) khi được so sánh với đối chứng được

điều trị AAV2/1-CTL3. Hàm lượng protein HTT ở chuột nhất không được giảm đi đáng kể trong nghiên cứu này (Hình 5A và Hình 5B). Phân tích PCR định lượng thời gian thực chỉ ra sự giảm đi cân xứng ở hàm lượng mRNA (Hình 5C và Hình 5D).

Chuột nhất YAC128 đã được báo cáo là thể hiện sự thiếu hụt phối hợp vận động (mà có thể được bộc lộ rõ bằng cách sử dụng thử nghiệm thanh quay) và kiểu hình suy nhược (mà có thể được bộc lộ rõ bằng cách sử dụng thử nghiệm bơi Porsolt) bắt đầu ở 3 tháng tuổi (Slow *et al.*, 2003, Van Raamsdonk *et al.*, 2007). Thử nghiệm thanh quay của chuột nhất YAC128 được điều trị AAV2/1-CTL3 vào 3 tháng sau khi tiêm cho thấy sự thiếu hụt phối hợp vận động đáng kể khi được so sánh với các con cùng lứa kiểu đại được điều trị AAV2/1-CTL3 (ANOVA, $p < 0,05$) (Hình 6A). Tuy nhiên, chuột nhất YAC128 mà đã được điều trị bằng AAV2/1-miARN-Htt-207 thể hiện mức hiệu năng mà có thể phân biệt được với mức hiệu năng của chuột nhất kiểu đại (ANOVA, hậu kiểm Tukey; WT 207 so với YAC128 207, $p = \text{NS}$; WT CTL3 so với YAC128 CTL3, $p < 0,05$). Do đó, việc hạ xuống một phần của hàm lượng Htt đột biến là đủ để điều chỉnh khiếm khuyết vận động của chuột nhất YAC128. Không có sự khác biệt đáng kể ở hiệu năng thanh quay giữa chuột nhất kiểu đại mà tiếp nhận AAV2/1-miARN-Htt-207 và chuột nhất kiểu đại mà tiếp nhận AAV2/1-CTL3. Các báo cáo trước đây chỉ ra rằng chuột nhất YAC128 thể hiện kiểu hình suy nhược mà có thể được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm bơi Porsolt (Pouladi *et al.*, 2009). Các động vật dường như biểu hiện trạng thái suy giảm nếu chúng bất động trong khoảng thời gian kéo dài khi đặt vào thùng chứa nước. Bằng cách sử dụng thử nghiệm tốc độ bơi cơ bản (trong đó độ trễ bơi để đến được bề được đo) các nhà nghiên cứu đã chứng minh rằng kiểu hình suy nhược này trong thử nghiệm bơi Porsolt không liên quan đến khả năng bơi của chuột nhất YAC128 và độc lập với sự thiếu hụt phối hợp vận động đã được ghi nhận rõ trong tài liệu quan sát được trong mô hình này (Pouladi *et al.*, 2000). Các con chuột nhất cùng lứa YAC128 và WT ba tháng tuổi được tiêm bằng vật truyền AAV2/1-miARN-Htt-207 hoặc AAV2/1-CTL3 và được thử nghiệm 3 tháng sau trong thử nghiệm bơi Porsolt. Chuột nhất YAC128 được điều trị CTL3 thể hiện khoảng thời gian tăng lên ở trạng thái bất động khi được so sánh với chuột nhất YAC được điều trị AAV2/1-miARN-Htt-207 hoặc các con kiểu đại được điều trị AAV2/1-CTL3 (Hình 6B; ANOVA $p < 0,05$). Một lần nữa, không có sự khác biệt đáng kể ở hiệu năng của chuột nhất kiểu đại mà tiếp nhận AAV2/1-miARN-Htt hoặc AAV2/1-CTL3. Chuột nhất

YAC128 mà đã được tiêm bằng AAV2/1-miARN-Htt-207 sử dụng thời gian ít hơn đáng kể ở trạng thái bất động so với đối chứng được điều trị AAV2/1-CTL3. Thật vậy, hiệu năng của chuột nhất YAC128 được điều trị AAV2/1-miARN-Htt-207 tương tự với mà hiệu năng của các con cùng lứa kiểu đại, gợi ý sự hiệu chỉnh gần như hoàn toàn của kiểu hình bất thường này (ANOVA, hậu kiểm Tukey; YAC 207 so với YAC CTL3, $p < 0,05$).

Tác dụng của AAV2/1-miARN-Htt 207 lên não và khối lượng cơ thể của chuột nhất YAC128 được đánh giá. Khối lượng cơ thể của con vật vào ngày phẫu thuật được so sánh với khối lượng cơ thể ghi nhận vào ngày giết chết, 3 tháng sau khi tiêm. Không có sự khác biệt ở khối lượng cơ thể giữa chuột nhất được điều trị AAV2/1-miARN-Htt 207 so với đối chứng được điều trị CTL3 (Hình 7A). Tất cả các con chuột xuất hiện khỏe mạnh, tinh táo, và đáp ứng tốt ba tháng sau khi điều trị và không giảm khối lượng được quan sát thấy ở nhóm điều trị bất kỳ. Tình trạng ẩm của não ướt được ghi nhận sau khi truyền PBS và mổ não. Không có sự khác biệt ở khối lượng não của chuột nhất YAC128 được điều trị bằng AAV2/1-miARN-Htt 207 so với trên đối chứng được điều trị CTL3 (Hình 7B).

Ví dụ 4. miARN chứng minh hoạt tính dẫn cao và xử lý 5' chính xác sau khi phân phối in vivo

Chuột nhất YAC128 được điều trị bằng AAV2/1-miARN-Htt 206 hoặc AAV2/1-miARN-Htt 207 thông qua sự tiêm nội sọ. Sau khi điều trị, vùng vắn được lấy ra, và ARN tổng số được phân lập. Thư viện xác định trình tự ARN nhỏ được xây dựng bằng cách sử dụng Bộ Điều Chế Thư Viện ARN Nhỏ NEBNext Small RNA Library Prep Set (New England Biolabs), và việc xác định trình tự được thực hiện trên thiết bị Illumina MiSeq. Các mẫu từ 2 con chuột riêng rẽ được phân tích đối với mỗi lần điều trị. Ở đây tổng số của tất cả các kết quả đọc miARN bao gồm các trình tự nội sinh được thể hiện cũng như là tổng số kết quả đọc dẫn và kèm theo đối với vật truyền xử lý. Việc xử lý vật truyền AAV2/1-miARN-Htt 202T được bao gồm trong thí nghiệm này làm đối chứng vì nó đã được xác định trình tự từ trước. Tỷ lệ phần trăm vị trí bắt đầu được mong đợi đối với mỗi sợi dẫn và sợi đi kèm là $> 99\%$, và vật truyền 207 có tỷ lệ sợi dẫn : sợi đi kèm cao bằng 76,1% và 79,3%.

Bảng 2. Hoạt tính dẫn và xử lý 5'

Vật truyền	202T#	206	207
------------	-------	-----	-----

ID mẫu #	202	23	28	33	34
Tổng kết quả đọc*	1,898,745	3,184,602	3,307,273	3,386,131	2,599,808
# Tổng kết quả đọc (dẫn)	47,001	196	186	11,801	39,177
% trong vị trí bắt đầu được mong đợi	99,1	100	99,5	97,9	97,6
# Tổng kết quả đọc (đi kèm)	465,981	554	719	3,075	12,327
% trong vị trí bắt đầu được mong đợi	99,2	99,1	99,4	99,5	99,2
% Dẫn	0,2	26,1	20,6	79,3	79,1

Ví dụ 5. Vật truyền miRHtt207 tự bổ sung

Cát xét biểu hiện 207 miRHtt có thể được đóng gói dưới dạng hệ gen vật truyền tự bổ sung. Để đạt được điều này, plasmid ITR được thiết kế để có kích thước chỉ là 2,3kb, điều này làm thuận lợi cho việc đóng gói vật truyền dạng dimer 4,6kb; 4,6 kb là dung tích đóng gói của vật truyền AAV. Plasmid ITR có thể được thiết kế để có 5'ITR WT và 3' ITR bị cắt, bị khuyết D đã đột biến (Δ ITR), như được minh họa trên Hình 8. Hệ gen vật truyền được dự đoán mà có thể được đóng gói là hệ gen vật truyền tự bổ sung, mà là 3165 bp, và chứa 5' và 3' ITR WT và delta ITR nội tại, thứ ba (*ví dụ như*, intron khảm). Ngoài ra, mong đợi rằng một số hệ gen vật truyền dạng monome được đóng gói, và chúng có kích thước là 1656bp.

Phương pháp khác để tạo ra vật truyền AAV miRHtt 207 tự bổ sung *tức là*, đóng gói hai hệ gen vật truyền trong mỗi capsit, sẽ tạo ra hệ gen vật truyền sợi đơn, nhỏ, *tức là*, 1755bp, sao cho hai bản sao của hệ gen vật truyền được đóng gói dưới dạng các loại trung gian sao chép, 3365 bp, (Hình 9). Trong ví dụ này plasmid ITR sẽ có 5' và 3' ITR WT và trung gian sao chép, 3365bp, sẽ có ba ITR WT, một 5' ITR và 3' ITR và một ITR nội tại. Các loại hệ gen vật truyền sợi đơn, 1755bp, cũng có thể được đóng gói.

CÁC TRÌNH TỰ BỔ SUNG

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

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

Trình tự ADN khung miARN

ctggaggcttgctgaaggctgtatgctgtagacaatgattcacacgggtgtttggccactgactgacaccgtgtgcattgtctaacag
gacacaaggcctgttagcactcacatggaacaaatggcc (SEQ ID NO:14)

ITR AAV biến thể cho vật truyền scAAV

CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCG
CCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA
GAGGGA (SEQ ID NO:15).

ssAAV2/1miRHtt.de

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAG
CCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG
CAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCATCACTAGGGGGTTCCTCTATATTACCCTGCTA
GGCAATTGGATCCCGGACCGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAA
TCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAA
CTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACG
TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGT
CAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTAT
CATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGG
CATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACG
TATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCT
CCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTAT
TTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGC
GGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCC

AATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCG
GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCC
TTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACT
GACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTG
TAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC
CTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGC
GTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGG
CTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGA
GGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGG
AACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGG
CGCGTCGGTCGGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCA
CGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCG
TGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCT
CGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCG
GCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGA
GGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGC
GCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGG
AAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCCCCTTCTC
CCTCTCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACG
GGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGC
TAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTT
ATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCTTCGAAAGATCTGCTAGCCTGG
AGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAGTCGGTGTGGTTGACAAGCAGTTTTGGC
CACTGACTGACTGCTTGTCCCACACCGACTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGC
ACTCACATGGAACAAATGGCCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTCAC
CTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCA
TCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCTTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCA
CTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTC
ATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA
GACAATAGCAGGCATGCTGGGGAGCTAGAGTCGACCGGACCGGTGGAAGTCCTC
TTCCTCGGTGTCCTTGACTTCAAAGGGTCTCTCCCATTTGCCTGGAGAGAGGGGAAG

GTGGGCATCACCAGGGGTGAGTGAAGGTTTGGAAGAGTGTAGCAGAATAAGAAACCA
 TGAGTCCCCTCCCTGAGAAGCCCTGAGCCCCCTTGACGACACACATCCCTCGAGGCT
 CAGCTTCATCATCTGTAAAAGGTGCTGAAACTGACCATCCAAGCTGCCGAAAAAGATT
 GTGTGGGGATAATTCAAAACTAGAGGAAGATGCAGAATTTCTACATCGTGGCGATGTC
 AGGCTAAGAGATGCCATCGTGGCTGTGCATTTTTATTGGAATCATATGTTTATTTGAGG
 GTGTCTTGGATATTACAAATAAAATGTTGGAGCATCAGGCATATTTGGTACCTTCTGTCT
 TAAGGCTCCCTGCCCTTGTTAATTGGCAGCTCAGTTATTCATCCAGGGCAAACATTC
 TGCTTACTATTCTGAGAGCTTTCCTCATCCTCTAGATTGGCAGGGGAAATGCAGATG
 CCTGAGCAGCCTCCCCTCTGCCATACCAACAGAGCTTCACCATCGAGGCATGCAGAG
 TGGACAGGGGCCTCAGGGACCCCTGATCCCAGCTTTCTCATTGGACAGAAGGAGGA
 GACTGGGGCTGGAGAGGGACCTGGGGCCCCACTAAGGCCACAGCAGAGCCAGGAC
 TTTAGCTGTGCTGACTGCAGCCTGGCTTGCCTCCACTGCCCTCCTTTGCCTCAAGAG
 CAAGGGAGCCTCAGAGTGGAGGAAGCAGCCCCTGGCCTTGCCTCCCACCTCCCCTC
 CCCTATGCTGTTTTCTGAGGACAGTGGGAGCTGGCTTAGAATGCCCTGGGGCCCCCA
 GGACCCTGGCATTTTAACCCTCAGGGGCGAGGAAGGCAGCCTGAGATACAGAAGAG
 TCCATCACCTGCTGTATGCCACACACCATCCCCACAGTTACGTACTAGTTTGAAGCCA
 CGCGGACCGTTATAGTTACGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTC
 TCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCC
 GGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGG
 CCAAAGATCT

(SEQ ID NO:16)

Trình tự ADN mIR207 được thể hiện in đậm (SEQ ID NO:17)

Trình tự nhồi được thể hiện in nghiêng (SEQ ID NO:18)

Phần của gen A1AT

aattcgcccttgggcctaggaattggatccgccggcagagaaaacatcccagggttacagatcacatgcaggcagggacca
gctcaaccccttcttaattgtcatccagggagggggccagggatggaggggaggggttgaggagcgagaggcagttatTTTTGGGTG
ggattcaccacttttcccatgaagaggggagacttggtatTTTtTlcaatcattaagaagacaaagggttTgtgaacttgacctgggg
gggatatagatgggtatggcctctaaaaacatggccccagcagcttcagtccttctcgtcgatggtcagcacagccttatgcacgg
cctggaggggagagaagcagagacacgttgtaaggctgatcccaggcctcgagcaaggctcacgtggacacctcccaggaagc
gctcactccccctggacggccctggccctgcacatcctctccctccctgtcacataggccttgctcctcctcaaggcttTggctgatgg
ggctggctccccctgttccatcttctgacaagcgcctctccccctgtcaggtgcaccacaactcagaacaggaagagcatcgt
cactccacgtctgectccagggtctctctcttctagtagacaggttgaaagctccttgaggacacggaccctggcagtgacctcaca
gtgcccagaccccaagataatgcagccattcatggaactgcaggttggtcattggctgcctttagtttccaaaataagtgtcactttagc
tgaaatcattcatttaattcagacaccaaattcagagatcgaaggagtcagaaattccttTgaacaacttagcccaaaccittctgtgc
agtatggataaatcaaggcccaatgtctagaaggcttgggcaaagttgaaattcagggtcagtgacacaacctcaagggagggccc
cgaaagtgccagctgcacagcagccctgcctggcttTgtgttTgccaccgtccgtgtcagtgaaacacgggcattctcaggag
ctcagcctgggtcttcttTgttccctcgcccccttctcagcctcaggacagtgctgcagccccacacattcttccctacagatacc
atggtgcaacaaggctcgtcaggggtgatctcacttggagagcttcaggggtgcctcctctgtgacccccggagaggtcagccccattg
ctgaagaccttagtgatgccagttgacctcaggacgctcttcagatcataggttccagtaatggacagtttgggtaaatgtaagtggc
agacctgtcgtgcagaaaagaaattcaaggcatggcacagcattcctctgttctctgggacccaccacagtgcaagtgtttctttct
gattatttctgccacttactctgtgtcctccaccacactaagatgggaactcggttTggttTgtctacttttagctcttctacattgagt
caaagaatgttaacatcgaatgaatcacaaaagctTgaaatgccacctcctctgatattctaggtgtcctggaaagcctgtctcattgc
cctgtagtgtTgggtcacttgccccccagcctgtaacatccccagggccctacaccagagaaaacaggggctggTggcagtgcc
cagtgacaaccgtttagtgataagagaagagtgaccacaccaggctgagtgctcctctctgtgttTccatggggagacaatgccac
cctgagcagggctgtgtgtgagcggcagctggctctgggtctctgatccgttacccctcagcctcttTgttcttctcaaccctgga
gcagagacctcaggaggtgctggcatggaacagagaaattccagcctcgattcctattatgaaccgacacctttTgtatttctcattg
gttttacagtgtaaaaacgaactagatcagcagggcatgggcataatcacgaatgcacacatacactaatgtgtggctcatgttta
agtatcacttactacaggacaccaatctaacagcaccgataaagtgcagagaaaacgaagccttctgcgaacatggcctggctgt
tccaattcgaaccttgccttTgtggccttgccacacaggtcttcccccgccccagggacattctaccttgaactccacactcc
actgtgccttTgccaggaagcccatctgttctttTgttctgccagaacgtgtggTgggtgctgtgtccctgcctTgggcaactggata
ttgggaagggacagtgctcacactggagtggaagtTcccaggagcagagaccttTacctctcaccctgggtactgttctcctcatgg
agcatggacggcgctgcctgaactcagtggtggcctcattctggaagccaagttatacagagtagcagtgacctcagggatgtggg
gtTcaccctcctcagccctTggccagtcctgatgggcctcagtcceaactggctaagagggtgtgggcagcttctTgtcaccctca
gggtggggaatcaccttctgtcttctttccaggaactTggatgatacgtgggtgagttcatttaccagggtgctgtagttccccctcat
caggcaggaagaagatggcggTggcattgccaggtatttcatcagcagcaccagctggacagcttcttacagtgctggatgtaa

acatgcctaaacgcttcacatagggcaccttcacgggtgggtcacctgggtccacgtggaagtcctcttctcctcggtgtccttgacttcaa
aggggtctctcccatttgcctggagagagggggaagggtgggcacaccaggggtgagtgaaggtttggaagagtgtagcaga
ataagaaacctgagtccttccctgagaagccctgagcccccttgacgacacacatccctcgaggctcagcttcacatct
gtaaaagggtgctgaaactgaccatccaagctgccgaaaaagattgtgtggggataattcaaaactagaggaagatgcagaat
ttctacatcgtggcgatgtcaggctaagagatgccatcgtggctgtgcattttattggaatcatatgtttattgaggggtgtcttggat
attacaaataaaatgttggagcatcaggcatatttggtaaccttctgtctaaggctccctgccccctgttaattggcagctcagttatc
atccagggcacaacattctgcttactattcctgagagctttctcatcctctagattggcaggggaaatgcagatgcctgagcagcc
tccccctctgccataccaacagagcttcaccatcgaggcatgcagagtggacagggggcctcagggacccctgatcccagctttct
cattggacagaaggaggagactggggctggagagggaccctggggccccactaaggccacagcagagccaggacttttagct
gtgctgactgcagcctggcttgcctccactgccctccttgcctcaagagcaaggggagcctcagagtggaggaagcagccctg
gccttgcctccacctccccctccctatgtgttttctgggacagtgaggctggcttagaatgccctggggcccccaggaccct
ggcattttaacccctcaggggcaggaaggcagcctgagatacagaagagtccatcacctgtgtatgccacacaccatccccca
cagttacgtactagtgcgaagccacgcgtccgaaggcggaatt

(SEQ ID NO:20)

Trình tự nhồi dùng trong một số phương án được gạch chân

Trình tự intron khảm delta

ggagtcgctgcgcgtgccttcgccccgtgccccgtccgccgccgctcgccgcccccggcctctgactgaccgcgttac
 tcccacaggtgagcggggcgggacggcccttctcctccgggctgtaattagcgttgggttaatgacggcttgtttcttctgtggctgc
 gtgaaagccttgaggggctccgggagctagacctctgctaaccatgttcatgccttcttctttctacagctcctgggcaacgtgct
 ggttattgtgctgtctcatcattttggcaagaattcctcgaagatccgggtacccaattccggggccccacgctgcgcatccgcg

(SEQ ID NO:21)

Yêu cầu bảo hộ

1. ARNi có chứa sợi thứ nhất và sợi thứ hai, trong đó

a) sợi thứ nhất và sợi thứ hai tạo thành cấu trúc kép;

b) sợi thứ nhất có chứa vùng dẫn, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1), hoặc trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 90% đối với SEQ ID NO:1; hoặc 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7), hoặc trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 90% đối với SEQ ID NO:7; và

c) sợi thứ hai có chứa vùng không dẫn.

2. ARNi theo điểm 1, trong đó vùng dẫn nucleic có chứa trình tự axit nucleic 5'-UGGCCGUCCAUCUUGGACCCG-3' (SEQ ID NO:1), hoặc trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 90% đối với SEQ ID NO:1; và vùng không dẫn có chứa trình tự 5'-CGGGUCCAAGAUGGACGGCCA-3' (SEQ ID NO:2), hoặc trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 90% đối với SEQ ID NO:2.

3. ARNi theo điểm 1, trong đó vùng dẫn nucleic có chứa trình tự axit nucleic 5'-AGUCGGUGUGGUUGACAAGCA-3' (SEQ ID NO:7), hoặc trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 90% đối với SEQ ID NO:7; và vùng không dẫn có chứa trình tự 5'-UGCUUGUCAACCACACCGACU-3' (SEQ ID NO:8), hoặc trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 90% đối với SEQ ID NO:8.

4. ARNi theo điểm 1, trong đó sợi thứ nhất và sợi thứ hai được liên kết với nhau bởi cầu nối ARN có khả năng tạo thành cấu trúc vòng, và trong đó cầu nối ARN có chứa từ 4 đến 20 nucleotit.

5. ARNi theo điểm 1, trong đó ARNi có chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:10, hoặc trình tự nucleotit tương đồng khoảng 90% đối với trình tự nucleotit SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:10.

6. ARNi theo điểm 1, trong đó ARNi này là ARN ức chế nhỏ (siARN), microARN (miARN), hoặc ARN cặp tóc nhỏ (shARN).

7. ARNi theo điểm 1, trong đó ARNi nhắm đích ARN mã hóa cho polypeptit liên quan đến bệnh Huntington.
8. ARNi theo điểm 7, trong đó polypeptit là huntingtin.
9. ARNi theo điểm 8, trong đó huntingtin có chứa đột biến liên quan đến bệnh Huntington.
10. Cấu trúc biểu hiện có chứa axit nucleic mã hóa cho ARNi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6.
11. Cấu trúc biểu hiện theo điểm 10, trong đó axit nucleic mã hóa cho ARNi có chứa giá đỡ miARN.
12. Cấu trúc biểu hiện theo điểm 10, trong đó axit nucleic mã hóa cho ARNi được liên kết có điều khiển với vùng khởi động, và trong đó vùng khởi động được chọn từ vùng khởi động rất sớm của virus cự bào (CMV), LTR RSV, LTR MoMLV, vùng khởi động phosphoglycerat kinaza- 1 (PGK), vùng khởi động virus khi 40 (SV40), vùng khởi động CK6, vùng khởi động transthyretin (TTR), vùng khởi động TK, vùng khởi động đáp ứng tetracyclin (TRE), vùng khởi động HBV, vùng khởi động hAAT, vùng khởi động LSP, vùng khởi động đặc hiệu gan khảm (LSP), vùng khởi động E2F, vùng khởi động telomerase (hTERT); vùng khởi động vùng tăng cường của virus cự bào/beta-actin ở gà/ β -globin ở thỏ (vùng khởi động CAG), vùng khởi động yếu tố kéo dài 1-alpha (vùng khởi động EFl-alpha), vùng khởi động β -glucuronidaza ở người, vùng khởi động β -actin ở gà (CBA), vùng khởi động LTR của virus sarcom Rous retrovirus, vùng khởi động dihydrofolat reductaza, và vùng khởi động 13-actin.
13. Cấu trúc biểu hiện theo điểm 10, trong đó cấu trúc biểu hiện còn chứa intron.
14. Cấu trúc biểu hiện theo điểm 13, trong đó vật truyền biểu hiện là vật truyền tự bổ sung và intron là intron khảm delta.
15. Cấu trúc biểu hiện theo điểm 10, trong đó cấu trúc biểu hiện còn chứa tín hiệu polyadenyl hóa, và trong đó tín hiệu polyadenyl hóa là tín hiệu polyadenyl hóa hoocmôn tăng trưởng của bò, tín hiệu polyadenyl hóa SV40, hoặc HSV TK pA.
16. Vật truyền có chứa cấu trúc biểu hiện theo điểm 10.

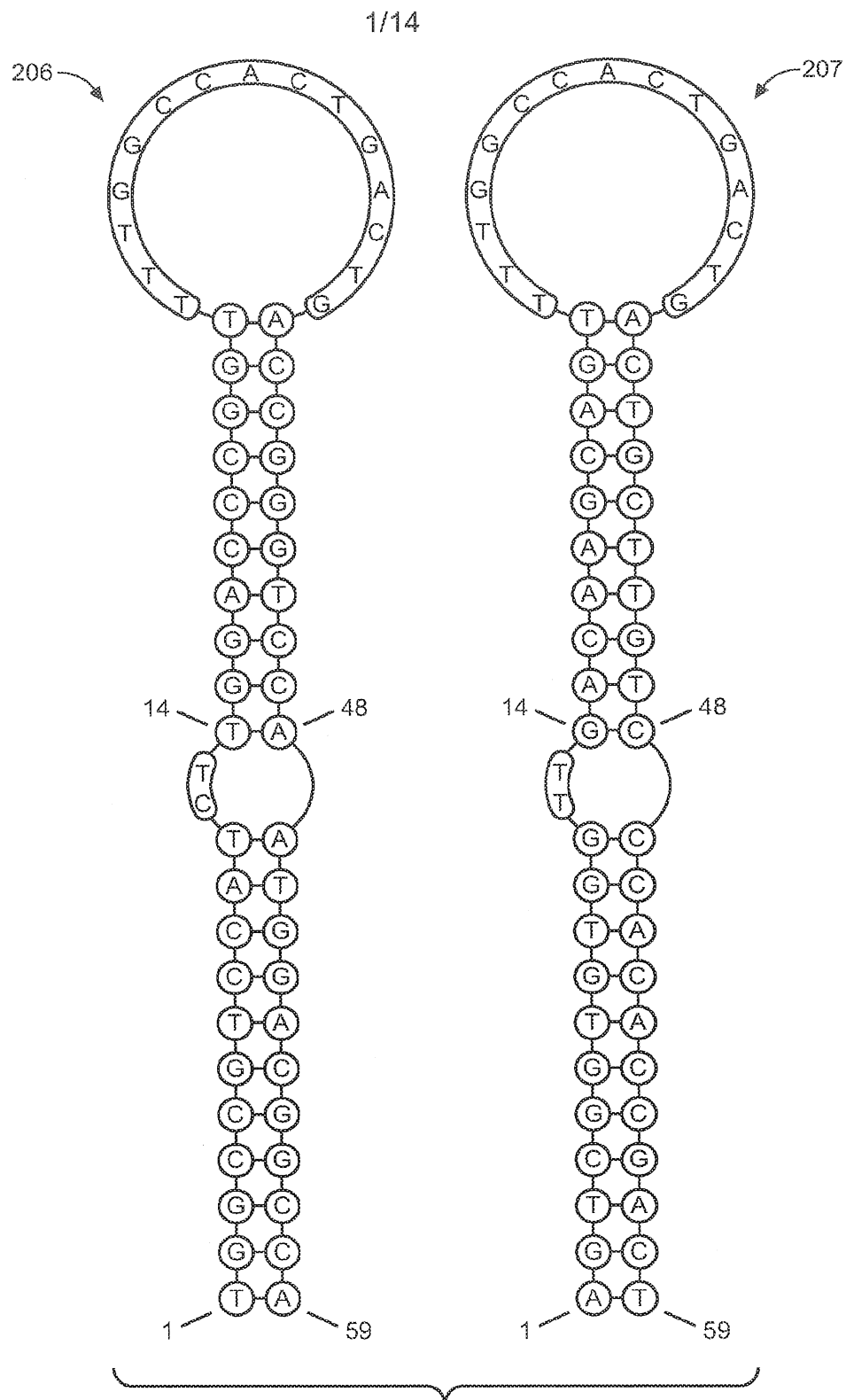
17. Vật truyền theo điểm 16, trong đó vật truyền là vật truyền virus kết hợp adeno tái tổ hợp (rAAV), vật truyền adenovirus tái tổ hợp, vật truyền lentivirus tái tổ hợp hoặc vật truyền virus herpes simplex (HSV) tái tổ hợp.
18. Vật truyền theo điểm 17, trong đó vật truyền là vật truyền rAAV.
19. Vật truyền rAAV theo điểm 18, trong đó cấu trúc biểu hiện được kẹp bởi một hoặc nhiều trình tự đoạn lặp cuối ngược chiều (ITR) AAV.
20. Vật truyền rAAV theo điểm 19, trong đó ITR AAV là các ITR kiểu huyết thanh AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV dê, AAV bò, hoặc AAV chuột.
21. Vật truyền rAAV theo điểm 19, trong đó vật truyền này là vật truyền rAAV tự bổ sung.
22. Vật truyền rAAV theo điểm 21, trong đó vật truyền có chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa cho ARNi và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa cho dạng bổ sung của ARNi, trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất có thể tạo thành cặp bazơ trong sợi với trình tự axit nucleic thứ hai dọc theo hầu hết hoặc toàn bộ chiều dài của nó.
23. Vật truyền rAAV theo điểm 22, và trong đó trình tự axit nucleic thứ nhất và trình tự axit nucleic thứ hai được liên kết bằng ITR AAV đột biến, trong đó ITR AAV đột biến này có chứa sự làm khuyết của vùng D và có chứa đột biến của trình tự phân giải đầu tận cùng.
24. Tế bào được phân lập có chứa vật truyền theo điểm 16.
25. Hạt AAV tái tổ hợp có chứa vật truyền rAAV theo điểm 19.
26. Hạt rAAV theo điểm 25, trong đó hạt virus AAV có chứa capsit AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV2-HBKO, AAVDJ8, AAVPHP.B, AAVPHP.eB, AAVBR1, AAVHSC15, AAVHSC17, AAV dê, thể khảm AAV1/AAV2, AAV bò, hoặc AAV chuột capsit kiểu huyết thanh rAAV2/HBoV1.
27. Hạt rAAV theo điểm 25, trong đó ITR có nguồn gốc từ AAV2 và capsit của hạt rAAV có nguồn gốc từ AAV1.

28. Hợp phần có chứa hạt rAAV theo điểm 25, tùy ý trong đó hợp phần này còn chứa chất mang dược dụng.
29. Bộ kit có chứa ARNi theo điểm 1, còn chứa hướng dẫn sử dụng.
30. ARNi theo điểm 1, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO:1.
31. ARNi theo điểm 1, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 90% đối với trình tự axit nucleic SEQ ID NO:1 và duy trì ít nhất là một mô típ CpG.
32. ARNi theo điểm 1, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 95% đối với trình tự axit nucleic SEQ ID NO:1 và duy trì ít nhất là một mô típ CpG.
33. ARNi theo điểm 1, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO:7.
34. ARNi theo điểm 1, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 90% đối với trình tự axit nucleic SEQ ID NO:7 và duy trì ít nhất là một mô típ CpG.
35. ARNi theo điểm 1, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 95% đối với trình tự axit nucleic SEQ ID NO:7 và duy trì ít nhất là một mô típ CpG.
36. ARNi theo điểm 2, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO:1 và vùng không dẫn có chứa trình tự SEQ ID NO:2.
37. ARNi theo điểm 2, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 90% đối với trình tự axit nucleic SEQ ID NO:1 và duy trì ít nhất là một mô típ CpG, và vùng không dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 90% đối với trình tự axit nucleic SEQ ID NO:2 và duy trì ít nhất là một mô típ CpG.
38. ARNi theo điểm 2, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 95% đối với trình tự axit nucleic SEQ ID NO:1 và duy trì ít nhất là một mô típ CpG, và vùng không dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 95% đối với trình tự axit nucleic SEQ ID NO:2 và duy trì ít nhất là một mô típ CpG.

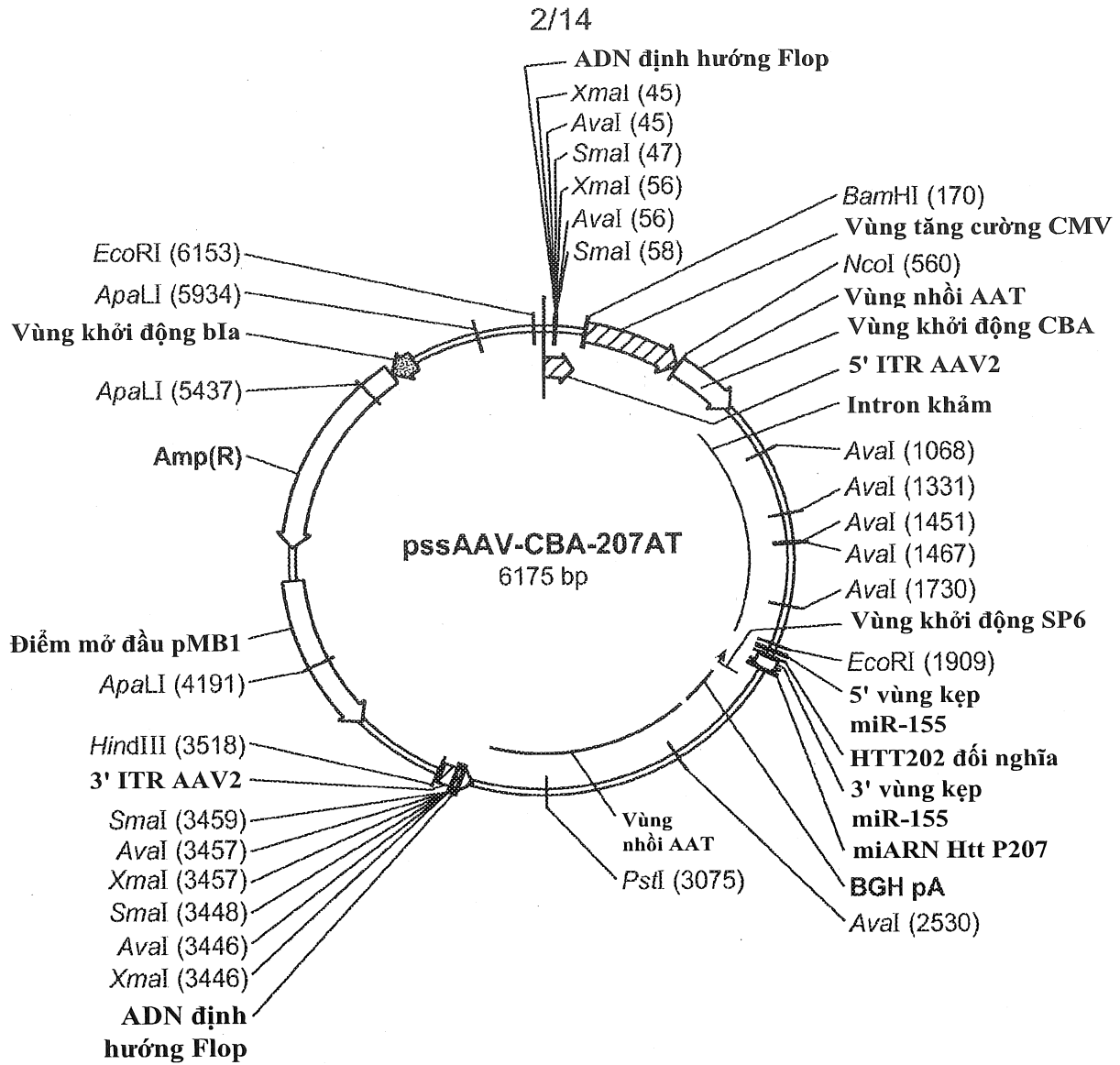
39. ARNi theo điểm 3, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO:7 và vùng không dẫn có chứa trình tự SEQ ID NO:8.

40. ARNi theo điểm 3, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 90% đối với trình tự axit nucleic SEQ ID NO:7 và duy trì ít nhất là một mô típ CpG, và vùng không dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 90% đối với trình tự axit nucleic SEQ ID NO:8 và duy trì ít nhất là một mô típ CpG.

41. ARNi theo điểm 3, trong đó vùng dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 95% đối với trình tự axit nucleic SEQ ID NO:7 và duy trì ít nhất là một mô típ CpG, và vùng không dẫn có chứa trình tự axit nucleic có độ tương đồng trình tự lớn hơn 95% đối với trình tự axit nucleic SEQ ID NO:8 và duy trì ít nhất là một mô típ CpG.

**Hình 1A**

TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

**Hình 1B**

TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

Hình 1C

- Hình 1C-1
- Hình 1C-2
- Hình 1C-3
- Hình 1C-4

Hình 1C-1

pssAAV-CBA-202AT

SmaI SmaI
 wwwwww
 XmaI XmaI
 wwwwww
 Aval Aval
 wwwwww

1 TTGGCCACTC CCTCTCTGG CGCTCGCTCG CTCACAGAG CGGCCCGGGC AAGCCCGGG CGTCGGGCGA CCTTTGGTCG CCCGGCCTCA GTGAGCGAGC
 AACCGGTGAG GGAGAGACGC GCGAGCGAGC GAGTGACTCC GCGGGGCGCG TTTCGGGCCC GCAGCCCGCT GGAACCCAGC GGGCCGGAGT CACTCGCTCG

BamHI
 wwwwww

101 GAGCGCGCAG AGAGGGAGTG GCCAACTCCA TCACCTAGGG TTCTCTCTATA TTACCTGTGT AGGCAATTGG ATCCCGGACC GTCGACATTG ATTATTGACT
 CTCGCGCGTC TCTCCCTCAC CGGTTGAGGT AGTGATCCCC AAGGAGATAT AATGGAGCGA TCCGTAAACC TAGGGCCTGG CAGCTGTAAC TAATAACTGA

201 AGTTATTAAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTTATA GCGCATATAT GGAGTTCCGC GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC
 TCAATAATTA TCATTAGTTA ATGCCCCAGT AATCAAGTAT CCGGTATATA CCGCAAGGCG CAATGTATTG AATGCCATTT ACCGGGCGGA CCGACTGGCG

301 CCAACGACCC CCGCCCATTT ACCTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA TGGGTGGAGT ATTTACGGTA
 GGTGTCTGGG GCGGGGTAAC TGCAGTTAAT ACTGCATACA AGGTAATCAT TCGGTTATAT CCTGAAAGGT AACTGCAGTT ACCCACCTCA TAAATGCCAT

401 AACTGCCCC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AATGGGCGG CCTGGCATTG TCCCCAGTAC
 TTGACGGGTG AACCGTCAATG TAGTTTCAAT AGTATACGGT TCATGCGGGG GATAACTGCA GTTACTGCCA TTACCGGGC GGACCGTAAT ACGGTCATG

4/14

NcoI wwwwww		
501	ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC ATGGTCGAGG TGAGCCCCAC GTTCTGCTTC ACTCTCCCCA TACTGGAATA CCTGAAAGG ATGAACCGTC ATGATGATGC AFAATCAGTA GCGATAATGG TACCAGCTCC ACTCGGGGTG CAAGACGAG TGAGAGGGGT	
601	TCCTCCCCCC CTCGCCACCC CCAATTTTGT ATTATTTTAT TTTTAAATTA TTTTGTGCAG CGATGGGGG GGGGGGGGG GGGGGGGGG CGCCAGGCGG AGAGGGGGG GAGGGTGGG GGTAAACA TAAATAATA AAAAATTAAT AAAACACGTC GCTACCCCG CCCCCCCCC CCGGTCCGCC	
701	GGGGGGGGG GGGAGGGG GGGGGGGG GAGGGGAGA GGTGGGGGG CAGCCAATCA GAGCGGGCG CTCGAAAGT TTCCTTTTAT GGCAGGGGG CGCCCCGCC CCGTCCCCG CCGCGCCCC CTCGCCCTCT CCACGCCGCC CTCGGTTAGT CTCGCCGCG GAGGCTTTCA AAGGAAATA CCGCTCCGCC	
801	CGGGGGGGG GGCCTATAA AAAGCAAG GCGGGGGG CCGAGTCGC TCGCGCTGC CTTCGCCCG TCGCGCGGC CGCGCGCGC TCGCGCGCGC GCGCGCGCG CCGGATATT TTTCGCTTCG CCGCGCGCC GGCCTCAGG ACGCGGGG GAAGCGGGG ACGGGGGGG AGCGCGGGG	
901	CGCCCGGGT CTGACTGACC GCGTACTCC CACAGGTGAG CCGCGGGGAC GGCCTTCTC CTCGGGGCTG TAATTAGCG TTGGTTTAT GACGGCTTGT GCGGGGCCA GACTGACTGG CGCAATGAGG GTGCTACTC GCGCGCTCT CCGGGAAG GAGGCCCGAC ATTAATCGG AACCAATTA CTGCCGAAACA	Aval wwwwww
1001	TTCTTTTCTG TGGCTCCGTG AAAGCTTGA GGGCTCCGG GAGGCCCTT TGTGCGGGG GAGCGGCTCG GGGGTGCGT GCGTGTGTGT GTCCGTGGGG AAGAAAGAC ACCGAGCAC TTTCGGAAT CCGCGAGGC CTCGCGGAA ACACGCCCG CTCGCCGAG CCCCCACGCA CGCACACACA CACGCACCC	
1101	AGCGCGGCT GCGCTCCG GCTGCGCGG GGTGTGAGC GCTGCGGGG CTCTGTGCG TCGCGAGTGT GCGCGAGGG AGCGGGGGG TCGCGGGCA CGCGAGGG CGACGGCG CGACACTCG CGACGCCCG GCGCGCGCC GAAACACGG AGCGTCAACA CGCGTCCCC TCGCGCGCG	
1201	GGGGCGGTG CCGCGGTGC GGGGGGGCT GCGAGGGGA CAAGGCTGC GTGCGGGGTG TGTGCGTGG GGGGTGACA GGGGTGTGG GCGCGTCCGT CCCCGCCAG GGGGCGCAG CCCCCCGA CGTCCCTCT GTTCCGAG CACGCCCCAC ACACGACCC CCCCCTCGT CCCCCACAC CGCGCAGCA	
1301	CGGGCTGAA CCCCCCTGC ACCCCCTCC CCGAGTTGCT GAGCACGGC CGGCTTCGG TCGGGGGCTC CGTACGGGC GTGGCGGGG GCTCGCCCTG GCGCGAGTT GGGGGGAG TGGGGGAG GGTCAACGA CTCGTGCGG GCGAAGCCC AGCCCCGAG GCATGCCCG CACCGGCC CGAGCGGCAC	
1401	CGGGCGGG GGTGCGGCA GGTGGGGTG CCGGGCGGG CCGGGCCGCC TCGGGCCGG GAGGCTCGG GGGAGGGGG CGGGGGCCC CGGAGCGCG GGCCCGGCC CACCGCGT CACCCCCAC GCGCGGCC CCGCGGGCC AGCCCGGCC CTCGCCAGC CCTCCCCG CCGCGGGGG GCGTCCGCC	Aval wwwwww
1501	GCGGTGTG AGGCGGGG AGCGCAGC ATTGCTTTT ATGTAATCG TCGAGAGGG CCGAGGACT TCCTTTGTCC CAAATCTGT GCGAGCGGAA CGCGACAG TCGCGCGCG TCGGCTCGG TAACGAAA TACCATAGC ACCTCTCC CCGTCCCTGA AGGAAACAG GTTTAGAC GCTTCGGCTT	Aval wwwwww

Hinh 1C-2

TRANG THAY THÉ (ĐIỀU 26)

5/14

1601	ATCTGGGAGG CGCGCGCGCA CCCCCTCTAG CGGGCGCGGG GCGAAGCGGT GCGGCGCGGG CAGGAAGGAA ATGGCGGGG AGGCCTTCG TCGTCTGCGG TAGACCTTCC GCGCGGGGCT GGGGAGATC GCGCGCGGCC GCGCGCGGCC CGCTTCGCA CGCGCGGCC GTCCCTCTT TACCGGCC TCCCGAAGC ACGCAGCGG
Aval www	
1701	CGCGCGGTC CCTTCTTCC TCTCTCTCC TCTCCAGCT CGGGCTGTC CGCGGGGGA CGCTGCTT CGGGGGGAC GGGGAGGG GGGTTCGGC TTCTGGGCTG GCGCGGCGAG GGAAGAGGG AGAGTCTGA GCGCGGACAG GCGCGGCTT GCGAGGAA GCGCGGCTG CCGCTGCGG CCGCAGCGG AAGACCGAC
Aval www	
1801	TGACCGGGG CTCTAGAGC TCTGCTAAC ATGTTCAAG CTTCTCTCTT TTCCTACAG TCCTGGGAA CGTCTGCTT ATTCTGCTGT CTCATCATTT ACTGGCGGCC GAGATCTCG AGACGATTG TACAAGTAG GAAGAAGAA AAGGATGCG AGACCGCTT GCAGGACAA TAACGACA GAGTACTAAA
ECORI www	
1901	TGGCAAAGAA TTCTTCGAAA GATCTGCTAG CCTGGAGGCT TGTGAAGG TGTATGCTGA GTCGGTGGG TTGACAAGCA GTTTTGGCCA CTGACTGACT ACCGTTCTT AAGAAAGCTT CTAGACGATC GGACCTCGA ACGACTTCG ACATACGACT CAGCCACACC AACTGTTCT CAAAACCGT GACTGACTGA
bắt đầu của Sợi Dẫn 207	
2001	GCTTGTCOA CACCGACTCA GGACAAGG CCTGTTACTA GCACTCACAT GGAACAATG GCCATGCATC TAGAGGGCC TATTCTATAG TGTCACTAA CGAACAGGG GTGGCTGAGT CCGTGTCTC GGACAATGAT CGTGAGTGA CCTTGTTAC CGTACGTA ATCTCCGGG ATAAGATATC ACAGTGGATT
2101	ATGCTAGAG TCGCTGATCA GCGTCTGACT TGCCTTCTAG TTGCCAGCA TCTGTTGTTT GCGCTCCCTT TCGACCTCTG TCGACCTCTG AAGTGGCCAC TACGATCTG ACGGACTAGT CCGAGCTGAC ACGGAAGATC AACGGTCTG AGACAACAA CGGGAGGGG GCACGGAAG AACTGGACC TTCCACGGTG
2201	TCCCACTGC CTTTCTTAAT AAAATGAGGA AATTGCATC CATTGTCTGA GTAGGTGTA TTCTATTCTG GGGGTGGG TGGGAGGA CAGCAAGGGG ACGGTGACAG GAAAGATTA TTTTACTCCT TTAACGTAGC GTAACAGACT CATCCACAGT AAGATAAGAC CCGCACCC ACCTCGCTT GTCGTTCCCT
2301	GAGGATTGG AAGACAATAG CAGGCTGCT GGGAGCTAG AGTCGACCG ACCGTGGAA GTCCTCTTCC TCGGTGCTT TGACTTCAA GGGTCTCTCC CTCCTAACCC TTCTGTTATC GTCCGTACGA CCGCTCGATC TCAGTGGCC TGGCCACCT CAGGAGAAG AGCCACAGGA ACTGAGTTT CCCAGAGAG
2401	CATTGCTG GAGAGAGGG AAGTGGGA TCACCAGGG TGAGTGAAG TTTGGAAGG TGTAGCAGAA TAAGAAACA TGAGTCCCT CCTGAGAGG GTAAACGGAC CTCTCTCCC TTCCACCGCT AGTGTCCC ACTCATTC ACATCTCTT ATTCTTGGT ACTCAGGGA GGGACTCTTC
Aval www	
2501	CCCTGAGCC CCTGACGAC ACACATCCCT CGAGGCTCAG CTTTATCATC TGTAAAAGGT GCTGAAACTG ACCATCCAAG CTGCCGAAA AGATTGTGTG GGGACTCGG GGAAGTCTG TGTGTAGGA GCTCCGAGTC GAAGTAGTAG ACATTTTCCA CGACTTTGAC TGGTAGTTC GACGGCTTTT TCTAACACAC

Hình 1C-3

TRANG THAY THÉ (ĐIỀU 26)

6/14

2601	GGGATAATTC AAAACTAGAG GAAGATGCAG AATTTCACAA TCGTGGCGAT GTCAGGCTAA GAGATGCCAT CGTGGCTGTG CATTTTATTT GGAATCATAT CCCTATTAAAG TTTTGATCTC CTTCTACGTC TTAAAGATGT AGCACCGCTA CAGTCGGATT CTCTACGGTA GCACCGACAC GTAAATAATA CCTTAGTATA
2701	GTTTATTGA GGGTGTCTTG CATATTACAA ATAAATGTT GGAGCATCAG GCATATTGG TACCTTCTGT CTAAGGCTCC CTGCCCTTGG TTAATTGGCA CAATAAACT CCCACAGAC CTATAATGTT TATTTTACAA CCTCGTACTC CGTATAAAC ATGTAAGACA GATTCGGAGG GACGGGGAAC AATTAACCGT
2801	GCTCAGTTAT TCATCCAGGG CAACACATTCT GCTTACTATT COTGAGAGCT TTCCATCATCC TCTAGATTGG CAGGGGAAAT GCAGATGCTT GAGCAGCCTC CGAGTCAATA AGTAGGTCCC GTTTGTAAGA CGAATGATAA GGACTCTCGA AAGGACTAGG AGATCTAAC GTCCCCCTTTA CGTCTACGGA CTCGTCCGAG
2901	CCCTCTGCCA TACCAACAGA GCTTCACCAT CGAGGCATGC AGAGTGGA CA GGGGCTCAG GGACCCCTGA TCCCAGCTTT CTCATTGGAC AGAAGGAGGA GGGAGACGGT ATGTTGTCT CAAAGTGGTA GCTCCGTACG TCTCACCTGT CCCCAGAGTC CCTGGGGACT AGGTGCGAAA GAGTAACCTG TCTTCTCTCT
PstI wwwwwww	
3001	GACTGGGGCT GGAGAGGGAC CTGGGCCCC ACTAAGGCCA CAGCAGAGCC AGGACTTTAG CTGTGCTGAC TGCAGCCTGG CTTGCCTCCA CTGCCCTCCT CTGACCCCGA CCTCTCCCTG GACCCGGGG TGATTCGGT TCCGTCTCGG GACACGACTG ACCTCGGACC GAAACGGAGT GACGGGAGGA
3101	TTGCCTCAAG AGCAAGGGAG COTCAGAGTG GAGGAAGCAG CCCCTGGCCT TGCCTCCAC CTCCCTCCC CTATGCTGTT TTCTTGGAC AGTGGGAGCT AACGAGTTC TCGTTCCCTC GGAATCTCAC CTCCTTCGTC GGGGACCGGA ACGGAGGCTG GAGGGGAGG GATACGACAA AAGGACCTG TCACCTCGA
3201	GGCTTAGAAT GCCCTGGGC CCCAGGACC CTGGCAATTT AACCCCTCAG GGGCAGGAAG GCAGCCTGAG ATACAGAAGA GTCCATCACC TGCTGTATGC CCGAATCTTA CGGACCCCG GGGTCTCTGG GACCGTAAA TTGGGAGTC CCCGTCTTC CGTCGACTC TATGCTTCTT CAGGTAGTG ACACATACG
3301	CACACACCAT CCCACAGTT ACCTACTAGT TCGAAGCCAC GCGGACCGTT ATAGTTACGA GGAACCCCTA GTGATGGAGT TGCCCACTCC CTCTCTCGCG GTGTGTGGTA GGGGTCTCAA TGCATGATCA AGCTTCGGTG CGCCTGGCAA TATCAATGCT CCTTGGGGAT CACTACCTCA ACCGGTGAGG GAGAGACGGC
SmaI wwwwwww	
XmaI wwwwwww	
AvaI wwwwwww	
3401	GCTCGCTCGC TCACGTAGGC CGGCGACCA AAGGTGCCC GAGGCCGGG CTTTGCCCGG GCGGCTCAG TGAAGAGGG AGCGGCGAGA GAGGGAGTGG CGAGCGAGCG AGTGACTCG GCCCGTGGT TTCCAGCGG CTGCGGGCC GAAACGGGCC CGCCGGAGTC ACTGCTCGC TCGCGCTCT CTCCTCACC
3501	CCAAAGATCT GGTTCTTACA

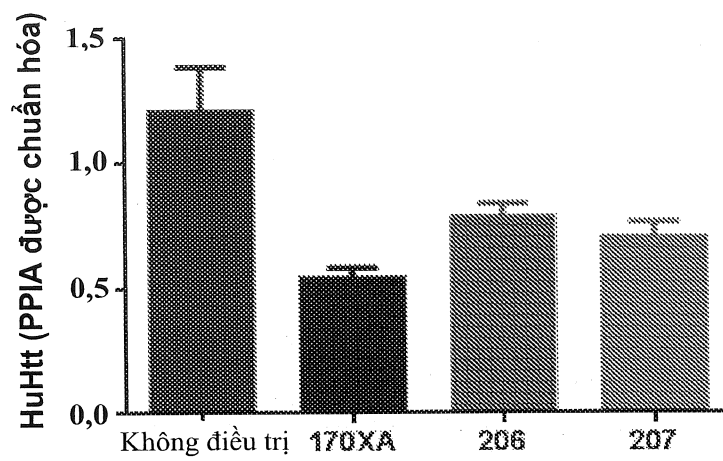
Hình 1C-4

TRANG THAY THỂ (ĐIỀU 26)

7/14

Hình 2

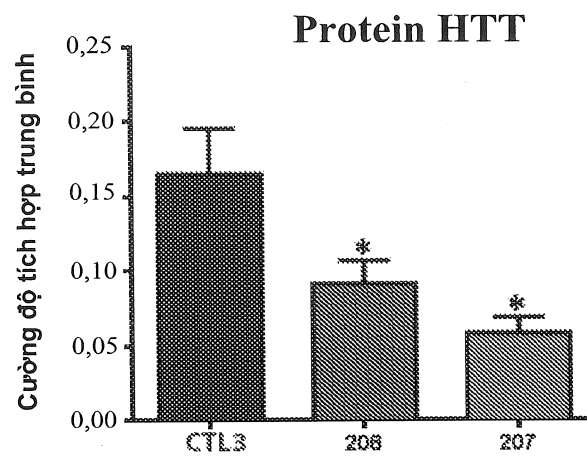
**mARN Htt ở người
Chuyển nạp HEK293T**



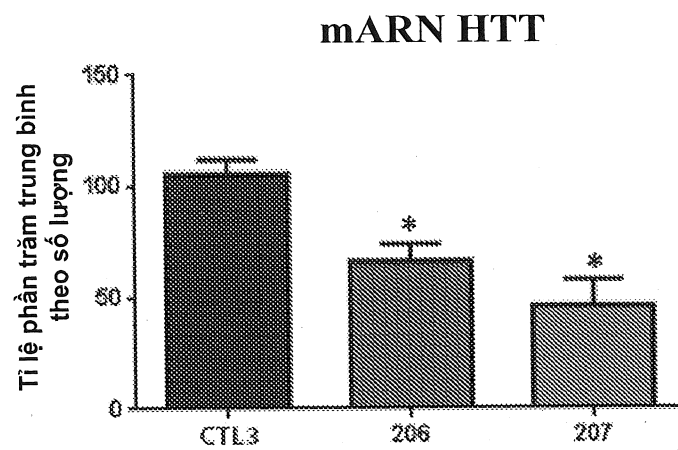
TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

8/14

Hình 3A



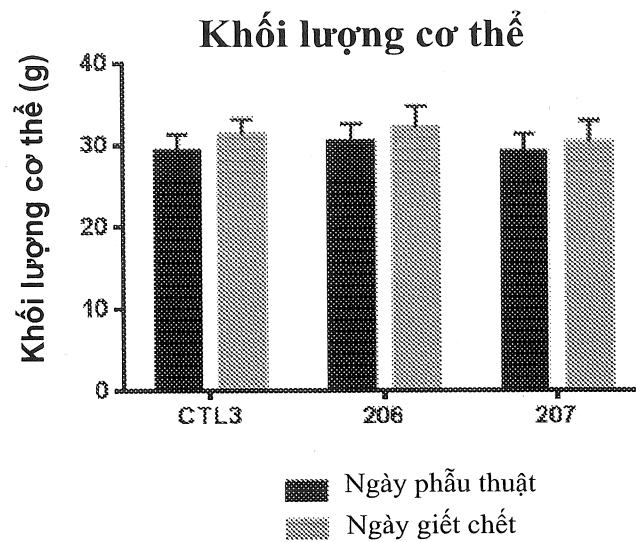
Hình 3B



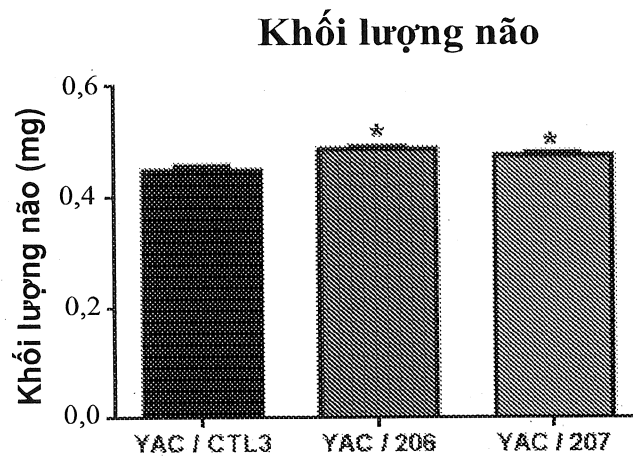
TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

9/14

Hình 4A



Hình 4B



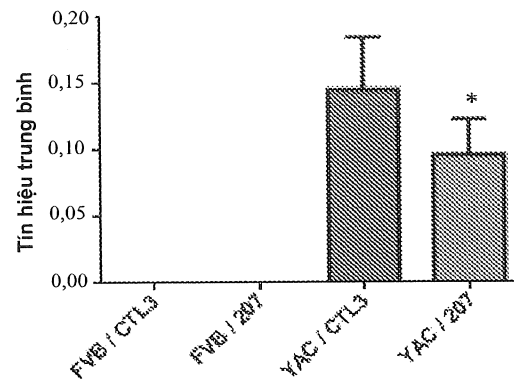
*Khác biệt đáng kể đối với CTL3 theo ANOVA, Thử nghiệm Tukey hậu kiểm

TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

10/14

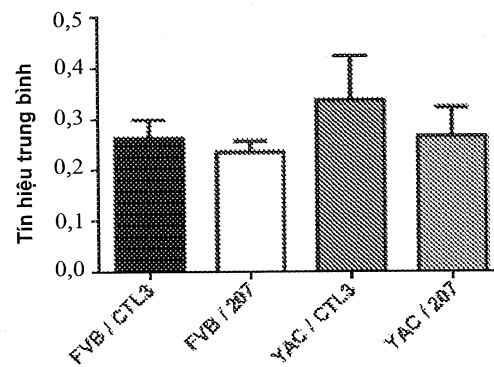
Hình 5A Protein HTT ở người

Tín hiệu Htt người trung bình được chuẩn hóa đối với β -tubulin



Hình 5B Protein HTT ở chuột nhắt

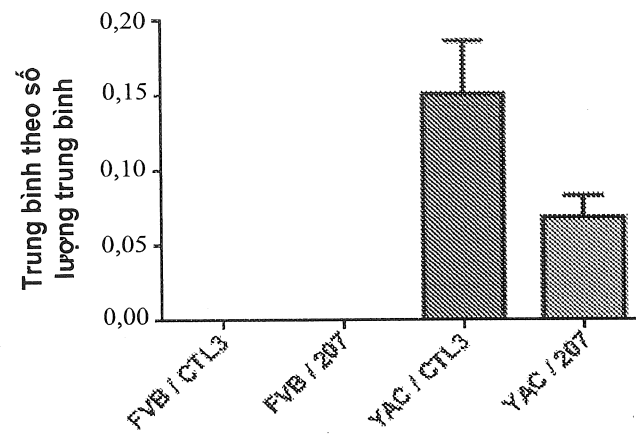
Tín hiệu Htt chuột trung bình được chuẩn hóa đối với β -tubulin



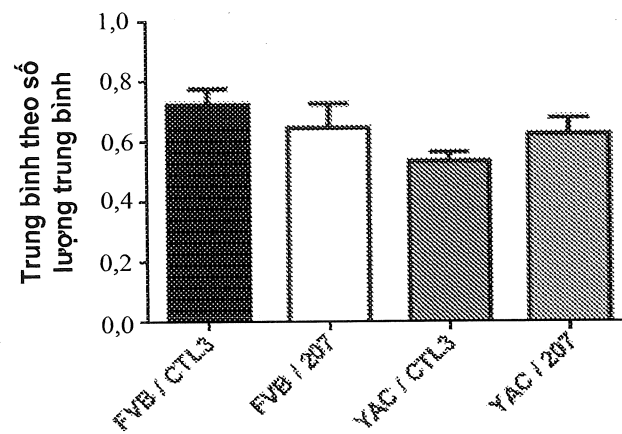
TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

11/14

Hình 5C

mARN Htt người

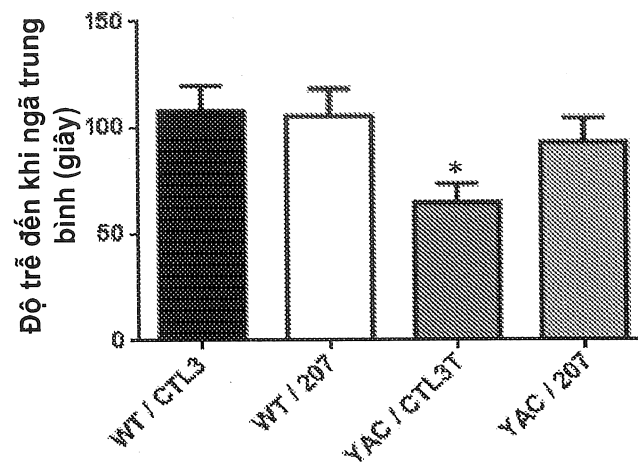
Hình 5D

mARN Htt chuột

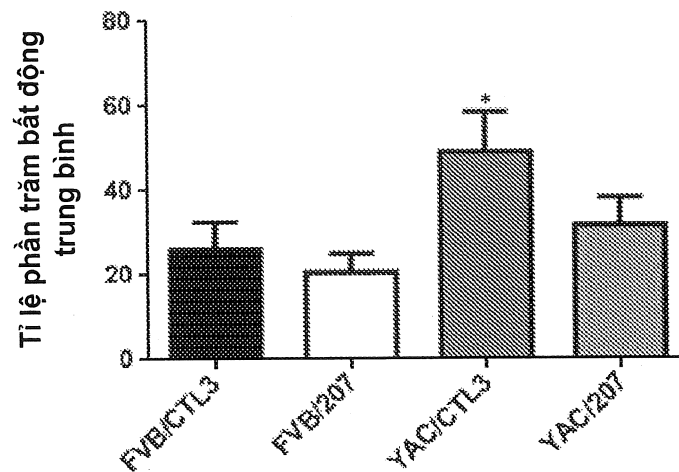
TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

12/14

Hình 6A
Thử nghiệm thanh quay



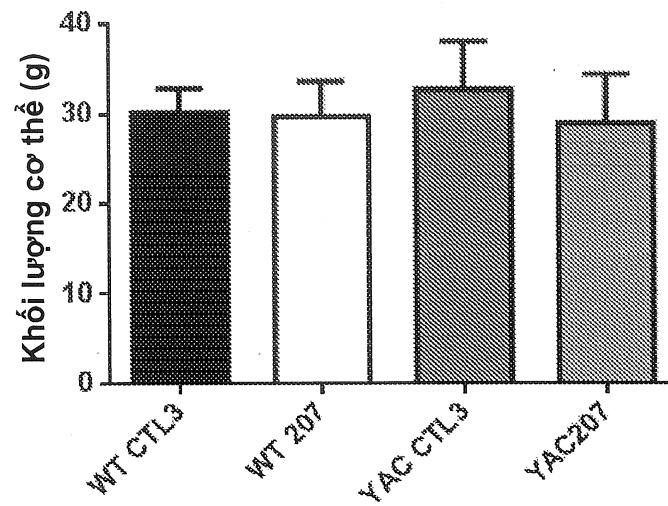
Hình 6B
Thử nghiệm bơi Porsolt



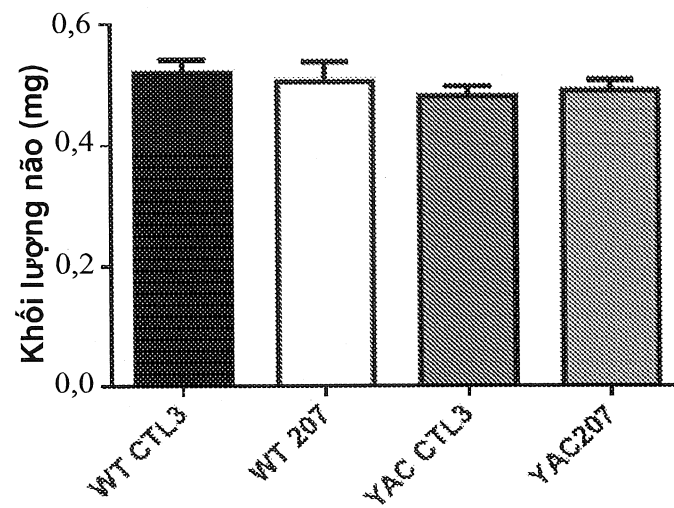
TRANG THAY THẺ (ĐIỀU 26)

13/14

Hình 7A

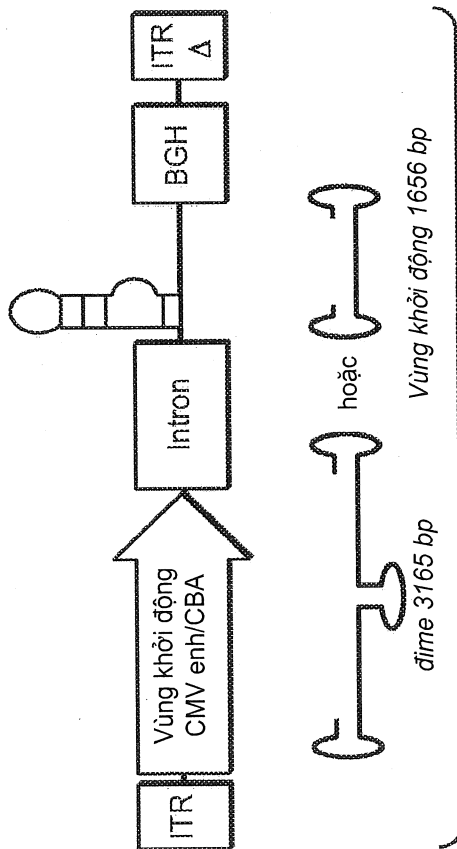
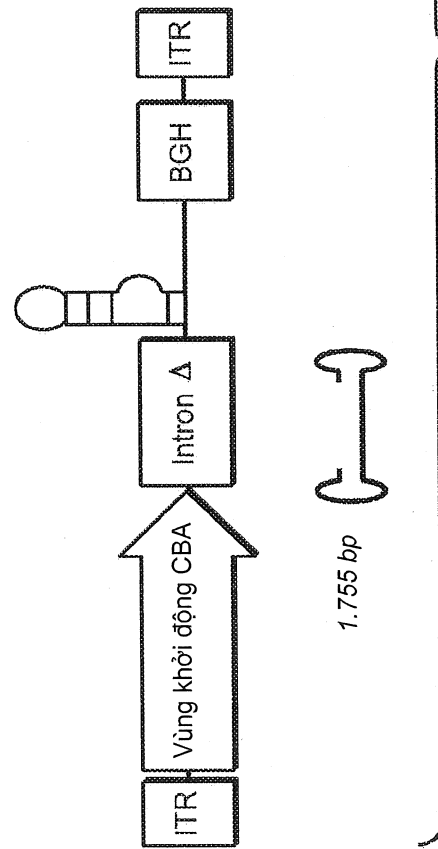
Khối lượng cơ thể khi giết chết

Hình 7B

Khối lượng não khi giết chết

TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

14/14

**Hình 8****Hình 9**

TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> GENZYME CORPORATION

<120> ARNi, CẤU TRÚC BIỂU HIỆN CÓ CHỨA AXIT NUCLEIC MÃ HÓA CHO ARNi VÀ VẬT TRUYỀN CÓ CHỨA CẤU TRÚC NÀY

<130> 159792014740

<140> Không được chỉ định

<141> Đồng thời ở đây

<150> US 62/561,843

<151> 2017-09-22

<160> 22

<170> FastSEQfor Windows Phiên bản 4.0

<210> 1

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 1

uggccgucca ucuuggaccc g

21

<210> 2

<211> 21

<212> ARN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2

cgguccaag auggacggcc a

21

<210> 3

<211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3

gtggccgtcc atcttggacc cggttttggc cactgactga ccgggtccaa tggacggcca 60

<210> 4

<211> 60

<212> ARN
 <213> Trình tự Nhân tạo

 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

 <400> 4
 guggccgucc aucuuggacc cgguuuuggc cacugacuga ccggguccaa uggacggcca 60

 <210> 5
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

 <400> 5
 tgctgtggcc gtccatcttg gaccgggtt tggccactga ctgaccgggt ccaatggacg 60
 gcca 64

 <210> 6
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

 <400> 6
 cctgtggccg tccattggac ccggtcagtc agtggccaaa accgggtcca agatggacgg 60
 ccac 64

 <210> 7
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự Nhân tạo

 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

 <400> 7
 agucggugug guugacaagc a 21

 <210> 8
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Trình tự Nhân tạo

 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

 <400> 8
 ugcugucaaa ccacaccgac u 21

<210> 9
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 9
 agtcggtgtg gttgacaagc agttttggcc actgactgac tgcttgctcc acaccgact 59

<210> 10
 <211> 59
 <212> ARN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10
 agucggugug guugacaagc aguuuuggcc acugacugac ugcuuugucc acaccgacu 59

<210> 11
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 11
 tgctgagtcg gtgtggttga caagcagttt tggccactga ctgactgctt gtcccacacc 60
 gact 64

<210> 12
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12
 cctgagtcgg tgtgggacaa gcagtcagtc agtggccaaa actgcttgct aaccacaccg 60
 actc 64

<210> 13
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13
guuuuggcca cugacugac 19

<210> 14
<211> 132
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14
ctggaggcctt gctgaaggct gtatgctgtt agacaatgat tcacacgggtg ttttggccac 60
tgactgacac cgtgtgtcat tgtctaacag gacacaaggc ctgttactag cactcacatg 120
gaacaaatgg cc 132

<210> 15
<211> 113
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15
ccactccctc tctgcgcgt cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgcac 60
gccccggcctt tgccccggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag gga 113

<210> 16
<211> 3510
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgcccgggc aaagcccggg 60
cgtcgggcga cctttggctg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg 120
gccaactcca tctactagggg ttctctata ttacctgct aggcattgg atcccggacc 180
gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 240
gccccatata ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgccct ggctgaccgc 300
ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 360
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtag 420
atcaagtgtg tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccc 480
cctggcatta tgcccagtag atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 540
tattagtcac cgctattacc atggctcagg tgagccccac gttctgcttc actctcccca 600
tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttat tttttaatta ttttgtgcag 660
cgatgggggc gggggggggg gggggggcgc cgcagggcgg ggcggggcgg ggcgaggggc 720
ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt 780
ttccttttat ggcgagggcg cggcggcggc ggccctataa aaagcgaagc gcgcggcggg 840
cgggagtcgc tgcgcgctgc cttcgccccg tgccccgctc cgccgcccgc tcgcgcccgc 900
cgccccggct ctgactgacc gcgttactcc cacagggtgag cgggcggggc ggcccttctc 960
ctccgggctg taattagcgc ttggtttaat gacggcttgt ttcttttctg tggctgcgtg 1020
aaagccttga ggggctccgg gagggccctt tgtgcggggg gagcggctcg ggggtgcgt 1080

```

gcgtgtgtgt gtgcgtgggg agcgccgcgt gcggctccgc gctgcccggc ggctgtgagc 1140
gctgcgggcg cggcgcgggg ctttgtgcgc tccgcagtgt gcgcgagggg agcgcgggcg 1200
ggggcggtgc cccgcggtgc ggggggggct gcgaggggaa caaaggctgc gtgcgggggtg 1260
tgtgcgtggg ggggtgagca ggggggtgtg gcgcgtcggg cgggctgcaa cccccctgc 1320
acccccctcc ccgagttgct gagcacggcc cggcttcggg tgcggggctc cgtacggggc 1380
gtggcgcggg gctcgccgtg ccgggcgggg ggtggcggca ggtgggggtg ccgggcgggg 1440
cggggccgccc tcgggcgggg gagggctcgg gggaggggag cggcgggccc cggagcgccg 1500
gcggctgtcg agcgcgggcg agccgcagcc attgcctttt atggtaatcg tgcgagaggg 1560
cgcagggact tcctttgtcc caaatctgtg cggagccgaa atctgggagg cgccgccgca 1620
ccccctctag cgggcgcggg gcgaagcggg gcggcgccgg caggaaggaa atggggcggg 1680
agggccttcg tgcgtcgccg cgccgccgtc cccttctccc tctccagcct cgggggtgtc 1740
cgcgggggga cggctgcctt cgggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg 1800
tgaccggcgg ccttagagcc tctgctaacc atgttcatgc cttctcttt ttcttacagc 1860
tcctgggcaa cgtgctgggt attgtgctgt ctcacatatt tggcaaagaa ttcttcgaaa 1920
gatctgctag cctggaggct tgcgtgaaggc tgtatgctga gtcgggtgtg ttgacaagca 1980
gttttgccca ctgactgact gcttgtccca caccgactca ggacacaagg cctgttacta 2040
gactcacat ggaacaaatg gccatgcatc tagagggccc tattctatag tgtcacctaa 2100
atgctagagc tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt 2160
gccccctccc cgtgccttcc ttgaccctgg aagggtccac tcccactgtc ctttcctaat 2220
aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg ggggggtggg 2280
tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggagctag 2340
agtgcaccgg accggtggaa gtcctcttcc tcggtgtcct tgacttcaa gggctctctc 2400
catttgcctg gagagagggg aagggtggga tcaccagggg tgagtgaagg tttggaagag 2460
tgtagcagaa taagaaacca tgagtcctcc cctgagaag cctgagccc cttgacgac 2520
acacatccct cgaggctcag cttcatcatc tgtaaaagg gctgaaactg accatccaag 2580
ctgccgaaaa agattgtgtg gggataattc aaaactagag gaagatgcag aatttctaca 2640
tcgtggcgat gtcaggctaa gagatgccat cgtggctgtg catttttatt ggaatcatat 2700
gtttatttga ggggtgtctg gatattacaa ataaaatgtt ggagcatcag gcatatttgg 2760
taccttctgt ctaaggctcc ctgcccttg ttaattggca gctcagttat tcatccaggg 2820
caaacattct gcttactatt cctgagagct ttcctcatcc tctagattgg caggggaaat 2880
gcagatgcct gagcagcctc ccctctgcca taccaacaga gcttcacat cgaggcatgc 2940
agagtggaca ggggcctcag ggaccctga tcccagcttt ctcatggagc agaaggagga 3000
gactggggct ggagggggac ctgggcccc actaaggcca cagcagagcc aggactttag 3060
ctgtgctgac tgcagcctgg cttgctcca ctgccctcct ttgcctcaag agcaaggag 3120
cctcagagtg gaggaagcag cccctggcct tgcctccac ctcccctccc ctatgctgtt 3180
ttcctgggac agtgggagct ggcttagaat gccctggggc cccagggacc ctggcatttt 3240
aaccctcag gggcaggaag gcagcctgag atacagaaga gtccatcacc tgctgtatgc 3300
cacacaccat cccacagtt acgtactagt tcgaagccac gcggaccgtt atagttagca 3360
ggaacccta gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgtcgc tactgaggc 3420
cgggcgacca aaggctgcc gacggccggg ctttgccgg gcggcctcag tgagcgagcg 3480
agcgcgcaga gagggagtgg ccaaagatct 3510

```

<210> 17

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 17

agtcggtgtg gttgacaagc a

21

<210> 18

<211> 989

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 18

```

gtggaagtcc tcttcctcgg tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctggaga 60
gaggggaagg tgggcatcac caggggtgag tgaaggtttg gaagagtgtg gcagaataag 120
aaaccatgag tccccctcct gagaagccct gagccccctt gacgacacac atccctcgag 180
gctcagcttc atcatctgta aaagggtgctg aaactgacca tccaagctgc cgaaaaagat 240
tgtgtgggga taattcaaaa ctagaggaag atgcagaatt tctacatcgt ggcgatgtca 300
ggctaagaga tgccatcgtg gctgtgcatt tttattggaa tcatatgttt atttgagggt 360
gtcttgata ttacaaataa aatgttggag catcaggcat atttggtacc ttctgtctaa 420
ggctccctgc ccttgtttaa ttggcagctc agttattcat ccagggcaaa cattctgctt 480
actattcctg agagctttcc tcatcctcta gattggcagg ggaaatgcag atgcctgagc 540
agcctccccct ctgccatacc aacagagctt caccatcgag gcatgcagag tggacagggg 600
cctcagggac cctgatccc agctttctca ttggacagaa ggaggagact ggggctggag 660
agggacctgg gccccacta aggccacagc agagccagga ctttagctgt gctgactgca 720
gcctggcttg cctccactgc cctcctttgc ctcaagagca agggagcctc agagtggagg 780
aagcagcccc tggccttgcc tcccacctcc cctcccctat gctgttttcc tgggacagtg 840
ggagctggct tagaatgccc tggggcccc aggaccctgg cattttaacc cctcaggggc 900
aggaaggcag cctgagatac agaagagtc atcacctgt gtatgccaca caccatcccc 960
acagttacgt actagttcga agccacgcg 989

```

<210> 19

<211> 3510

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 19

```

aaccggtgag ggagagacgc gcgagcgagc gagtgactcc ggcgggcccg tttcgggccc 60
gcagcccgcgt ggaaaccagc gggccggagt cactcgctcg ctgcgcgctc tctccctcac 120
cggttgaggt agtgatcccc aaggagatat aatgggacga tccgttaacc tagggcctgg 180
cagctgtaac taataactga tcaataatta tcattagtta atgccccagt aatcaagtat 240
cgggtatata cctcaaggcg caatgtattg aatgccattt accgggcgga ccgactggcg 300
ggttgctggg ggcgggtaac tgcagttatt actgcataca agggatatcat tgcggttatc 360
cctgaaagggt aactgcagtt acccacctca taaatgccat ttgacgggtg aaccgtcatg 420
tagttcacat agtatacggg tcatgcgggg gataactgca gttactgcca tttaccgggc 480
ggaccgtaat acgggtcatg tactggaata ccctgaaagg atgaaccgtc atgtagatgc 540
ataatcagta gcgataatgg taccagctcc actcgggggt caagacgaag tgagaggggt 600
agaggggggg gaggggtggg gggttaaaaca taaataaata aaaaattaat aaaacacgtc 660
gctacccccg ccccccccc cccccgcgc gcggtccgcc ccgccccgcc ccgctccccg 720
ccccgccccg ctccgcctct ccacgccgcc gtcggttagt ctgcgcgcgc gaggctttca 780
aaggaataa cgcctccgcc gccgccgccg ccgggatatt tttcgttctg cgcgccgccc 840
gccctcagcg acgcgcgacg gaagcggggc acggggcgag gcggcgggcg agcgcggcgg 900
gcggggccga gactgactgg cgcaatgagg gtgtccactc gcccgccttg ccgggaagag 960
gagggccgac attaatcgcg aaccaaatta ctgccgaaca aagaaaagac accgacgcac 1020
tttcggaact ccccgaggcc ctccgggaa acacgcccc ctcgccgagc cccccacgca 1080
cgcacacaca cacgcacccc tcgcggcgca cgccgaggcg cgacggggcg ccgacactcg 1140
cgacggcgcc gccgcgcccc gaaacacgcg aggcgtcaca cgcgctcccc tcgcgccggc 1200
ccccgccacg gggcgccacg cccccccga cgctcccctt gtttccgacg caccggccac 1260

```

```

acacgcaccc cccactcgt cccccacacc cgcgacgcca gcccgcgtt gggggggacg 1320
tggggggagg ggctcaacga ctctgtccgg gccgaagccc acgccccgag gcatgccccg 1380
caccgcgccc cgagcggcac ggcccgcgcc ccaccgccgt ccacccccac ggcccgcgcc 1440
gccccggcgg agcccggccc ctcccagacc ccctccccgc gccgcgggg gcctcgcggc 1500
cgccgacagc tccgcgccgc tcggcgtcgg taacggaaaa taccattagc acgctctccc 1560
gcgtccctga aggaacagg gttagacac gcctcggctt tagaccctcc gcggcggcgt 1620
gggggagatc gccgcgccc cgcttcgcca cgccgcggcc gtccttcctt taccgcccc 1680
tcccgaagc acgcagcggc gcggcggcag gggaagagg agaggtcgga gccccgacag 1740
gcgccccct gccgacggaa gccccccctg cccgtcccc cccaagccg aagaccgcac 1800
actggccgcc gagatctcgg agacattgg tacaagtac gaagaagaaa aaggatgtcg 1860
aggaccggt gcacgaccaa taacacgaca gagtagtaaa accgtttctt aagaagctt 1920
ctagacgac ggacctccga acgattccg acatacgact cagccacacc aactgttcgt 1980
caaaaccggt gactgactga cgaacagggt gtggctgagt cctgtgttcc ggacaatgat 2040
cgtgagtgt cttgtttac cggtacgtag atctcccggg ataagatat acagtggatt 2100
tacgatctcg agcgactagt cggagctgac acggaagatc aacggtcggg agacaacaaa 2160
cggggagggg gcacggaagg aactgggacc ttccacgggt agggtagacg gaaaggatta 2220
ttttactcct ttaacgtagc gtaacagact catccacagt aagataagac cccccacccc 2280
acccgctcct gtcgttcccc ctctaacc ttctgttatc gtccgtacga cccctcgatc 2340
tcagctggcc tggccacctt caggagaagg agccacagga actgaagttt cccagagagg 2400
gtaaacggac ctcttcccc ttccaccgt agtggctccc actcacttcc aaaccttctc 2460
acatcgtctt attctttggt actcagggga gggactcttc gggactcggg ggaactgctg 2520
tgttaggga gctccgagtc gaagtagtag acattttcca cgactttgac tggtaggttc 2580
gacggctttt tctaacacac ccctattaag ttttgatctc cttctacgtc ttaaagatgt 2640
agcaccgcta cagtccgatt ctctacggta gcaccgacac gtaaaaaata ctttagtata 2700
caaataaact cccacagaac ctataatgtt tattttacaa cctcgtagtc cgtataaacc 2760
atggaagaca gattccgagg gacggggaac aattaaccgt cgagtcaata agtaggtccc 2820
gtttgtaaga cgaatgataa ggactctcga aaggagtagg agatctaacc gtccccctta 2880
cgtctacgga ctctcggag gggagacggg atggttgtct cgaagtggta gctccgtacg 2940
tctcacctgt ccccgagtc cctggggact agggtcgaaa gagtaacctg tcttcctcct 3000
ctgaccccg cctctccctg gacccggggg tgattccggt gtcgtctcgg tcctgaaatc 3060
gacacgactg acgtcggacc gaacggagggt gacgggagga aacggagttc tcgttccctc 3120
ggagtctcac ctcttcgtc ggggaccgga acggagggtg gaggggaggg gatacgacaa 3180
aaggaccctg tcaccctcga ccgaatctta cgggaccccg ggggtcctgg gaccgtaaaa 3240
ttggggagtc cccgtccttc cgtcggactc tatgtcttct caggtagtgg acgacatacg 3300
gtgtgtggta ggggtgtcaa tgcattgatca agcttcgggt gcctggcaa tatcaatgct 3360
ccttggggat cactacctca accggtgagg gagagacgcg cgagcgagcg agtgactccg 3420
gcccgtggt ttccagcggg ctgcgggccc gaaacgggcc cgccggagtc actcgtcgc 3480
tcgcgctct ctccctcacc ggtttctaga 3510

```

<210> 20

<211> 3798

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 20

```

aattcgccct tgggcctagg caattggatc cgccggcaga gaaaacatcc cagggattha 60
cagatcacat gcaggcaggg accagctcaa cccttcttta atgtcatcca gggagggggc 120
cagggatgga ggggaggggt tgaggagcga gaggcagtta tttttgggtg ggattcacca 180
cttttcccat gaagagggga gacttgggtat tttgttcaat cattaagaag aaaaagggtt 240
tgttgaactt gacctcgggg gggatagaca tgggtatggc ctctaaaaac atggccccag 300
cagcttcagt ccctttctcg tcgatgggtc gcacagcctt atgcacggcc tggaggggag 360
agaagcagag acacgttgta aggctgatcc caggcctcga gcaaggctca cgtggacacc 420

```

tcccaggaag cgctcactcc ccctggacgg ccctggccct gcacatcctc tccctccctg 480
 tcacataggc cttgtctctc ctcaaggctt tggctgatgg ggctggctcc cctctgtcca 540
 tcttcctgac aagcgctctt cccctgtctc aggtgcaccc acaactcaga acaggggaaga 600
 gcatcgtcac tccacgtctg cctccagggc tctctccttt ctagtacacg gcttgaagct 660
 ccttgaggac acggaccctg gcagtgacct tcacagtgcc cagaccccaa gataatgcag 720
 ccattcatgg aactgcaggt tgttcattgg tcgcctttag ttttccaaaa taagtgtcac 780
 tttagctgaa atcattcatt aattcagaca ccaaacttca cagatcgaag gagtcagaaa 840
 ttcctttgaa acaacttagc ccaaaccctt ctgtgtcagt atggataaat caaggcccaa 900
 tgtctagaag gtcttgggca aagttgaaat tcagggtcag tgacacaacc tcaaggagg 960
 ccccgaaagt gccagctgca cagcagcccc tgcctggctt tgctgtttgc ccaccgtccc 1020
 gtgtcagtga atcacgggca tcttcaggag ctacagctgg gtcttcatth gtttccctcg 1080
 gcccttccct cagctcagg acagtgtctg agccccaca cattcttccc tacagatacc 1140
 atggtgcaac aaggtcgtca ggggtgatctc accttgagga gcttcagggg tgcctcctct 1200
 gtgaccccg agaggtcagc cccattgctg aagaccttag tgatgcccag ttgaccagg 1260
 acgctcttca gatcataggt tccagtaatg gacagtttgg gtaaatgtaa gctggcagac 1320
 ctgtcgtgca gaaaagaaat tcaaggcatg gcacagcatt cctcttgctt ttctgggacc 1380
 caccacagtg caagtgtttt cttttctgat tattttctgcc acttactcct gtgtcctcca 1440
 cccacactaa gatgggaact cggctttggg ttgttctact tttagctctt ctacattgag 1500
 tcaaagaatg ttaacatcga atgaatcaca aaagcttgaa atgccacctc ctctgatatt 1560
 ctagggtgcc tggaaacctg tctcatcttg ccctgtagtg ttgggtcacc tggccccag 1620
 cctgtaacat cccaggggcc ctacaccag agaaacacgg ggctgggtggc agtgcccagt 1680
 gacaaccgtt tagtgataa gagaagagtg accacaccag gctgagtgtc cctctctggt 1740
 tttccatggg gagacaatgc caccctgagc agggctctgt gtgagcggca gctggctctg 1800
 ggctctctga tccgttacc tctcagcctc tttgttcttt ctcaaccctt ggagcagaga 1860
 cctcaggagg tgctggcatg gaacagagaa attccagcct cgattcctat tatgaaccg 1920
 acaccttttg tattttcatc ttggttttac agtgtacaaa acgaactaga tcagcagggc 1980
 atgggcataa tcacgaatgc acacacatac actaatgtgt ggctcatgtt taagtatcac 2040
 ttactacagg acaccaatc taacagcacc gataaagtga cagagaaacg caagccttct 2100
 gcgaacatgg cctggctgtt ccaattccga acctgtgctt tctgggcctt gccacacagg 2160
 ctcttcccc gtccccccag ggacattcta ccttgaact ccacactcca ctgctgcctt 2220
 tgccaggaag cccattgtt ctttttggg tctgccagaa cgtgtgggtg tgctgctgtc 2280
 cctgccttg gactggata ttgggaaggg acagtgtcca cactggagtg ggaagttccc 2340
 agggacgaga cctttacct ctcacctgg gtactgttct cctcatggag catggacggc 2400
 gctgcctgaa ctcagtgggt gcctcattct ggaagccaag tttatacaga gtagcagtga 2460
 cccagggatg tgggttcac cctcctcagc cctctggcca gtcctgatgg gcctcagtcc 2520
 caacatggct aagaggtgtg ggcagcttct tggtcaccct caggttgggg aatcacctt 2580
 tgtcttcatt ttccaggaac ttggtgatga tatcgtgggt gagttcattt accaggtgct 2640
 gtagtttccc ctcatcaggc aggaagaaga tggcgggtggc attgcccagg tattttcatc 2700
 gcagcaccca gctggacagc ttcttacagt gctggatgtt aaacatgcct aaacgcttca 2760
 tcataggcac cttcacgggt gtcacctggg ccacgtggaa gtcctcttcc tcggtgtcct 2820
 tgacttcaaa gggctctctc catttgcttg gagagagggg aaggtgggca tcaccagggg 2880
 tgagtgaagg tttggaagag tgtagcagaa taagaaacca tgagtcccct ccctgagaag 2940
 ccctgagccc ccttgacgac acacatccct cgaggctcag cttcatcatc tgtaaaagg 3000
 gctgaaactg accatccaag ctgccgaaaa agattgtgtg gggataattc aaaactagag 3060
 gaagatgcag aattttcata tcgtggcgat gtcaggctaa gagatgccat cgtggctgtg 3120
 cttttttatt ggaatcatat gtttatttga ggggtgtctg gatattacaa ataaaatgtt 3180
 ggagcatcag gcatatttgg taccttctgt ctaaggctcc ctgccccttg ttaattggca 3240
 gctcagttat tcatccaggg caaacattct gcttactatt cctgagagct ttcctcatcc 3300
 tctagattgg caggggaaat gcagatgcct gagcagcctc cctctgcca taccaacaga 3360
 gcttcacat cgaggcatgc agagtggaca ggggcctcag ggaccctga tcccagctt 3420
 ctcatggac agaaggagga gactggggct ggagagggac ctgggcccc actaaggcca 3480
 cagcagagcc aggactttag ctgtgctgac tgcagcctgg cttgcctcca ctgccctcct 3540
 ttgcctcaag agcaaggag cctcagagtg gaggaagcag cccctggcct tgcctcccac 3600
 ctcccctccc ctatgctgtt ttcctgggac agtgggagct ggcttagaat gccctggggc 3660
 cccaggaacc ctggcatttt aaccctcag gggcaggaag gcagcctgag atacagaaga 3720

gtccatcacc tgctgtatgc cacacacccat cccacagtt acgtactagt tcgaagccac 3780
gcgtccgaag ggccaatt 3798

<210> 21
<211> 350
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 21
ggagtcgctg cgcgctgcct tcgccccgtg ccccgcctcg ccgcccctc gcgcccgcg 60
ccccggctct gactgaccgc gttactccca caggtgagcg ggccgggacgg cccttctcct 120
ccgggctgta attagcgctt ggtttaatga cggcttggtt cttttctgtg gctgcgtgaa 180
agccttgagg ggctccggga gctagagcct ctgctaacca tgttcatgcc ttcttctttt 240
tcctacagct cctgggcaac gtgctgggta ttgtgctgtc tcatcathtt ggcaaagaat 300
tcctcgaaga tccgggtacc aattccgggg cccacgctg cgcatccgctg 350

<210> 22
<211> 59
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 22
tggccgtcca tcttggaccc ggttttggcc actgactgac cgggtccaat ggacggcca 59