



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ C12Q 1/68; C07H 21/04; C12N 15/63; (13) B
C12P 19/34; C07H 21/02; C12N 15/10



1-0047668

-
- (21) 1-2018-03779 (22) 02/02/2017
(86) PCT/US2017/016303 02/02/2017 (87) WO 2017/136608 10/08/2017
(30) 62/290,209 02/02/2016 US; 62/290,187 02/02/2016 US
(45) 25/06/2025 447 (43) 25/12/2018 369A
(73) MEIRAGTX UK II LIMITED (GB)
92 Britannia Walk, London N1 7NQ, United Kingdom
(72) VOLLES, Michael, J. (US); DANOS, Olivier, F. (FR); BOYNE, Alex, K. (US);
ZENNOU, Veronique (FR); GUO, Xuecui (CA).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

- (54) CATXET POLYNUCLEOTIT ĐỂ CẢM ỨNG SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÍCH
ĐÁP ỨNG VỚI PHỐI TỬ APTAME, PHƯƠNG PHÁP IN VITRO ĐỂ ĐIỀU HÒA
SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÍCH BẰNG CATXET POLYNUCLEOTIT NÀY, VÀ
VECTƠ CHỨA GEN ĐÍCH MANG CATXET POLYNUCLEOTIT NÀY

(21) 1-2018-03779

(57) Sáng chế đề xuất các cấu trúc polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện gen bằng cách điều biến các ribozym tự phân cắt dựa vào aptame và phương pháp sử dụng các cấu trúc này để điều hòa sự biểu hiện gen đáp ứng với sự có mặt hoặc vắng mặt của phối tử liên kết với aptame này. Sáng chế đề xuất thêm các phương pháp để tạo ra và sử dụng các công tắc ribo làm giảm sự biểu hiện gen đích đáp ứng với phối tử aptame cũng như các công tắc ribo làm tăng sự biểu hiện gen đích đáp ứng với phối tử aptame.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất các cấu trúc polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện gen bằng cách điều biến các ribozym tự phân cắt dựa vào aptame và phương pháp sử dụng các cấu trúc này để điều hòa sự biểu hiện gen đáp ứng với sự có mặt hoặc vắng mặt của phối tử liên kết với aptame này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các ribozym nhỏ phân cắt bên trong phân tử axit nucleic chứa các motif ARN dài khoảng từ 50-150 nucleotit (“nt”) có hoạt tính phân cắt ARN nội tại. Có một số nhóm các ribozym nhỏ phân cắt bên trong phân tử axit nucleic bao gồm dạng đầu búa, và kẹp tóc. Hiện nay, các nhóm gồm các ribozym tự phân cắt mới đã được nhận diện bao gồm dạng xoắn, dạng xoắn chẻ em, dạng súng ngắn và dạng hình riêu.

Sáng chế sử dụng các ribozym liên kết với các aptame để tạo ra các caxet polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện gen đích đáp ứng với sự có mặt hoặc vắng mặt của phối tử liên kết với aptame.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất caxet polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện của gen đích mang công tắc ribo chứa ribozym xoắn được liên kết bởi thân vào một aptame, trong đó thân liên kết ribozym xoắn với aptame này gắn vào ribozym ở vị trí của thân P3 của ribozym xoắn và trong đó gen đích này được liên kết với thân P1 của ribozym xoắn. Trong trường hợp này, công tắc ribo là “công tắc ribo tắt” vì sự liên kết aptame/phối tử tăng cường chức năng ribonucleaza của ribozym xoắn dẫn đến sự cắt ARN gen đích chứa caxet polynucleotit và do đó làm giảm sự biểu hiện gen đích. Trong một phương án, aptame này liên kết với phối tử phân tử nhỏ.

Trong một phương án, ribozym xoắn này là từ *Nasonia vitripennis*. Trong một phương án, ribozym xoắn chứa SEQ ID NO.:38. Trong một phương án, ribozym xoắn là từ mẫu môi trường. Trong một phương án, ribozym xoắn chứa SEQ ID NO.:39.

Trong một phương án, thân P1 chứa trình tự nối dài thân P1 của ribozym xoắn từ 1 đến 3 cặp bazơ. Trong một phương án, thân P1 của ribozym xoắn là từ 3 đến 9 cặp bazơ. Trong một phương án, thân P1 của ribozym xoắn là từ 4 đến 7 cặp bazơ. Trong một phương án, thân P1 của ribozym xoắn là 6 cặp bazơ. Trong một phương án, thân P1 của ribozym xoắn là 7 cặp bazơ. Trong một phương án, thân P1 của ribozym xoắn là 8 cặp bazơ.

Trong một phương án, thân liên kết ribozym với aptame chứa trình tự từ thân P3 của ribozym và/hoặc trình tự từ thân P1 của aptame. Trong một phương án, thân liên kết ribozym với aptame không chứa trình tự từ thân P3 của ribozym và/hoặc không chứa trình tự từ thân P1 của aptame. Trong một phương án, thân liên kết ribozym với aptame dài khoảng từ 3 đến khoảng 7 cặp bazơ. Trong một phương án, thân liên kết ribozym với aptame dài từ 3 đến 7 cặp bazơ. Trong một phương án, thân liên kết ribozym với aptame dài 4 cặp bazơ. Trong một phương án, thân liên kết ribozym với aptame dài 3 cặp bazơ.

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

- (a) gắn xen caxet polynucleotit chứa công tắc ribo tắt được mô tả ở đây vào gen đích,
- (b) đưa gen đích chứa caxet polynucleotit vào tế bào, và
- (c) cho tế bào tiếp xúc với phối tử phân tử nhỏ liên kết đặc hiệu với aptame với lượng hữu hiệu để làm giảm sự biểu hiện của gen đích.

Trong một phương án, caxet polynucleotit được gắn xen vào vùng 5' không dịch mã của gen đích, vùng 3' không dịch mã của gen đích, và/hoặc xuôi dòng codon khởi đầu dịch mã của gen đích.

Trong một phương án, khi caxet polynucleotit được gắn xen xuôi dòng (nghĩa là, 3') codon khởi đầu dịch mã của gen đích, công tắc ribo liền kề với codon khởi đầu này. Trong các phương án khác, công tắc ribo này là khoảng từ 1 đến khoảng 100, khoảng 1 đến khoảng 50, hoặc khoảng 1 đến khoảng 20 nucleotit từ codon khởi đầu của gen đích. Trong một phương án, caxet polynucleotit chứa trình tự peptit 2A nằm giữa đầu 3' của công tắc ribo và trình tự mã hóa gen đích. Trong một phương án, caxet polynucleotit chứa trình tự cầu nối liền kề với trình tự peptit 2A.

Trong một phương án, hai hoặc nhiều caxet polynucleotit này được gắn xen vào gen đích. Trong một phương án, hai hoặc nhiều caxet polynucleotit này chứa nhiều

aptame khác nhau liên kết đặc hiệu với nhiều phối tử phân tử nhỏ khác nhau. Trong một phương án, hai hoặc nhiều caxet polynucleotit chứa cùng một aptame.

Trong một phương án, gen đích chứa caxet polynucleotit được đưa vào vectơ để biểu hiện gen đích. Trong một phương án, vectơ này là vectơ virus. Trong một phương án, vectơ virus này được chọn từ nhóm bao gồm vectơ adenovirus, vectơ virus liên hợp adeno, và vectơ lentivirus.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất caxet polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện của gen đích mang công tắc ribo mà chứa ribozym xoắn được liên kết với aptame, trong đó aptame này được liên kết với đầu 3' hoặc 5' của thân P1 của ribozym xoắn, trong đó khi aptame này được liên kết với đầu 3' của thân P1 của ribozym xoắn, một phần của nhánh 3' của thân P1 của ribozym xoắn còn là nhánh 5' của thân P1 của aptame, và trong đó khi aptame này được liên kết với đầu 5' của thân P1 của ribozym xoắn, một phần của nhánh 5' của thân P1 của ribozym xoắn còn là nhánh 3' của thân P1 của aptame (*xem, ví dụ, Fig. 6a-6b*). Trong trường hợp này, công tắc ribo là “công tắc ribo bật” vì sự liên kết aptame/phối tử ức chế chức năng ribonucleaza của ribozym xoắn làm giảm sự phân cắt ARN gen đích chứa caxet polynucleotit và do đó làm tăng sự biểu hiện gen đích. Trong một phương án, aptame này liên kết với phối tử phân tử nhỏ.

Trong một phương án, ribozym xoắn này là từ *Nasonia vitripennis*. Trong một phương án, ribozym xoắn chứa SEQ ID NO.:38. Trong một phương án, ribozym xoắn là từ mẫu môi trường. Trong một phương án, ribozym xoắn chứa SEQ ID NO.:39.

Trong một phương án, phần nhánh của thân P1 của ribozym xoắn mà còn là một nhánh của thân P1 của aptame là từ 4 đến 8 nucleotit, từ 5 đến 7 nucleotit, 6 nucleotit, hoặc 7 nucleotit. Trong một phương án, thân P1 của ribozym xoắn là từ 4 đến 9 cặp bazơ, từ 5 đến 8 cặp bazơ, 6 cặp bazơ, hoặc 7 cặp bazơ. Trong một phương án, thân P1 của aptame là từ 6 đến 11 cặp bazơ, từ 7 đến 10 cặp bazơ, 8 cặp bazơ, hoặc 9 cặp bazơ.

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

- (a) gắn xen caxet polynucleotit chứa công tắc ribo bật được mô tả ở đây vào gen đích,
- (b) đưa gen đích chứa caxet polynucleotit vào tế bào, và
- (c) cho tế bào tiếp xúc với phối tử phân tử nhỏ liên kết đặc hiệu với aptame với lượng hữu hiệu để làm tăng sự biểu hiện của gen đích.

Trong một phương án, caxet polynucleotit được gắn xen vào vùng 5' không dịch mã của gen đích, vùng 3' không dịch mã của gen đích, và/hoặc xuôi dòng codon khởi đầu dịch mã.

Trong một phương án, khi caxet polynucleotit được gắn xen xuôi dòng (nghĩa là, 3') codon khởi đầu dịch mã của gen đích, công tắc ribo bật liền kề với codon khởi đầu này. Trong các phương án khác, công tắc ribo này là khoảng từ 1 đến khoảng 100, khoảng 1 đến khoảng 50, hoặc khoảng 1 đến khoảng 20 nucleotit từ codon khởi đầu của gen đích. Trong một phương án, caxet polynucleotit chứa trình tự peptit 2A nằm giữa đầu 3' của công tắc ribo và trình tự mã hóa gen đích. Trong một phương án, caxet polynucleotit chứa trình tự cầu nối liền kề với trình tự peptit 2A.

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

Trong một phương án, gen đích chứa caxet polynucleotit được đưa vào vector để biểu hiện gen đích. Trong một phương án, vector này là vector virus. Trong một phương án, vector virus này được chọn từ nhóm bao gồm vector adenovirus, vector virus liên hợp adeno, và vector lentivirus.

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

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1a-1b. Các ribozym xoắn tự phân cắt và ức chế sự biểu hiện gen ở tế bào động vật có vú.

Fig. 1a. Trình tự ribozym xoắn từ *N. vitripennis* (dạng xoắn-ong) hoặc từ mẫu môi trường (dạng xoắn-es) được tách dòng vào vùng 3' không dịch mã ("UTR") trong vector pEGFP-C1. Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp bằng các cấu trúc đã chỉ ra và cường độ phát huỳnh quang của GFP được đo. Dạng xoắn-ong gây ra sự giảm xấp xỉ 97% hoặc 36 lần sự biểu hiện GFP so với đối chứng pEGFP-C1. Dạng xoắn-es khi được tách dòng vào 3' UTR của GFP làm giảm đáng kể sự biểu hiện gen đích trong các tế bào HEK 293, nhưng với mức độ không giống như dạng xoắn ong.

Fig. 1b. Trình tự dạng xoắn đột biến được tạo ra bằng cách gây đột biến A6 thành G, như được chỉ ra bởi cấu trúc bậc hai dạng xoắn-ong được lồng vào đồ thị. Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp bằng các cấu trúc đã chỉ ra và cường độ phát huỳnh quang của GFP được đo. Dạng xoắn-ong này lại làm giảm sự biểu hiện của GFP khi được tách dòng vào 3' UTR. Tuy nhiên đột biến dạng xoắn-ong không gây ra sự giảm biểu hiện GFP.

Fig. 2a-2b. Biến đổi của trình tự thân P1 cải thiện hoạt tính phân cắt của ribozym xoắn.

Fig. 2a. Trình tự của đoạn kéo dài 3 cặp bazơ (3HP) của thân P1 của dạng xoắn ong.

Fig. 2b. Đột biến mất điểm SacII khỏi cấu trúc dạng xoắn-ong_GFP ban đầu và đột biến bổ sung thân 3 bp vào thân P1 của dạng xoắn cải thiện sự phân cắt bởi ribozym xoắn, dẫn đến làm giảm thêm sự biểu hiện GFP.

Fig. 2c. Thể hiện kết quả của thử nghiệm luciferaza. Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp bằng các cấu trúc đã chỉ ra chứa gen luciferaza đom đóm và dạng xoắn có hoặc không có 3HP trong 3' UTR.

Fig. 3a-3e. Tạo ra ribozym xoắn đáp ứng guanin.

Fig. 3a. Sơ đồ liên kết trình tự aptame với ribozym xoắn và giải thích về ribozym xoắn đáp ứng phối tử aptame. Trình tự aptame được thể hiện bằng đường có nét to hơn. Khi không có mặt phối tử aptame, aptame không có phối tử này ngăn cản tác dụng phân cắt ribozym xoắn, dẫn đến mRNA nguyên vẹn và tiếp theo là sự biểu hiện gen. Khi có mặt phối tử aptame, aptame liên kết phối tử tạo thuận lợi cho sự tạo thành thân P3, do đó giữ được hoạt tính phân cắt của ribozym xoắn, dẫn đến ức chế sự biểu hiện gen.

Fig. 3b. Kết quả của thử nghiệm luciferaza đom đóm. Hai mươi cấu trúc được tạo ra bằng cách liên kết thân P1 của aptame guanin với thân P3 của ribozym xoắn, như được thể hiện trong Fig. 3a, ô dưới. 3HP bổ sung được bao gồm như một phần của thân P1 của dạng xoắn. Thân nối Vòng 2 và aptame bị cắt liên tục, tạo ra các thân có độ dài khác nhau như được chỉ ra trong các dấu ngoặc đơn. Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp bằng các cấu trúc đã được chỉ ra, được xử lý hoặc không được xử lý bằng guanin. Số lần giảm đối với cấu trúc Luci-waspGua16 được chỉ ra trong đồ thị.

Fig. 3c. Hiệu lực của các cấu trúc luciferaza chứa waspGua16 hoặc waspGua16 đột biến. waspGua16 kiểu hoang làm giảm hoạt tính luciferaza khi xử lý bằng 500 μ M guanin, trong khi đó waspGua16 đột biến thì không.

Fig. 3d. Thể hiện các kết quả của thử nghiệm luciferaza. Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp bằng các cấu trúc đã được chỉ ra, và được xử lý hoặc không được xử lý bằng 500 μ M guanin hoặc 1mM guanosin.

Fig. 3e. Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp bằng các cấu trúc đã chỉ ra, và được xử lý bằng 500 μ M guanosin. DMSO được sử dụng làm đối chứng dung môi. Dịch nổi bề mặt được thu gom 18 giờ sau khi xử lý bằng guanosin, Epo được đo bằng cách sử dụng kit ELISA. Các kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD (n=2). Thể hiện đại diện của hai thử nghiệm độc lập.

Fig. 4a-4b. Tạo ra các công tắc ribo xoắn đáp ứng theophyllin.

Fig. 4a. Sơ đồ liên kết theophyllin aptame với trình tự vòng 2 trong ribozym xoắn. Các trình tự và độ dài của thân nối theophyllin aptame và vòng xoắn 2 được thể hiện. Aptame và phối tử được chỉ ra là ▲/▼.

Fig. 4b. Thể hiện các kết quả của thử nghiệm luciferaza. Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp với các cấu trúc đã được chỉ ra, được xử lý và không được xử lý bằng 2 mM theophyllin 4 giờ sau khi chuyển nạp.

Fig. 5a-5b. Khả năng di động của công tắc ribo xoắn trong tế bào động vật có vú.

Fig. 5a. Sơ đồ các cấu trúc có công tắc ribo twisterGua16 và cầu nối và trình tự peptit 2A (cầu nối2A) được gắn xen xuôi dòng ATG và ngược dòng trình tự mã hóa luciferaza còn lại (ô trên cùng), hoặc twisterGua16 và trình tự cầu nối2A được gắn xen xuôi dòng trình tự mã hóa đối với 10 axit amin đầu tiên của GFP (ô dưới).

Fig. 5b. Kết quả của thử nghiệm luciferaza được thể hiện. Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp bằng các cấu trúc đã được chỉ ra. Các tế bào đã chuyển nạp được xử lý bằng hoặc không được xử lý bằng guanin 4 giờ sau khi chuyển nạp. Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD (n=3).

Fig. 6a-6b. Tạo ra công tắc ribo xoắn BẬT đáp ứng phối tử aptame.

Fig. 6a. Thể hiện sơ đồ của công tắc ribo guanine xoắn BẬT (trong đó aptame được liên kết với đầu 3' của P1 của dạng xoắn). Cấu hình của dạng xoắn ong và trình tự aptame được thể hiện như là một ví dụ, trong đó đầu 3' của thân P1 (bao gồm thân 3 bp) được liên kết với trình tự aptame. Trong cấu hình này, trình tự thân được dùng chung giữa thân

P1 của dạng xoắn và thân P1 của aptame. Trình tự thân chung này được chỉ ra bằng đường có nét to hơn. Có khả năng là, khi không có mặt phối tử aptame (ô trên cùng), trình tự aptame liên kết với thân P1 của dạng xoắn không cản trở cấu trúc xoắn và hoạt tính phân cắt ribozym của nó, do đó gây ra sự phân cắt mRNA và tiếp theo là ức chế sự biểu hiện gen. Khi có mặt phối tử aptame (ô dưới), aptame tạo ra thân P1 và làm cho trình tự thân chung (đường dày hơn) không khả dụng cho sự tạo thành thân P1 của dạng xoắn, do đó cản trở cấu trúc xoắn và hoạt tính ribozym của nó, dẫn đến mRNA nguyên vẹn và tiếp theo là sự biểu hiện gen.

Fig. 6b. Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp bằng các cấu trúc luciferaza đã được chỉ ra. Các tế bào đã chuyển nạp được xử lý bằng hoặc không được xử lý bằng 500 μ M guanosin. DMSO được sử dụng làm đối chứng dung môi. Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD (n=3). Số lần tăng do cảm ứng được chỉ ra trong đồ thị cho mỗi cấu trúc.

Fig. 7a-7b. Trình tự ribozym đầu búa (7a) và trình tự ribozym kẹp tóc (7b) đặt xuôi dòng codon khởi động dịch mã. Ô trên cùng thể hiện trình tự nucleotit, và ô dưới cùng thể hiện các trình tự peptit được dịch mã bằng cách sử dụng các khung đọc khác nhau. Hàng trên cùng trong mỗi trường hợp là ribozym mẹ, không được dịch mã xuyên suốt; các dấu chấm trong trình tự nucleotit được sử dụng để chỉ ra “giống như hàng trên cùng”. Trình tự peptit 2A từ virus Thosaasigna (T2A) được chỉ ra là 2A. Các đột biến được tạo ra để loại bỏ các codon dừng tiềm tàng trong trình tự ribozym.

Fig. 7c. Kết quả về hoạt tính beta-galactosidaza được tạo ra từ các tế bào HEK 293 được chuyển nạp bằng các cấu trúc đã được chỉ ra. Nửa bên trái của biểu đồ thể hiện các kết quả từ các cấu trúc có trình tự ribozym đầu búa, và nửa bên phải chỉ ra các kết quả từ các cấu trúc có trình tự ribozym kẹp tóc. Số lần giảm do cảm ứng của hoạt tính LacZ được thể hiện bằng tỉ lệ của giá trị được tạo ra từ cấu trúc đột biến không có hoạt tính ribozym với giá trị được tạo ra từ cấu trúc có hoạt tính ribozym. Số lần cao nhất được chỉ ra bằng mũi tên cho mỗi ribozym.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các cấu trúc polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện gen bằng cách điều biến các ribozym nhỏ phân cắt bên trong phân tử axit nucleic dựa vào aptame và phương pháp sử dụng các cấu trúc này để điều hòa sự biểu hiện gen đáp ứng với sự có mặt hoặc vắng mặt của phối tử liên kết với aptame này. Cấu trúc polynucleotit này chứa

ít nhất là một công tắc ribo mà chứa ribozym và aptame. Cách mà ribozym này liên kết với aptame tạo ra các công tắc ribo hoạt hóa sự tự phân cắt ribozym khi có mặt phối tử aptame (công tắc ribo “tắt”) hoặc các công tắc ribo ức chế sự tự phân cắt ribozym khi có mặt aptame (công tắc ribo “bật”).

Caxet polynucleotit điều hòa gen đề cập đến cấu trúc ADN tái tổ hợp mà, khi được đưa vào ADN của gen đích, tạo ra khả năng điều hòa sự biểu hiện của gen đích bằng cách điều hòa sự tự phân cắt ribozym qua trung gian aptame/phối tử. Như được sử dụng ở đây, caxet polynucleotit hoặc cấu trúc polynucleotit là axit nucleic (ví dụ, ADN hoặc ARN) chứa các yếu tố thu được từ nhiều nguồn khác nhau (ví dụ, các sinh vật khác nhau, các gen khác nhau từ cùng một sinh vật, và tương tự). Caxet polynucleotit này chứa công tắc ribo. Công tắc ribo trong ngữ cảnh theo sáng chế chứa vùng nhận biết (ví dụ, aptame) và ribozym cùng chịu trách nhiệm về việc nhận biết sự có mặt của phối tử mà liên kết với vùng nhận biết này và làm thay đổi cấu hình của vị trí liên kết ribozym. Trong một phương án, sự biểu hiện của gen đích được tăng cường khi phối tử aptame có mặt và bị giảm khi phối tử này vắng mặt. Trong một phương án khác, sự biểu hiện của gen đích bị giảm khi phối tử aptame có mặt và được tăng cường khi phối tử này vắng mặt.

Ribozym

Ribozym được sử dụng trong sáng chế có thể là ribozym nhỏ phân cắt bên trong phân tử axit nucleic bất kỳ mà sẽ tự phân cắt trong tế bào đích với các dạng bao gồm, ví dụ, đầu búa, kẹp tóc, virus hepatitis delta, vệ tinh Varkud, xoắn, xoắn chị em, súng ngắn và hình riu. *Xem, ví dụ*, Roth et al., Nat Chem Biol. 10(1):56-60; và Weinberg et al., Nat Chem Biol. Tháng 8 năm 2015;11(8):606-10, cả hai tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. U.S. 2015/0056174 đề xuất các ribozym đầu búa biến đổi có hoạt tính phân cắt bên trong phân tử axit nucleic tăng cường (*xem, ví dụ*, Fig. 5A-F, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các ribozym được ưu tiên hơn là dạng đầu búa, kẹp tóc và xoắn. Trong một phương án, ribozym này là ribozym xoắn từ *Nasonia vitripenni* (SEQ. ID NO.:38). Trong một phương án, ribozym này là ribozym xoắn được nhận diện từ mẫu môi trường (SEQ. ID NO.:39).

Công tắc ribo

Thuật ngữ “công tắc ribo” như được sử dụng ở đây đề cập đến đoạn điều hòa của polynucleotit ARN. Công tắc ribo trong ngữ cảnh sáng chế chứa vùng nhận biết (ví dụ, aptame) ribonucleaza tự phân cắt mà cùng chịu trách nhiệm về việc nhận biết sự có mặt

của phối tử (ví dụ, phân tử nhỏ) và điều biến cấu hình của ribonucleaza tự phân cắt và nhờ đó điều biến hoạt tính của nó. Trong một phương án, công tắc ribo là tái tổ hợp, sử dụng các polynucleotit từ hai hoặc nhiều nguồn. Thuật ngữ “tổng hợp” như được sử dụng ở đây trong ngữ cảnh của công tắc ribo đề cập đến công tắc ribo không xuất hiện tự nhiên. Trong một phương án, vùng nhận biết (ví dụ, aptame) và vùng ribonucleaza được nối bằng cầu nối polynucleotit. Trong một phương án, cầu nối polynucleotit tạo ra thân ARN (nghĩa là, vùng polynucleotit ARN là chuỗi kép).

Công tắc ribo tắt

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất caxet polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện của gen đích mang công tắc ribo chứa ribozym xoắn được liên kết bởi thân vào một aptame, trong đó thân liên kết ribozym xoắn này với aptame gắn vào ribozym ở vị trí của thân P3 của ribozym xoắn này, và trong đó gen đích này được liên kết với thân P1 của ribozym xoắn (*xem, ví dụ, Fig. 3a*). Trong trường hợp này, công tắc ribo là “công tắc ribo tắt” vì sự liên kết aptame/phối tử tăng cường chức năng ribonucleaza của ribozym xoắn dẫn đến sự phân cắt ARN gen đích chứa caxet polynucleotit và do đó làm giảm sự biểu hiện gen đích.

Trong cấu hình này, trong đó cả hai nhánh của thân aptame được liên kết với cả hai nhánh của thân ribozym P3, thân này có thể chứa trình tự bổ sung có khả năng tạo ra thân khi aptame liên kết với phối tử của nó. Trình tự thân bổ sung này có thể bao gồm trình tự từ thân P1 của aptame và/hoặc trình tự bổ sung được bổ sung vào để tạo thuận lợi cho sự tạo thành thân khi aptame được liên kết bởi phối tử của nó. Thân P3 có thể chứa một, hai, ba hoặc nhiều thay đổi so với trình tự P3 kiểu hoang đối với ribozym này. Trong một số phương án, thân liên kết aptame với ribozym không chứa trình tự từ thân P3 của dạng xoắn hoặc từ thân aptame. Ngoài ra, thân liên kết ribozym với aptame (bao gồm thân P3) có thể chứa một hoặc nhiều bất cặp nhằm trong đó nucleotit không bổ sung với đối tác liên kết của nó trên nhánh thân còn lại.

Thân liên kết aptame với ribozym nên có độ dài (và hàm lượng GC) đủ để tạo ra thân khi phối tử liên kết với aptame nhờ đó tăng cường hoạt tính endonucleaza ribozym, trong khi, khi phối tử này không có mặt với lượng đủ, có cấu hình ức chế hoạt tính endonucleaza ribozym. Độ dài và trình tự của thân này có thể được biến đổi bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết để xác định các thân cho phép sự biểu hiện nền chấp nhận được của gen đích khi phối tử có mặt và các mức biểu hiện chấp nhận được của gen đích khi

phối tử này không có mặt. Ví dụ, nếu thân này quá dài nó có thể tạo ra cấu hình ribozym hoạt động khi có mặt hoặc vắng mặt phối tử. Nếu thân này quá ngắn, nó không thể tạo ra ribozym hoạt động ngay cả khi có mặt phối tử. Trong một số phương án, thân liên kết ribozym với aptame là khoảng 3 đến khoảng 7 cặp bazơ. Trong một phương án, thân liên kết ribozym với aptame dài từ 3 đến 7 cặp bazơ. Trong một phương án, thân liên kết ribozym với aptame dài 4 cặp bazơ. Trong một phương án, thân liên kết ribozym với aptame dài 3 cặp bazơ.

Nên được hiểu là thân liên kết aptame và ribozym không phải luôn có cấu hình thân sợi kép. Như được thể hiện trong Fig. 3a, khi aptame không được liên kết với phối tử, cấu trúc của thân bị phá vỡ ức chế hoạt tính ribozym phân cắt bên trong phân tử axit nucleic. Khi aptame liên kết với phối tử của nó thân này được ổn định tăng cường hoạt tính ribozym phân cắt bên trong phân tử axit nucleic.

Ở cấu hình công tắc ribo tắt này, thân P1 của ribozym được liên kết với trình tự nucleotit của gen đích (*xem, ví dụ, Fig. 3a*). Thân ribozym P1 có thể chứa toàn bộ hoặc một số trình tự P1 của ribozym xuất hiện tự nhiên. Thân P1 này có thể chứa trình tự thân bổ sung từ một nguồn khác. Thân P1 có thể chứa một, hai, ba hoặc nhiều thay đổi so với trình tự P1 kiểu hoang cho ribozym này. Trong một số phương án, thân P1 của ribozym không chứa trình tự bất kỳ từ trình tự P1 kiểu hoang đối với ribozym này. Thân này vẫn được gọi là thân P1 của ribozym do vị trí của nó. Độ dài và trình tự của thân P1 có thể được biến đổi bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết để xác định các thân cho phép, ví dụ, sự biểu hiện nền chấp nhận được của gen đích. Trong một phương án, thân P1 của ribozym xoắn là từ 3 đến 9 cặp bazơ. Trong một phương án, thân P1 của ribozym xoắn là từ 4 đến 7 cặp bazơ. Trong một phương án, thân P1 của ribozym xoắn là 7 cặp bazơ. Trong một phương án, thân P1 của ribozym xoắn là 8 cặp bazơ.

Caxet polynucleotit chứa công tắc ribo tắt có thể được đưa vào một hoặc nhiều vị trí trong gen đích, bao gồm, nhưng không giới hạn ở 5' và 3' UTR và xuôi dòng codon khởi đầu này.

Công tắc ribo bật

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất caxet polynucleotit để điều hòa sự biểu hiện của gen đích mang công tắc ribo mà chứa ribozym xoắn được liên kết với aptame, trong đó aptame này được liên kết với đầu 3' hoặc 5' của thân P1 của ribozym xoắn, trong đó khi aptame này được liên kết với đầu 3' của thân P1 của ribozym xoắn, một phần của

nhánh 3' của thân P1 của ribozym xoắn còn là một phần của nhánh 5' của thân P1 của aptame, và trong đó khi aptame này được liên kết với đầu 5' của thân P1 của ribozym xoắn, một phần của nhánh 5' của thân P1 của ribozym xoắn còn là một phần của nhánh 3' của thân P1 của aptame (*xem, ví dụ, Fig. 6a-6b*). Trong trường hợp này, công tắc ribo là “công tắc ribo bật” vì sự liên kết aptame/phối tử ức chế chức năng ribonucleaza của ribozym xoắn làm giảm sự phân cắt của ARN gen đích chứa caxet polynucleotit và do đó làm tăng sự biểu hiện gen đích khi có mặt phối tử.

Như với các thân aptame và ribozym đã được thảo luận với công tắc ribo tắt, thân P1 của ribozym và thân P1 của aptame có thể hoặc không thể chứa trình tự thân kiểu hoang. Như vậy, tên gọi của thân là dựa vào vị trí của chúng trên ribozym hoặc aptame và không hàm ý là các thân này chứa trình tự cụ thể bất kỳ. Mỗi thân P1 của ribozym và thân P1 của aptame có thể độc lập chứa trình tự thân ngoài trình tự thân chung. Trình tự thân bổ sung này có thể bao gồm trình tự từ thân P1 của ribozym hoặc P1 của aptame tương ứng và/hoặc trình tự bổ sung được bổ sung vào để tạo thuận lợi cho sự tạo thành thân. Ngoài ra, thân P1 của ribozym và/hoặc thân P1 của aptame có thể chứa một hoặc nhiều bất cặp nhằm trong đó một nucleotit không bổ sung với đối tác liên kết của nó trên nhánh thân còn lại.

Thân P1 của ribozym và thân P1 của aptame nên có độ dài (và hàm lượng GC) đủ để aptame này tạo ra thân P1 khi có mặt phối tử aptame và ribozym tạo thành thân P1 khi phối tử không có mặt. Độ dài và trình tự của các thân này có thể được biến đổi bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết để nhận diện các thân cho phép sự biểu hiện nền chấp nhận được của gen đích khi phối tử không có mặt và các mức biểu hiện chấp nhận được của gen đích khi phối tử này có mặt. Trong một phương án, thân P1 của ribozym xoắn là từ 4 đến 9 cặp bazơ, từ 5 đến 8 cặp bazơ, 6 cặp bazơ, hoặc 7 cặp bazơ. Trong một phương án, thân P1 của aptame là từ 6 đến 11 cặp bazơ, từ 7 đến 10 cặp bazơ, 8 cặp bazơ, hoặc 9 cặp bazơ.

Trong cấu hình công tắc ribo bật này, aptame liên kết với ribozym (5' hoặc 3') và cả aptame và ribozym đều chứa nhánh thân chung có chọn lọc. Khi aptame được liên kết với phối tử của nó, nó ổn định thân P1 của aptame, ngăn cản việc sử dụng nó như một phần của cấu trúc ribozym và ức chế hoạt tính endonucleaza ribozym. Khi phối tử không có mặt, thân chung được giải phóng để tạo ra một phần của thân P1 của ribozym, do đó cho phép hoạt tính endonucleaza ribozym và phân cắt ARN đích dẫn đến sự biểu hiện

gen đích giảm. Trong nhiều phương án, phần dùng chung có chọn lọc của thân ribozym và aptame là từ 4 đến 8 nucleotit, 5 đến 7 nucleotit, 6 nucleotit, hoặc 7 nucleotit.

Caxet polynucleotit chứa công tắc ribo bật có thể được đưa vào một hoặc nhiều vị trí trong gen đích, bao gồm, nhưng không giới hạn ở 5' và 3' UTR và xuôi dòng codon khởi đầu này.

Aptame/Phối tử

Trong một phương án, vùng nhận biết chứa aptame. Thuật ngữ “aptame” như được sử dụng ở đây đề cập đến polynucleotit ARN liên kết đặc hiệu với phối tử. Thuật ngữ “phối tử” đề cập đến phân tử được liên kết đặc hiệu bởi aptame. Trong một phương án, phối tử này là phân tử có khối lượng phân tử thấp (nhỏ hơn khoảng 1.000 Dalton) bao gồm, ví dụ, lipid, monosacarit, phân tử truyền tin thứ hai, đồng yếu tố, ion kim loại, các sản phẩm tự nhiên và các sản phẩm chuyển hóa khác, các axit nucleic, cũng như hầu hết các dược chất. Trong một phương án, phối tử này là polynucleotit có hai hoặc nhiều bazơ nucleotit.

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

Các phối tử aptame cũng có thể là các thành phần nội bào mà gia tăng đáng kể trong các tình trạng sinh lý/bệnh lý cụ thể, như biến nạp gây ung thư – các phối tử này có thể bao gồm các phân tử truyền tin thứ hai như GTP hoặc GDP, canxi; axit béo, hoặc các axit béo bị chuyển hóa nhằm như 13-HODE trong bệnh ung thư vú (Flaherty, JT et al., Plos One, Vol. 8, e63076, 2013, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn); các axit amin hoặc các chất chuyển hóa axit amin; các chất chuyển hóa trong con đường đường phân mà thường có mức nồng độ cao hơn trong tế bào ung thư hoặc trong tế bào bình thường ở các bệnh chuyển hóa; và các phân tử liên quan đến bệnh ung thư như Ras hoặc protein Ras đột biến, EGFR đột biến ở bệnh ung thư phổi, indoleamin-2,3-dioxygenaza (IDO) ở nhiều loại bệnh ung thư. Các phân tử nội sinh bao gồm các chất chuyển hóa progesteron ở bệnh ung thư vú như được mô tả bởi JP Wiebe (Endocrine-Related Cancer (2006) 13:717–738, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các phối tử nội sinh còn bao gồm các chất chuyển hóa có mức nồng độ tăng do các đột biến trong các enzym chuyển hóa

chính ở bệnh ung thư thận như lactat, glutathion, kynurenin như được mô tả bởi Minton, DR và Nanus, DM (Nature Reviews, Urology, Vol. 12, 2005, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Các aptame có vùng liên kết có khả năng tạo ra các phức hợp với phân tử đích dự kiến (nghĩa là, phối tử). Tính đặc hiệu của liên kết này có thể được xác định về hằng số phân ly tương đối (K_d) của aptame với phối tử của nó so với hằng số phân ly của aptame với các phân tử không liên quan. Do đó, phối tử là phân tử liên kết với aptame với ái lực lớn hơn so với phân tử không liên quan. Thông thường, K_d cho aptame với phối tử của nó nhỏ hơn ít nhất là khoảng 10 lần so với K_d cho aptame với phân tử không liên quan. Trong các phương án khác, K_d nhỏ hơn ít nhất là khoảng 20 lần, nhỏ hơn ít nhất là khoảng 50 lần, nhỏ hơn ít nhất là khoảng 100 lần, và nhỏ hơn ít nhất là khoảng 200 lần. Aptame thường có độ dài nằm trong khoảng từ 15 đến khoảng 200 nucleotit. Thông thường hơn, aptame có độ dài nằm trong khoảng từ 30 đến khoảng 100 nucleotit.

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

Các phương pháp nhận diện aptame/phối tử

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

vào đây bằng cách viện dẫn. Các biến đổi của quá trình SELEX được mô tả trong Patent Mỹ số 5,580,737 và 5,567,588, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các kỹ thuật chọn lọc để nhận diện các aptame thường bao gồm tạo ra nguồn lớn gồm các phân tử ADN hoặc ARN có độ dài mong muốn chứa vùng được ngẫu nhiên hóa hoặc được gây đột biến. Ví dụ, nguồn oligonucleotit để chọn lọc aptame có thể chứa vùng bao gồm 20-100 nucleotit được ngẫu nhiên hóa được gắn bên sườn bởi các vùng có trình tự xác định dài khoảng 15-25 nucleotit và hữu ích cho sự liên kết của các đoạn môi PCR. Nguồn oligonucleotit được khuếch đại bằng cách sử dụng các kỹ thuật PCR chuẩn, hoặc các phương pháp khác cho phép khuếch đại các trình tự axit nucleic đã chọn. Nguồn ADN này có thể được sao chép *in vitro* để tạo ra nguồn bản sao ARN khi aptame ARN được mong muốn. Sau đó nguồn oligonucleotit ARN hoặc ADN được đưa vào quá trình chọn lọc dựa vào khả năng liên kết đặc hiệu với phối tử mong muốn của chúng. Các kỹ thuật chọn lọc bao gồm, ví dụ, kỹ thuật sắc ký ái lực, mặc dù quy trình bất kỳ cho phép chọn lọc các axit nucleic dựa vào khả năng liên kết đặc hiệu với một phân tử khác của chúng có thể được sử dụng. Các kỹ thuật chọn lọc để nhận diện các aptame liên kết với các phân tử nhỏ và hoạt động trong tế bào có thể bao gồm các phương pháp sàng lọc dựa vào tế bào. Trong trường hợp sắc ký ái lực, oligonucleotit được tiếp xúc với phối tử đích đã được bất động trên chất nền trong cột hoặc trên các hạt từ. Tốt hơn, nếu oligonucleotit này được chọn lọc để liên kết với phối tử khi có mặt các nồng độ muối, nhiệt độ, và các điều kiện khác mà mô phỏng các điều kiện sinh lý bình thường. Oligonucleotit trong nguồn mà liên kết với phối tử được giữ lại trên cột hoặc hạt này, và các trình tự không liên kết được rửa đi. Sau đó các oligonucleotit đã liên kết với phối tử được khuếch đại (sau khi phiên mã đảo nếu các bản sao ARN được sử dụng) bằng kỹ thuật PCR (thường là sau khi rửa giải). Quy trình chọn lọc này được lặp lại trên các trình tự đã được lựa chọn cho tổng số từ khoảng ba đến mười vòng lặp lại của quy trình chọn lọc này. Sau đó các oligonucleotit thu được được khuếch đại, tách dòng, và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình chuẩn để nhận diện các trình tự của các oligonucleotit có khả năng liên kết với phối tử đích. Khi trình tự aptame đã được nhận diện, aptame này có thể được tối ưu hóa thêm bằng cách thực hiện các vòng chọn lọc bổ sung bắt đầu từ nguồn oligonucleotit chứa trình tự aptame được gây đột biến.

Kỹ thuật sàng lọc aptame *in vivo* có thể được sử dụng sau một hoặc nhiều vòng sàng lọc *in vitro* (ví dụ, SELEX). Ví dụ, König, J. et al. (RNA. 2007, 13(4):614–622,

được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) mô tả sự kết hợp SELEX và hệ thống lai ba ở nấm men để chọn lọc aptame trên in vivo.

Gen đích

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

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

Cấu trúc biểu hiện

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng vector tái tổ hợp để đưa vào tế bào đích polynucleotit mã hóa gen đích và chứa caxet điều hòa gen được mô tả ở đây. Trong nhiều phương án, cấu trúc ADN tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm các yếu tố ADN bổ sung bao gồm các đoạn ADN chuẩn bị cho sự sao chép của ADN trong tế bào chủ và sự biểu hiện

của gen đích trong tế bào đó ở các mức thích hợp. Người có hiểu biết trung bình hiểu rõ là các trình tự kiểm soát biểu hiện (trình tự khởi động, trình tự tăng cường, và tương tự) được lựa chọn dựa vào khả năng tăng cường sự biểu hiện của gen đích trong tế bào đích của chúng. “Vector” có nghĩa là plasmit tái tổ hợp, nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (YAC), nhiễm sắc thể nhỏ, dẫn xuất plasmit vòng nhỏ ADN hoặc virus (bao gồm các trình tự thu được từ virus) mà chứa polynucleotit cần được phân phối vào tế bào chủ, in vitro hoặc in vivo. Trong một phương án, vector tái tổ hợp này là vector virus hoặc tổ hợp của nhiều vector virus.

Các vector virus để biểu hiện gen đích qua trung gian aptame trong tế bào đích, mô hoặc sinh vật đích đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm các vector adenovirus (AV), vector virus liên hợp adeno (AAV), vector retrovirus và vector lentivirus, và các vector Herpes simplex typ 1 (HSV1).

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

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

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

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

Phương pháp điều hòa sự biểu hiện gen đích

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

Trong một phương án, một hoặc nhiều casset điều hòa gen được gắn xen vào 3' UTR và/hoặc 5' UTR của gen đích. Trong một phương án, một casset điều hòa gen duy nhất được gắn xen vào 3' UTR của gen đích. Trong các phương án khác 2, 3, 4, hoặc nhiều casset điều hòa gen được gắn xen vào gen đích. Trong một phương án, hai casset

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

Trong một phương án, caxet polynucleotit theo sáng chế là hữu hiệu trong việc điều hòa sự biểu hiện gen đích khi được đặt xuôi dòng (nghĩa là, 3') của codon khởi đầu gen đích. Trong một phương án, khi caxet polynucleotit được gắn xen xuôi dòng codon khởi đầu dịch mã của gen đích, công tắc ribo bắt liền kề với codon khởi đầu này. Trong các phương án khác, công tắc ribo này là khoảng từ 1 đến khoảng 100, khoảng 1 đến khoảng 50, hoặc khoảng 1 đến khoảng 20 nucleotit từ codon khởi đầu của gen đích. Trong một phương án, caxet polynucleotit chứa trình tự peptit 2A nằm giữa đầu 3' của công tắc ribo và trình tự mã hóa gen đích. Trong một phương án, caxet polynucleotit chứa trình tự peptit 2A và cầu nối ("cầu nối 2A") nằm giữa đầu 3' của công tắc ribo và trình tự mã hóa gen đích. Trình tự 2A được sử dụng trong phần Ví dụ được nhận diện từ virus *Thoseaasigna*, do đó đôi khi nó được gọi là "T2A." Thay vì T2A, các trình tự khác mà tách các polypeptit dẫn đầu khỏi sản phẩm gen còn lại có thể được sử dụng. Các peptit 2A khác bao gồm các peptit được nhận diện trong Picornavirus: virus gây bệnh chân-và-miệng (F2A, virus được phát hiện đầu tiên), virus equine rhinitis A (E2A), và porcine teschovirus (P2A). Các peptit 2A khác bao gồm peptit 2A từ rotavirus typ C.

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

Phương pháp điều trị và các dược phẩm

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất phương pháp điều hòa mức nồng độ protein điều trị được phân phối bằng liệu pháp gen. Trong phương án này, "gen đích" có thể mã

hóa protein điều trị. “Gen đích” này có thể mã hóa protein mà là nội sinh hoặc ngoại sinh với tế bào này.

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

Tuy nhiên, do sự có mặt của caxet điều hòa trong trình tự gen đích, gen đích này không được biểu hiện ở mức độ đáng kể. Trong một số phương án, gen đích là ở "trạng thái tắt" khi vắng mặt phối tử đặc hiệu mà liên kết với aptame nằm trong công tắc ribo của caxet điều hòa này. Chỉ khi phối tử đặc hiệu aptame được sử dụng (hoặc theo cách khác, có mặt với lượng đủ) sự biểu hiện gen đích mới được hoạt hóa. Trong các phương án khác, gen đích là ở "trạng thái tắt" khi có mặt phối tử đặc hiệu mà liên kết với aptame nằm trong công tắc ribo của caxet điều hòa này. Khi dùng việc sử dụng (hoặc theo cách khác, phối tử có mặt với lượng đủ thấp), sự biểu hiện gen đích sẽ xảy ra.

Việc phân phối cấu trúc vector chứa gen đích và việc phân phối phối tử hoạt hóa thường được tách riêng về mặt thời gian. Việc phân phối phối tử hoạt hóa sẽ kiểm soát khi nào gen đích được biểu hiện, cũng như mức độ biểu hiện protein. Phối tử này có thể được phân phối bằng nhiều đường bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đường miệng, trong cơ (IM), trong tĩnh mạch (IV), trong mắt, hoặc khu trú.

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

Sáng chế cho phép biểu hiện gen chuyển điều trị được kiểm soát theo thời gian, theo cách được quyết định bởi việc sử dụng liều theo thời gian của phối tử đặc hiệu với aptame trong công tắc ribo của caxet polynucleotit điều hòa. Sự biểu hiện gen chuyển điều trị được tăng cường chỉ khi sử dụng phối tử (trong trường hợp của công tắc ribo

“bật”), làm tăng tính an toàn của việc điều trị bằng liệu pháp gen bằng cách cho phép gen đích bị tắt khi vắng mặt phối tử.

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

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

Mức sử dụng liều và thời gian sử dụng liều của protein điều trị có thể là quan trọng đối với tác dụng điều trị. Ví dụ, khi phân phối AVASTIN (kháng thể kháng VEGF) cho bệnh ung thư. Sáng chế làm tăng tính dễ dàng của việc sử dụng liều đáp ứng với việc theo dõi mức protein điều trị và tác dụng của protein điều trị.

Trong một phương án, gen đích này có thể mã hóa nucleaza mà có thể gắn đích và biên tập trình tự ADN cụ thể. Các nucleaza này bao gồm Cas9, nucleaza chứa ngón tay kềm, hoặc TALEN. Trong trường hợp của các nucleaza này, protein nucleaza có thể được yêu cầu chỉ trong khoảng thời gian ngắn đủ để biên tập các gen đích nội sinh. Tuy nhiên, nếu gen nucleaza không được điều hòa được phân phối vào cơ thể, protein này có thể tồn tại trong suốt thời gian sống còn lại của tế bào. Trong trường hợp của các nucleaza, nguy cơ biên tập nhầm đích ngày càng tăng khi nucleaza này tồn tại càng lâu dài. Việc điều hòa sự biểu hiện của các protein này có ưu điểm là rất an toàn. Trong trường hợp này, vector chứa gen đích nucleaza mang caxet điều hòa có thể được phân phối đến tế bào thích hợp trong cơ thể. Gen đích này là ở trạng thái “tắt” khi vắng mặt phối tử đặc hiệu

caxet, do đó không có nucleaza nào được sản sinh ra. Chỉ khi phôi tử hoạt hóa được sử dụng, nucleaza này mới được sản sinh. Khi thời gian trôi qua đủ để cho phép việc biên tập đầy đủ xảy ra, phôi tử này sẽ bị thu hồi và không được sử dụng lại. Do đó, sau đó gen nucleaza là ở trạng thái “tắt” và không có nucleaza nào được sản xuất thêm và việc biên tập dừng lại. Phương pháp này có thể được sử dụng để sửa các tình trạng di truyền, bao gồm nhiều bệnh võng mạc di truyền như LCA10 bị gây ra bởi các đột biến trong CEP290 và bệnh Stargardt bị gây ra bởi các đột biến trong ABCA4.

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

Nhiều loại gen đích đặc hiệu khác nhau, cho phép điều trị nhiều loại bệnh và tình trạng cụ thể khác nhau, là thích hợp để sử dụng trong sáng chế. Ví dụ, insulin hoặc chất tương tự insulin (tốt hơn, nếu là insulin người hoặc chất tương tự insulin người) có thể được sử dụng làm gen đích để điều trị bệnh đái tháo đường typ I, bệnh đái tháo đường typ II, hoặc hội chứng chuyển hóa; hormon tăng trưởng người có thể được sử dụng làm gen đích để điều trị cho trẻ em mắc các rối loạn tăng trưởng hoặc người trưởng thành bị thiếu hormon tăng trưởng; erythropoietin (tốt hơn, là erythropoietin người) có thể được sử dụng làm gen đích để điều trị chứng thiếu máu do bệnh thận mãn tính, chứng thiếu máu do rối loạn sinh tủy, hoặc chứng thiếu máu do hóa trị liệu ung thư.

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

Các phôi tử được sử dụng trong sáng chế thường được kết hợp với một hoặc nhiều chất mang được dùng để tạo thành dược phẩm thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân. Các

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

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

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

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

Sản phẩm của quá trình sản xuất và kit

Cũng được đề xuất là các kit hoặc sản phẩm của quá trình sản xuất để sử dụng trong các phương pháp được mô tả ở đây. Theo nhiều khía cạnh, các kit chứa các chế phẩm được mô tả ở đây (ví dụ, các chế phẩm để phân phối vectơ chứa gen đích mang caxet điều hòa gen) trong đồ bao gói thích hợp. Đồ bao gói thích hợp cho các chế phẩm (như các chế phẩm tiêm dùng cho mắt) được mô tả ở đây đã được biết đến trong lĩnh vực

này, và bao gồm, ví dụ, các lọ nhỏ (như các lọ nhỏ kín), bình, ống tiêm, chai, lọ, đồ bao gói dẻo (ví dụ, túi Mylar hoặc nhựa kín), và tương tự. Các sản phẩm của quá trình sản xuất có thể còn được tiệt trùng và/hoặc bịt kín.

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

“Sự tương đồng” và “tương đồng” như được sử dụng ở đây đề cập đến tỉ lệ phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự polynucleotit hoặc giữa hai trình tự polypeptit. Sự tương ứng giữa một trình tự với một trình tự khác có thể được xác định bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, sự tương đồng có thể được xác định bằng cách so sánh trực tiếp hai phân tử polypeptit bằng cách sắp xếp thẳng hàng thông tin trình tự và sử dụng các chương trình máy tính dễ dàng sẵn có. Hai trình tự polynucleotit hoặc hai trình tự polypeptit là “gần như tương đồng” với nhau nếu, sau khi được sắp xếp thẳng hàng tối ưu với các gắn xen hoặc mất đoạn thích hợp, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, và ít nhất khoảng 95% nucleotit hoặc axit amin, tương ứng, bắt cặp trên độ dài xác định của các phân tử này, như được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp trên đây.

“Tỉ lệ phần trăm đồng nhất trình tự” đối với trình tự polypeptit hoặc axit nucleic tham chiếu được xác định là tỉ lệ phần trăm các gốc axit amin hoặc nucleotit trong trình tự ứng viên là giống với các gốc axit amin hoặc nucleotit trong trình tự polypeptit hoặc axit nucleic tham chiếu, sau khi sắp xếp thẳng hàng các trình tự này và đưa vào các khoảng trống, nếu cần, để đạt được tỉ lệ phần trăm đồng nhất trình tự tối đa. Việc sắp xếp thẳng hàng nhằm mục đích xác định tỉ lệ phần trăm đồng nhất trình tự axit amin hoặc axit

nucleic có thể đạt được theo nhiều cách đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách sử dụng chương trình phần mềm máy tính sẵn có công khai bao gồm phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR).

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

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

Bảng dưới đây chứa danh mục các trình tự ADN của các cấu trúc được mô tả ở đây cũng như các trình tự khác như đã mô tả. Trình tự ribozym là các chữ in thường được gạch chân, in nghiêng; thân 3 cặp bazo (3HP) bổ sung là các chữ in thường được gạch chân hai lần; trình tự aptame là các chữ in thường được gạch chân bằng đường lượn sóng; các trình tự thân chung giữa thân xoắn và thân aptame là các chữ in thường được tô màu xám; và trình tự cầu nối 2A là các chữ cái in thường nét to được gạch chân; các trình tự mã hóa là các chữ cái in hoa.

SEQ ID NO.:	Mô tả	Trình tự
1	Dạng xoắn-ong trong pEGFP-C1	<i>GTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACG</i> <i>AGCTGTACAAGTAAaccgcggttgaatgcggccgtgaaataatt</i> <i>tacacgtcgggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgccgccat</i> accacattttagagaggttttacttgctttaaaaaacctccacacctccccctgaac ctgaaacataaaatgaatgc
2	Dạng xoắn-es	GTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGAC

	trong pEGFPC1	GAGCTGTACAAGTAAaccgcggaataaagegggtacaagcc <u>cgcaaaaatagcagagtaatgtcgcgatagcgcgccattaatgcagcttat</u> tggcgggccgcataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccac acctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
3	Dạng xoắn-ong- đột biến trong pEGFP-C1	GTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGAC GAGCTGTACAAGTAAaccgcggttgatgcggccgtgtaaat <u>aatttacacgtcgggtctcaagcccgataaacgcagagagcaag</u> GCGGC CGCCATAACCATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTT TAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGA AACATAAAATGAATGC
4	wasp_no Sac 0HP trong pEGFP-C1	GTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGAC GAGCTGTACAAGTAAacttgtaatgcggccgtgtaataatttac <u>acgtcgggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgccgcatacc</u> acattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccacacctccccctgaacctg aaacataaaatgaatgc
5	wasp_no Sac 3HP trong pEGFP-C1	GTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGAC GAGCTGTACAAGTAAacgccttgtaatgcggccgtgtaataat <u>ttacacgtcgggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgccgcca</u> taccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccacacctccccctgaa cctgaaacataaaatgaatgc
6	wasp_No Sac 0HP trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAAacttgtaatgcggccgtgtaata <u>atttacacgtcgggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgccgc</u> cataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccacacctccccctg aacctgaaacataaaatgaatg
7	wasp_No Sac 3HP trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAAacgccttgtaatgcggccgtgtaa <u>ataatttacacgtcgggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgcc</u> gccataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccacacctcccc tgaacctgaaacataaaatgaatgc
8	waspGua1 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAAacgccttgtaatgcggccgtgtaa

		<u>atcactcatataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaa</u> <u>atgtccgactatgggtgatttacacgtcgggtctcaagcccgataaacgcagag</u> <u>agcaaggcgccgccataaccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacct</u> cccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
9	waspGua2 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggccgtgtaa</u> <u>aactcatataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaa</u> <u>atgtccgactatgggttttacacgtcgggtctcaagcccgataaacgcagagagc</u> <u>aaggcgccgccataaccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccc</u> acacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
10	waspGua3 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggccgtgtaa</u> <u>ctcatataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaa</u> <u>atgtccgactatgggttttacacgtcgggtctcaagcccgataaacgcagagagc</u> <u>aaggcgccgccataaccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccc</u> acacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
11	waspGua4 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggccgtgtat</u> <u>catataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaa</u> <u>atgtccgactatgggttacacgtcgggtctcaagcccgataaacgcagagagc</u> <u>aaggcgccgccataaccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccc</u> acacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
12	waspGua5 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggccgtgttca</u> <u>tataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaa</u> <u>atgtccgactatgggttacacgtcgggtctcaagcccgataaacgcagagagc</u> <u>aaggcgccgccataaccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccc</u> acacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
13	waspGua6 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggccgtgtcat</u> <u>ataatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaa</u> <u>atgtccgactatgggttacacgtcgggtctcaagcccgataaacgcagagagc</u> <u>aaggcgccgccataaccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccc</u> acacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc

		cataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctg aacctgaaacataaaatgaatgc
14	waspGua7 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggccgtgcat</u> <u>ataatcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgac</u> <u>tatgcacgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgccgcc</u> ataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctga acctgaaacataaaatgaatgc
15	waspGua8 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggccgtgatat</u> <u>aatcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgacta</u> <u>tcacgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgccgccata</u> ccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacc tgaaacataaaatgaatgc
16	waspGua9 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggccgtatata</u> <u>atcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactat</u> <u>acgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgccgccatacc</u> acattttagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctg aaacataaaatgaatgc
17	waspGua12 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggccgataat</u> <u>cgctggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactcgtc</u> <u>ggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgccgccataccacattt</u> gtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaaca taaaatgaatgc
18	waspGua13 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggccataatc</u> <u>gcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactgtcgg</u> <u>tctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgccgccataccacatttgt</u> agaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacata

		aatgaatgc
19	waspGua14 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggcctaatacg</u> <u>cgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgacgtcggtc</u> <u>tcaagcccgataaacgcagagagcaaggcggcgccataccacattttag</u> aggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaa atgaatgc
20	waspGua15 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggccataataat</u> <u>cgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactatgt</u> <u>cggctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcggcgccataccacat</u> tttagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaa cataaaatgaatgc
21	waspGua16 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggccataataatc</u> <u>gcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactatcgt</u> <u>gtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcggcgccataccacatttg</u> tagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacat aaaatgaatgc
22	waspGua17 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggctataatacg</u> <u>cgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactatcgggt</u> <u>ctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcggcgccataccacatttcta</u> gaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataa aatgaatgc
23	waspGua18 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggccgtgtata</u> <u>atcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactac</u> <u>acgtcgggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcggcgccatacc</u> acattttagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctg aaacataaaatgaatgc
24	waspGua19	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC

	trong pLuc	GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgeggccgtataa</u> <u>tcgctggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactaac</u> <u>gtcggctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgccgccataccac</u> attttagagggtttacttgctttaaaaaacctccacacctccccctgaacctgaa acataaaatgaatgc
25	waspGua20 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgeggccgtataat</u> <u>cgcgtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacgt</u> <u>cggctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgccgccataccacat</u> tttagagggtttacttgctttaaaaaacctccacacctccccctgaacctgaaa cataaaatgaatgc
26	Epo-waspGua16	GCTGTACACGGGAGAGGTCTGCAGGAGAGGGG ACAGGTGAggatccac <u>gccttgtaatgcggcatataatcgcgtggatat</u> <u>ggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactattcggctcaagcc</u> <u>cgataaacgcagagagcaaggcgctcgagggccagatctaattcaccca</u> ccagtgcaggctgcctatcagaaagtgggtggctgggtgtggctaataccctggc ccacaagtatacctaagctcgctttctgtgtccaattctattaaaggttccttt
27	Epo- mutwaspGua16	GCTGTACACGGGAGAGGTCTGCAGGAGAGGGG ACAGGTGAggatccac <u>gccttgatgcggcatataatcgcgtggatat</u> <u>ggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactattcggctcaagcc</u> <u>cgataaacgcagagagcaaggcgctcgagggccagatctaattcaccca</u> ccagtgcaggctgcctatcagaaagtgggtggctgggtgtggctaataccctggc ccacaagtatacctaagctcgctttctgtgtccaattctattaaaggttccttt
28	twister_theo_1 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggcatgatac</u> <u>cagccgaaaggcccttggcagcatcggctcaagcccgataaacgcagag</u> <u>agcaaggcgccgccataccacattttagagggtttacttgctttaaaaaac</u> ctccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
29	twister_theo_2 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgtaatgcggcgccgata</u> <u>ccagccgaaaggcccttggcagcgtcggctcaagcccgataaacgcag</u> <u>agagcaaggcgccgccataccacattttagagggtttacttgctttaaaaa</u>

		cctccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
30	twister_theo_3 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgaatgcggcgatac</u> <u>cagccgaaaggcccttggcagcgttcggtctcaagcccgataaacgcagag</u> <u>agcaaggcgccgccataccacattttagagggtttacttgcttataaaacct</u> ccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
31	twister_theo_4 trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAA <u>acgccttgaatgcggcctgatac</u> <u>cagccgaaaggcccttggcagcagtcggtctcaagcccgataaacgcagag</u> <u>agcaaggcgccgccataccacattttagagggtttacttgcttataaaacct</u> ccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
32	ATG_wtWaspG ua16 trong pLuc	ATG <u>acgccttgaatgcggcatataatcgcg</u> tgataggcacgcaagttct <u>accgggcaccgtaaatgtccgactattcggtctcaagcccgataaacgcaga</u> <u>gagcaaggcggaaggcgatcttcaggtagtggcgagggcagaggaagtctt</u> <u>ctaacatgcggtgacgtggaggagaatccccggccccGAAGACGCCA</u> AAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCCA
33	ATG_mutWasp Gua16 trong pLuc	ATG <u>acgccttgtgatgcggcatataatcgcg</u> tgataggcacgcaagttct <u>accgggcaccgtaaatgtccgactattcggtctcaagcccgataaacgcaga</u> <u>gagcaaggcggaaggcgatcttcaggtagtggcgagggcagaggaagtctt</u> <u>ctaacatgcggtgacgtggaggagaatccccggccccGAAGACGCCA</u> AAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCCA
34	10aa_wtWaspG ua16 trong pLuc	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACC <u>acgc</u> <u>cttgaatgcggcatataatcgcg</u> tgataggcacgcaagttctaccgggca <u>ccgtaaatgtccgactattcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaagg</u> <u>cgaaggcgatcttcaggtagtggcgagggcagaggaagtcttctaacatgc</u> <u>ggtgacgtggaggagaatccccggccccGAAGACGCCAAAAAC</u> ATAAAGAAAGGCCCGGCGCCA
35	10aa_mutWasp Gua16 trong pLuc	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACC <u>acgc</u> <u>cttgtgatgcggcatataatcgcg</u> tgataggcacgcaagttctaccgggca <u>ccgtaaatgtccgactattcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaagg</u> <u>cgaaggcgatcttcaggtagtggcgagggcagaggaagtcttctaacatgc</u> <u>ggtgacgtggaggagaatccccggccccGAAGACGCCAAAAAC</u>

		ATAAAGAAAGGCCCGGCGCCA
36	GT_8bp trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAAaaggggtataatcgcggtggatat ggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgactacgacctgtaatgcg gccgtgtaataatttacacgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagc aaggcgcccgccataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctccc acacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
37	TG_9b trong pLuc	TCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGC GGAAAGATCGCCGTGTAAacgacctgtaatgcggcggtgtaa ataatttacacgtcggtctcaagcccgataaacgcagagagcaaggcgat aatcgcggtggatatggcacgcaagtttctaccgggcaccgtaaatgtccgacta cgacctgataccacattttagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctc ccccctgaacctgaaacataaaatgaatgc
38	Ribozym xoắn là từ <i>Nasonia vitripennis</i> (dạng xoắn ong)	cttgtaatgcggccgtgtaataatttacacgtcggtctcaagcccgataaacgc agagagcaag
39	Ribozym xoắn là từ mẫu môi trường (dạng xoắn es)	ggcaataaagcgggttacaagcccgcaaaaatagcagagtaatgtcgcgatag cgcggcattaatgcagctttattg

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

VÍ DỤ 1

Các ribozym xoắn tự phân cắt và ức chế sự biểu hiện gen ở tế bào động vật có vú

Quy trình thử nghiệm:

Các cấu trúc plasmit: oligonucleotit chứa các trình tự ribozym xoắn đột biến hoặc kiểu hoang, từ *Nasonia Vitripennis* (ong) hoặc từ các mẫu môi trường, được gắn bên sườn bởi các vị trí BsrGI và MfeI, được tổng hợp (IDT). Oligonucleotit (“oligo”) đã tổng hợp được tiêu hóa bằng BsrGI và MfeI và được tách dòng vào pEGFP-C1 (Clontech) được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn thích hợp. Trình tự của các vectơ đã được tạo ra được kiểm tra bằng cách giải trình tự ADN (Genewiz).

Quá trình chuyển nạp và đo sự phát huỳnh quang GFP: $3,5 \times 10^4$ tế bào HEK 293 được đưa vào đĩa đáy phẳng 96 giếng một ngày trước khi chuyển nạp. ADN plasmit (500 ng) được bổ sung vào ống hoặc đĩa đáy chữ U 96 giếng. Chất phản ứng TransIT-293 (Mirus; 1,4 μ l) được bổ sung riêng vào 50 μ l môi trường Opti-mem I (Life Technologies), và được để yên trong 5 phút ở nhiệt độ phòng (“RT”). Sau đó, 50 μ l chất phản ứng chuyển nạp đã pha loãng này được bổ sung vào ADN, được trộn và ủ ở RT trong 20 phút. Cuối cùng, 7 μ l dung dịch này được bổ sung vào giếng chứa các tế bào trong đĩa 96 giếng. Cấu trúc LacZ không biểu hiện GFP được sử dụng làm đối chứng âm nền. Cường độ phát huỳnh quang GFP được đo bằng máy đọc đĩa Tecan, sử dụng bước sóng kích thích ở 484 nm, bước sóng phát xạ ở 510 nm và độ rộng dải kích thích là 5 nm. Cường độ phát huỳnh quang GFP được thể hiện bằng giá trị được tạo ra bởi các cấu trúc GFP trừ đi giá trị được tạo ra bởi cấu trúc LacZ.

Kết quả:

Các ribozym xoắn tồn tại ở nhiều loài vi khuẩn và loài có nhân điển hình. Tuy nhiên, hoạt tính tự phân cắt của chúng ở các tế bào động vật có vú vẫn chưa được xác định. Để kiểm tra ribozym xoắn có thể cắt mARN và ức chế sự biểu hiện gen ở tế bào động vật có vú hay không, trình tự ribozym xoắn từ *N. Vitripennis* (ong) và trình tự ribozym xoắn từ các mẫu môi trường được gắn xen vào 3' UTR của gen EGFP trong vectơ pEGFP-C1. Như được thể hiện trong Fig. 1a, sự gắn xen ribozym xoắn-ong vào 3' UTR gây ra tác dụng ức chế 97% và 36 lần sự biểu hiện GFP so với cấu trúc đối chứng pEGFP-C1. Trình tự xoắn từ mẫu môi trường (dạng xoắn es) không dẫn đến tác dụng ức chế sự biểu hiện GFP mạnh như dạng xoắn ong, mà gây ra tác dụng ức chế khoảng 50% sự biểu hiện GFP so với vectơ GFP đối chứng. Để xác định thêm là tác dụng ức chế sự biểu hiện GFP là do sự phân cắt ribozym xoắn, cấu trúc đột biến được tạo ra trong đó A6 được thay thế bằng G, tạo ra ribozym xoắn không có khả năng phân cắt. Đột biến A6G

triệt tiêu hoàn toàn tác dụng ức chế sự biểu hiện GFP, trong khi ribozym xoắn kiểu hoang gây ra sự giảm 44 lần, như được thể hiện trong Fig. 1b. Các kết quả này chỉ ra là trong các tế bào động vật có vú các ribozym xoắn tự phân cắt khi có mặt trong ARN gen đích và do đó ức chế sự biểu hiện gen đích.

VÍ DỤ 2

Biến đổi của trình tự thân P1 của ribozym xoắn cải thiện hoạt tính phân cắt ribozym xoắn

Quy trình thử nghiệm:

Các cấu trúc plasmid: Các đoạn mỗi sau đây được sử dụng để tạo ra các cấu trúc GFP_wasp_No Sac 0HP hoặc GFP_wasp_No Sac 3HP: các đoạn mỗi xuôi NoSac_Fwd (5' GCTGTACAAGTAAACTTGTAATGCGGCCGTGTAAATAA TTTAC) và NoSac3HP_Fwd (5' AGCTGTACAAGTAAACGCCTTGTAATGCGGCCGTGTAAATAATTAC) và đoạn mỗi ngược MfeI Rev (5' ACAACAACAATTGCATTCATTTTATG). Vector GFP_dạng xoắn-ong được sử dụng làm khuôn và các đoạn ADN đã khuếch đại PCR được tiêu hóa bằng BsrGI và MfeI và được tách dòng vào pEGFP-C1 được tiêu hóa bằng các enzym BsrGI và MfeI. Gen EGFP trong pEGFP-C1 được thay thế bằng gen luciferaza đom đóm để tạo ra vector pFLuc bằng cách sử dụng chiến lược tách dòng Gibson và kit tách dòng (NEB). Chiến lược này được sử dụng để tạo ra các cấu trúc Luc_wasp_No Sac 0HP và Luc_wasp_No Sac 3 HP bằng cách thay thế gen EGFP trong các cấu trúc GFP_wasp_no Sac 0HP và GFP_wasp_no Sac 3HP bằng gen luciferaza đom đóm.

Phép đo cường độ phát huỳnh quang GFP được thực hiện như đã mô tả trong Ví dụ 1.

Thử nghiệm luciferaza đom đóm của các tế bào đã nuôi cấy: 24 giờ sau khi đổi môi trường, các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ, được cân bằng đến RT trong vài phút trên bàn thí nghiệm, và sau đó được hút ra. Dung dịch đệm ly giải glo (Promega, 100 μ L, RT) được bổ sung vào, và các đĩa được để yên ở RT trong ít nhất là 5 phút. Các thành phần của giếng được trộn bằng cách nghiền 50 μ L, và 20 μ L mỗi mẫu được trộn với 20 μ L chất phản ứng glo sáng (Promega) đã được pha loãng đến 10% trong đệm ly giải glo. 96 giếng được đặt cách nhau trên đĩa trắng đục 384 giếng. Sau khi ủ 5 phút ở RT, sự phát quang được đo bằng cách sử dụng máy Tecan với thời gian đọc 500 mSec. Hoạt tính luciferaza được thể hiện bằng đơn vị ánh sáng tương đối trung bình (RLU) $\pm$ S.D.

Kết quả:

Để làm tăng thêm hoạt tính phân cắt của ribozym xoắn trong tế bào động vật có vú, và do đó làm tăng khoảng động học của tác dụng ức chế sự biểu hiện gen đích bởi ribozym, các trình tự liền kề với thân P1 của dạng xoắn được biến đổi trong cấu trúc xoắn-GFP. Đầu tiên, trình tự SacII nằm ở đầu 5' của trình tự xoắn được làm mất, tạo ra GFP_wasp_no Sac 0HP. Để xác định thân P1 dài hơn có làm ổn định ribozym xoắn và do đó làm tăng hoạt tính phân cắt của nó hay không, trình tự của vị trí SP. Bất ngờ là, như được thể hiện trong Fig. 2b, đột biến mất trình tự SacII làm tăng tác dụng ức chế được thay thế bằng CGC để tạo ra thân 3 cặp bazơ (3HP) ở gốc của thân P1 của ribozym xoắn (Fig. 2a), tạo ra cấu trúc GFP_wasp_no Sac 3Hp chế GFP, từ 37 lần bởi cấu trúc này với trình tự SacII đến 68 lần bởi cấu trúc GFP_wasp_no Sac 0HP không có vị trí SacII, gợi ý là trình tự SacII liền kề với 5' của trình tự P1 làm suy yếu hoạt tính ribozym. Việc bổ sung thân 3 bp vào gốc của thân P1 tăng cường thêm hoạt tính ribozym, gây ra tác dụng ức chế 104 lần sự biểu hiện GFP. Hoạt tính của cấu trúc xoắn biến đổi này cũng được kiểm tra bằng cách sử dụng gen luciferaza đom đóm làm gen chỉ thị. Như được thể hiện trong Fig. 2c, đột biến mất trình tự SacII gây ra sự giảm 101 lần hoạt tính luciferaza so với cấu trúc đối chứng pFLuc. Việc bổ sung thân 3bp vào thân P1 làm tăng thêm sự giảm hoạt tính luciferaza đến 254 lần so với cấu trúc đối chứng.

VÍ DỤ 3

Sử dụng xpt-guanin aptame để điều hòa sự biểu hiện gen đích bằng cách điều biến ribozym xoắn

Quy trình thử nghiệm:

Các oligo chứa trình tự ribozym xoắn được liên kết với xpt-guanin aptame được tổng hợp (IDT), và được tách dòng vào vector pLuc bằng cách sử dụng chiến lược tách dòng Gibson và kit tách dòng (NEB). Các trình tự cấu trúc được kiểm tra bằng cách giải trình tự ADN (Genewiz).

Quá trình chuyển nạp và xử lý phối tử aptame: Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp như đã mô tả trong Ví dụ 1. Bốn giờ sau khi chuyển nạp, môi trường được hút ra, và môi trường mới có hoặc không có 500 μ M guanin hoặc 1 mM guanosin (Sigma) được bổ sung vào. Thử nghiệm luciferaza được thực hiện từ 20 đến 24 giờ sau khi xử lý bằng guanin hoặc guanosin như được mô tả trong Ví dụ 2. Số lần giảm được thể hiện bằng tỷ

số là hoạt tính luciferaza thu được khi vắng mặt phối tử aptame chia cho giá trị thu được khi có mặt phối tử aptame.

Thử nghiệm ELISA để đo Epo chuột trong môi trường nuôi cấy: Dịch nổi được thu gom 18 giờ sau khi xử lý bằng được chất, và ELISA được thực hiện bằng cách sử dụng kit ELISA (R&D) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp vẽ đường cong thực nghiệm 4 tham số.

Kết quả:

Để điều hòa hoạt tính phân cắt của ribozym xoắn, và do đó điều hòa sự biểu hiện gen đích, trình tự aptame được liên kết với thân P3 của ribozym xoắn. Khi phối tử aptame không có mặt, cấu trúc của ribozym bị phá vỡ, ngăn cản sự phân cắt, và cho phép biểu hiện gen đích (Fig. 3a, ô trên cùng). Việc bổ sung phối tử aptame dẫn đến sự thay đổi cấu hình cho phép phân cắt ribozym xoắn và làm giảm sự biểu hiện gen đích (Fig. 3a, ô dưới cùng). Thân P1 của xpt-guanin aptame được ghép vào thân P3 của ribozym xoắn để tạo ra ribozym xoắn đáp ứng guanin. Trong cấu hình này (Fig. 3a), khi vắng mặt phối tử aptame, sự gắn xen trình tự aptame giữa hai nhánh của thân P3 của dạng xoắn phá vỡ cấu trúc thân P3 và ribozym xoắn, cản trở hoạt tính phân cắt và cho phép gen đích được biểu hiện. Khi có mặt phối tử aptame, sự liên kết aptame/phối tử mang các nhánh của thân lại gần nhau, tạo thuận lợi cho sự tạo thành thân P3 và hoạt tính phân cắt dạng xoắn, do đó ức chế sự biểu hiện gen đích.

Ngoài ra, tác giả sáng chế suy luận là nếu độ dài của thân nối aptame và dạng xoắn là quá dài, sự tạo thành thân có thể độc lập với sự có mặt của trình tự aptame và xảy ra khi vắng mặt phối tử aptame. Tuy nhiên, nếu thân này là quá ngắn, ngay cả khi có mặt phối tử aptame, cấu trúc thân ổn định không thể đạt được. Do đó, để xác định độ dài thân tối ưu (để đạt được đáp ứng tối ưu với phối tử aptame), độ dài của thân nối aptame và ribozym được tối ưu hóa. Tác giả sáng chế thực hiện cắt liên tiếp thân này, tạo ra tổng số 20 cấu trúc có độ dài của thân nằm trong khoảng từ 17 đến 1 bp. Như được thể hiện trong Fig. 3b, trong số tất cả 20 cấu trúc được tạo ra, Luci-waspGua16 có thân dài 3 bp nối guanin aptame trực tiếp với vòng xoắn 2, thể hiện sự giảm nhiều nhất về sự biểu hiện gen luciferaza (15 lần). Các cấu trúc có độ dài thân ngắn hơn 3 bp hoặc dài hơn 7 bp không thể hiện sự giảm đáng kể khi xử lý bằng guanin.

Sau đó cấu trúc Luci-waspGua16 được xác nhận hiệu lực trong một thử nghiệm riêng, trong đó cấu trúc đối chứng chứa đột biến không có khả năng phân cắt được đưa

vào. Như được thể hiện trong Fig. 3c, khi xử lý bằng guanin, Luci-waspGua16 làm giảm 92% (12 lần) hoạt tính luciferaza so với hoạt tính luciferaza khi không có guanin được bổ sung vào. Ngược lại, cấu trúc pLuc cũng như Luci-mutwaspGua16 không thể hiện sự giảm bất kỳ về hoạt tính luciferaza khi xử lý bằng guanin. Các kết quả này chỉ ra rằng khi xử lý bằng phối tử aptame, hoạt tính của ribozym xoắn được duy trì, dẫn đến tác dụng làm giảm sự biểu hiện gen đích. Khi guanosin được sử dụng ở nồng độ 1 mM làm phối tử aptame, cấu trúc Luci-waspG16 gây ra sự giảm 25 lần về sự biểu hiện luciferaza (Fig. 3d).

Khi waspGua16 được gắn xen vào 3' UTR của gen erythropoietin (Epo) của chuột, khi xử lý bằng guanin, sự sản sinh Epo bị giảm xấp xỉ 30% so với Epo được sản xuất từ các tế bào đối chứng được xử lý bằng dung môi. Các kết quả của tác giả sáng chế chứng minh rằng các tác giả sáng chế đã tạo ra ribozym xoắn đáp ứng guanin/guanosin, công tắc ribo xoắn tổng hợp ức chế sự biểu hiện gen đích đáp ứng với việc xử lý bằng phối tử aptame.

VÍ DỤ 4

Sử dụng theophyllin aptame để điều hòa sự biểu hiện gen đích bằng cách điều biến ribozym xoắn

Quy trình thử nghiệm:

Các oligo chứa trình tự ribozym xoắn được liên kết với theophyllin aptame được tổng hợp (IDT), và được tách dòng vào vectơ pLuc bằng cách sử dụng chiến lược tách dòng Gibson và kit tách dòng (NEB). Các trình tự cấu trúc được kiểm tra bằng cách giải trình tự ADN (Genewiz).

Quá trình chuyển nạp và thử nghiệm luciferaza đom đóm: Các tế bào HEK 293 được chuyển nạp như đã mô tả trong Ví dụ 1. Bốn giờ sau khi chuyển nạp, môi trường được hút ra, và môi trường mới có hoặc không có 2 mM theophyllin (Sigma) được bổ sung vào. Thử nghiệm luciferaza được thực hiện từ 20 đến 24 giờ sau khi xử lý bằng theophyllin như được mô tả trong Ví dụ 2. Số lần giảm được thể hiện bằng tỷ số là hoạt tính luciferaza thu được khi vắng mặt phối tử aptame chia cho giá trị thu được khi có mặt phối tử aptame.

Kết quả:

Các tác giả sáng chế kiểm tra việc sử dụng aptame bổ sung trong việc điều biến tác dụng phân cắt bởi ribozym xoắn, nhờ đó điều hòa sự biểu hiện gen đích. Dựa vào 20

cấu trúc Luci-waspGua (1-20) như được mô tả trong Ví dụ 3, trình tự thân bổ sung 3 hoặc 4 bp được sử dụng để nối theophyllin aptame với vòng 2 của ribozym xoắn. Thêm vào đó, trình tự của các thân này được thay đổi như đã chỉ ra trong Fig. 4a. Như được thể hiện trong Fig. 4b, việc xử lý bằng theophyllin gây ra sự giảm hoạt tính luciferaza ở tất cả các cấu trúc so với các mẫu không được xử lý theophyllin. Cấu trúc twister_theo_3 có sự giảm 62% sự biểu hiện gen khi xử lý bằng theophyllin. Các số liệu này chứng minh là các tác giả sáng chế đã tạo ra ribozym xoắn đáp ứng theophyllin—công tắc ribo xoắn tổng hợp.

Việc ghép theophyllin aptame và các trình tự thân vào trình tự vòng 2 trong dạng xoắn gây ra tác dụng khác nhau trên sự cản trở hoạt tính ribozym xoắn, như đã chứng minh trong Fig. 4b khi không xử lý bằng theophyllin. Cấu trúc twister_theo_3 thể hiện tác dụng cản trở hoạt tính ribozym nhiều nhất, và do đó hoạt tính luciferaza mạnh nhất, khi không có mặt phối tử aptame. Sự khác biệt giữa twister_theo_2 và twister_theo_3 là độ dài của thân nối aptame và dạng xoắn, dẫn đến sự khác biệt về khả năng cản trở hoạt tính ribozym. Khi so sánh cấu trúc twister_theo_1, 3 và 4 mà đều có cùng độ dài thân (3 bp), sự khác biệt nằm ở thành phần của thân này. Các kết quả này chỉ ra rằng thành phần trình tự của thân cũng có tác động đến hoạt tính ribozym. Do đó, ribozym đáp ứng phối tử aptame có thể thu được bằng cách tối ưu hóa độ dài và thành phần trình tự của vùng thân tác động mà nối aptame và ribozym xoắn.

VÍ DỤ 5

Các ribozym tự phân cắt ức chế sự biểu hiện gen đích khi đặt xuôi dòng codon khởi đầu dịch mã.

Quy trình thử nghiệm:

Các cấu trúc plasmit: dsADN tổng hợp (IDT) và các kỹ thuật tách dòng giới hạn chuẩn được sử dụng để đưa các trình tự kiểm tra vào vectơ đã được tạo ra trước đó pHDM.2b-LacZ (sơ đồ: trình tự khởi động CMV – intron – LacZ – polyA). Tất cả các cấu trúc được kiểm tra bằng cách giải trình tự ADN.

Quá trình chuyển nạp: Các tế bào HEK293 (ATCC CRL-1573; được nuôi trong DMEM, FBS 10%, 37°C, CO₂ 10%) được phủ lên đĩa đáy phẳng 96 giếng (100 µL) một ngày trước khi chuyển nạp, sao cho mức độ hợp dòng là khoảng 70% vào thời điểm chuyển nạp. ADN plasmit (500 ng) được bổ sung vào ống hoặc đĩa đáy chữ U 96 giếng. Chất phản ứng TransIT-293 (Mirus; 1,4 µL) được bổ sung riêng biệt vào 50 µL môi

trường Optimem I (Life Technologies), và được để yên trong 5 phút ở RT. Sau đó, 50 μ l chất phản ứng chuyển nạp đã pha loãng này được bổ sung vào ADN, được trộn và ủ ở RT trong 20 phút. Cuối cùng, 7 μ l dung dịch này được bổ sung vào giếng chứa các tế bào trong đĩa 96 giếng.

Thử nghiệm beta-galactosidaza (LacZ): 24 giờ sau khi chuyển nạp, các đĩa được lấy ra khỏi tủ ủ, được cân bằng đến RT trong vài phút trên bàn thí nghiệm, sau đó được hút ra. Dung dịch đệm ly giải glo (Promega, 100 μ L, RT) được bổ sung vào, và các đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong ít nhất là 5 phút. Sau đó, các thành phần của giếng được trộn bằng cách nghiền 50 μ L. Mẫu chứa 2 μ L được lấy từ mỗi giếng và được pha loãng vào 200 μ L dung dịch đệm ly giải glo (pha loãng 101 lần). Các dung dịch pha loãng được trộn bằng cách nghiền, và sau đó 20 μ L mỗi dung dịch pha loãng được trộn với 20 μ L chất phản ứng beta-glo (Promega) trong đĩa rắn màu trắng 384 giếng. Ba mươi phút sau, cường độ phát quang được đo đối với đơn vị ánh sáng tương đối (RLU). Hầu hết, 96 giếng trong số 384 giếng được sử dụng, trong mô hình sao cho mọi giếng được thử nghiệm đều được bao quanh bởi các giếng rỗng hoặc gờ của đĩa, để làm giảm sự nhiễu chéo. Tất cả các giá trị đo đều nằm trong khoảng tuyến tính của thử nghiệm này (được xác định bằng cách so sánh nhiều mẫu được pha loãng và không được pha loãng khác nhau; số liệu không được thể hiện).

Kết quả: Các cấu trúc được tạo ra trong đó ATG trong khung khả dụng duy nhất cho gen chỉ thị LacZ là ngược dòng ribozym đầu búa hoặc kẹp tóc (được mô tả trong U.S. 2015/0056174, *xem, ví dụ*, Fig. 1E, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) và với mỗi cấu trúc tác giả sáng chế tạo ra ba biến thể bằng cách đặt trình tự ribozym vào mỗi khung có thể. Trong tất cả các cấu trúc, ribozym này được theo sau bởi cầu nối-2A-peptit-LacZ. Các phiên bản với các ribozym đột biến (bất hoạt) còn được tạo ra làm đối chứng. Các đột biến được đưa vào mỗi ribozym để loại bỏ các codon dừng tiềm tàng. Các trình tự nucleotit và protein được đưa ra trong các Fig. 7a và 7b. (hàng trên cùng trong mỗi trường hợp là ribozym mẹ, không được dịch mã xuyên suốt; các dấu chấm trong trình tự nucleotit được sử dụng để chỉ ra “giống như hàng trên cùng”.)

Các cấu trúc này và các phiên bản ribozym bị bất hoạt của chúng được chuyển nạp vào các tế bào HEK293, và sau 24 giờ đo sự biểu hiện LacZ, như được thể hiện trong Fig. 7c. Các kết quả từ các ribozym đầu búa (HH) được thể hiện bên trái trong Fig. 7c. Việc đưa ribozym HH vào 5' UTR gây ra sự giảm 162 lần sự biểu hiện so với ribozym

đột biến bất hoạt. Tuy nhiên, việc dịch mã xuyên suốt (khung 2, mũi tên) gây ra sự giảm biểu hiện 513 lần được cải thiện nhiều. Khung 1 không hoạt động, mà được dự đoán là do các codon dừng trong khung trong trình tự ribozym không thể được loại bỏ. Các ribozym kẹp tóc (HP) được thể hiện bên phải trong Fig. 7c. Việc đưa ribozym HP vào 5' UTR gây ra sự giảm 133 lần, nhưng việc dịch mã trong khung 1 gây ra sự giảm biểu hiện 502 lần (mũi tên). Các khung khác cũng hoạt động. Các tác giả sáng chế đã tạo ra các cấu trúc ribozym mới thể hiện khả năng kiểm soát gen tốt hơn so với sản phẩm đã được công bố. Các cấu trúc biểu hiện gen được mô tả ở đây trong đó ribozym không được đặt trong UTR, mà nằm sau codon khởi đầu này. Tác dụng kiểm soát sự biểu hiện gen đích có thể được tăng cường đáng kể bằng cách đặt ribozym 3' của codon khởi đầu dịch mã so với việc đặt ribozym vào 5' UTR. Khi ribozym này được đặt xuôi dòng codon khởi đầu dịch mã, sự tự phân cắt loại bỏ codon khởi đầu này khỏi phần còn lại của mARN của gen đích, gây ra sự biểu hiện nền còn lại giảm.

VÍ DỤ 6

Công tắc ribo xoắn đáp ứng guanin hoạt động xuôi dòng codon khởi đầu dịch mã.

Quy trình thử nghiệm:

Các oligo chứa codon khởi đầu hoặc trình tự mã hóa cho 10 axit amin đầu tiên của GFP và waspGua16 được theo sau bởi trình tự cầu nối2A được tổng hợp (IDT) và được tách dòng vào vectơ pLuc bằng cách sử dụng chiến lược tách dòng Gibson và kit tách dòng (NEB). Quá trình chuyển nạp và thử nghiệm luciferaza của các tế bào nuôi cấy được thực hiện như đã mô tả trong Ví dụ 3.

Kết quả:

Để kiểm tra khả năng di động của ribozym xoắn đáp ứng phối tử aptame, các tác giả sáng chế đặt trình tự waspGua16 xuôi dòng (i) codon khởi đầu dịch mã của gen luciferaza hoặc (ii) trình tự mã hóa cho 10 aa đầu tiên của GFP, như được minh họa trong Fig. 5a. Việc dung hợp trình tự công tắc ribo xoắn với gen đích xuôi dòng sẽ tạo ra đuôi đầu cùng N khi sản phẩm gen đích được biểu hiện, mà có thể tác động tiềm tàng đến chức năng của protein. Để loại bỏ đuôi đầu cùng N này, trình tự cầu nối2A được gắn xen giữa công tắc ribo xoắn và trình tự gen đích xuôi dòng. Như được thể hiện trong Fig. 5b, việc gắn xen caxet polynucleotit mang công tắc ribo xoắn không gây suy yếu sự biểu hiện gen luciferaza khi vắng mặt phối tử aptame, guanin, chỉ ra hoạt tính ribozym bị cản trở. Tuy nhiên, khi có mặt guanin, sự biểu hiện gen luciferaza bị giảm 68% so với đối chứng

không được xử lý đối với cả hai cấu trúc ATG_waspGua16 và 10aa_waspGua16, trong khi các cấu trúc đối chứng chứa trình tự xoắn đột biến không thể hiện sự giảm biểu hiện luciferaza đáp ứng với việc xử lý bằng guanin. Kết quả này chứng minh là sự giảm biểu hiện gen đích với caxet polynucleotit mang các công tắc ribo xoắn hoạt động là do sự duy trì hoạt tính ribozym xoắn bởi sự liên kết aptame/phối tử. Các kết quả của tác giả sáng chế chỉ ra là công tắc ribo xoắn hoạt động xuôi dòng codon khởi đầu trong trình tự mã hóa, chứng minh khả năng di động của caxet polynucleotit mang công tắc ribo xoắn tổng hợp.

VÍ DỤ 7

Sử dụng guanin aptame để tạo ra công tắc ribo xoắn BẬT đáp ứng guanin

Quy trình thử nghiệm:

Các cấu trúc plasmit: Các oligo chứa trình tự aptame liên kết với thân P1 của ribozym xoắn được tổng hợp (IDT) và được tách dòng vào vector pLuc bằng cách sử dụng chiến lược tách dòng Gibson và kit tách dòng (NEB).

Quá trình chuyển nạp được thực hiện như đã mô tả trong Ví dụ 1, và thử nghiệm luciferaza đom đóm được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 3.

Kết quả:

Các công tắc ribo xoắn được mô tả trong các Ví dụ 3 và 4 ức chế sự biểu hiện gen đích đáp ứng với việc xử lý bằng phối tử aptame, và do đó là công tắc ribo xoắn TẮT. Ở đây, một chiến lược khác được sử dụng để liên kết trình tự aptame với ribozym xoắn tạo ra công tắc ribo xoắn BẬT mà cảm ứng sự biểu hiện gen đích khi xử lý bằng phối tử aptame. Như được thể hiện trong Fig. 6a, đầu 3' của thân P1 của dạng xoắn (bao gồm thân 3 bp bổ sung) là liền kề với trình tự aptame. Trong cấu hình này, trình tự thân được dùng chung giữa thân P1 của dạng xoắn và thân P1 của aptame sao cho trình tự chung này có thể tạo ra một trong số thân P1 của dạng xoắn hoặc thân P1 của aptame. Khi không có mặt phối tử aptame (ô trên cùng), trình tự aptame liền kề với thân P1 của dạng xoắn không phá vỡ cấu trúc xoắn và hoạt tính phân cắt ribozym của nó vẫn nguyên vẹn, dẫn đến sự phân cắt mARN và ức chế sự biểu hiện của gen đích. Khi có mặt phối tử aptame (ô bên dưới), aptame đã liên kết phối tử tạo ra thân P1 của aptame với trình tự chung từ thân P1 của dạng xoắn do đó cản trở sự tạo thành thân P1 của dạng xoắn, và cản trở hoạt tính ribozym của nó và làm tăng sự biểu hiện gen đích. Như được mô tả trong các Ví dụ 3 và 4, độ dài thân P1 của aptame là quan trọng đối với chức năng điều hòa của

nó trong ngữ cảnh công tắc ribo. Nếu độ dài thân là quá dài, sự tạo thành P1 của aptame trở nên độc lập với phối tử aptame, dẫn đến không thể điều hòa sự biểu hiện gen đích. Ngoài ra, tác giả sáng chế suy luận là độ dài của trình tự chung cũng là quan trọng. Nếu độ dài của trình tự thân chung là quá ngắn, ribozym xoắn không thể bị tác động bởi sự tạo thành thân P1 của aptame.

Các công tắc ribo xoắn BẬT được tạo ra có 6 hoặc 7 nt của trình tự thân P1 của dạng xoắn được dùng chung với thân P1 của aptame. Với các trình tự thân chung 6 hoặc 7 nt, aptame này tạo ra thân P1 8 hoặc 9 bp. Aptame xpt-guanin được liên kết với nhánh 5' hoặc 3' của trình tự thân P1 của dạng xoắn, tạo ra các cấu trúc GT8 hoặc TG8 và TG9. Việc liên kết guanin aptame với nhánh 5' của thân P1 của dạng xoắn (cấu trúc GT8) gây ra sự cảm ứng 1,4 lần hoạt tính luciferaza khi xử lý bằng guanosin, như được thể hiện trong Fig. 6b, ô bên trái. Tuy nhiên, khi aptame được liên kết với đầu 3' của thân P1 của dạng xoắn như được minh họa trong Fig. 6a, mức nền của hoạt tính luciferaza bị giảm đến 0,7% của vector đối chứng không chứa trình tự dạng xoắn/aptame trong 3' UTR. Khi xử lý bằng guanosin, hoạt tính luciferaza được cảm ứng gây ra sự cảm ứng 8,6 lần và 9,2 lần, tương ứng, đối với cấu trúc TG8 và TG9, như được thể hiện trong Fig. 6b (ô giữa và bên phải). Sự biểu hiện mức nền thấp của luciferaza từ cấu trúc TG8 và TG9 chỉ ra là sự liên kết aptame với đầu 3' của thân P1 không phá vỡ hoạt tính ribozym, và khi liên kết aptame/phối tử, hoạt tính ribozym xoắn bị suy giảm, do đó dẫn đến sự biểu hiện gen đích tăng. Các kết quả này chứng minh là các tác giả sáng chế đã tạo ra các công tắc ribo BẬT xoắn mới mà cảm ứng sự biểu hiện gen đích đáp ứng với việc xử lý bằng phối tử aptame.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Caxet polynucleotit để cảm ứng sự biểu hiện của gen đích đáp ứng với phối tử aptame, caxet polynucleotit này mang công tắc ribo mà chứa aptame nằm ở đầu 3' hoặc 5' của ribozym xoắn, trong đó aptame này bao gồm ít nhất một thân, trong đó thân P1 của ribozym xoắn và thân của aptame bao gồm trình tự nhánh thân chung có chọn lọc, và trong đó:

(a) khi aptame này nằm ở đầu 3' của ribozym xoắn, trình tự nhánh thân chung chọn lọc có khả năng tạo thành chọn lọc tất cả hoặc một phần của (i) nhánh 3' của thân P1 của ribozym xoắn hoặc (ii) nhánh 5' của thân của aptame, và

(b) khi aptame này nằm ở đầu 5' của ribozym xoắn, trình tự nhánh thân chung chọn lọc có khả năng tạo thành chọn lọc tất cả hoặc một phần của (i) nhánh 5' của thân P1 của ribozym xoắn hoặc (ii) nhánh 3' của thân của aptame.

2. Caxet polynucleotit theo điểm 1, trong đó aptame này liên kết với phối tử phân tử nhỏ.

3. Caxet polynucleotit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ribozym xoắn là từ *Nasonia vitripennis*.

4. Caxet polynucleotit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ribozym xoắn chứa SEQ ID NO.:38.

5. Caxet polynucleotit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ribozym xoắn là từ mẫu môi trường.

6. Caxet polynucleotit theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ribozym xoắn là SEQ ID NO.:39.

7. Caxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó phần nhánh của thân P1 của ribozym xoắn mà là trình tự nhánh thân chung chọn lọc là từ 5 đến 8 nucleotit.

8. Caxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó thân P1 của ribozym xoắn là từ 4 đến 9 cặp bazơ.

9. Caxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó thân P1

của aptame là từ 5 đến 8 cặp bazơ.

10. Phương pháp *in vitro* điều hòa sự biểu hiện của gen đích bao gồm các bước:

- a. gắn xen caxet polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9 vào gen đích,
- b. đưa gen đích chứa caxet polynucleotit vào tế bào, và
- c. cho tế bào này tiếp xúc với phối tử phân tử nhỏ liên kết đặc hiệu với aptame với lượng hữu hiệu để làm tăng sự biểu hiện của gen đích.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó caxet polynucleotit được gắn xen vào vùng 5' không dịch mã của gen đích.

12. Phương pháp theo điểm 10, trong đó caxet polynucleotit được gắn xen vào vùng 3' không dịch mã của gen đích.

13. Phương pháp theo điểm 10, trong đó caxet polynucleotit được gắn xen xuôi dòng codon khởi đầu dịch mã.

14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó caxet polynucleotit chứa trình tự peptit 2A nằm giữa đầu 3' của công tắc ribo và trình tự mã hóa gen đích.

15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 14, trong đó hai hoặc nhiều caxet polynucleotit này được gắn xen vào gen đích.

16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó hai hoặc nhiều caxet polynucleotit này chứa nhiều aptame khác nhau liên kết đặc hiệu với nhiều phối tử phân tử nhỏ khác nhau.

17. Phương pháp theo điểm 15, trong đó hai hoặc nhiều caxet polynucleotit này chứa cùng một aptame.

18. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 17, trong đó gen đích chứa caxet polynucleotit được đưa vào vector để biểu hiện gen đích.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó vectơ này là vectơ virus.
20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó vectơ virus được chọn từ nhóm bao gồm vectơ adenovirus, vectơ virus liên hợp adeno, và vectơ lentivirus.
21. Vectơ chứa gen đích mang cassette polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.
22. Vectơ theo điểm 21, trong đó vectơ này là vectơ virus.
23. Vectơ theo điểm 22, trong đó vectơ virus này được chọn từ nhóm bao gồm vectơ adenovirus, vectơ virus liên hợp adeno, và vectơ lentivirus.

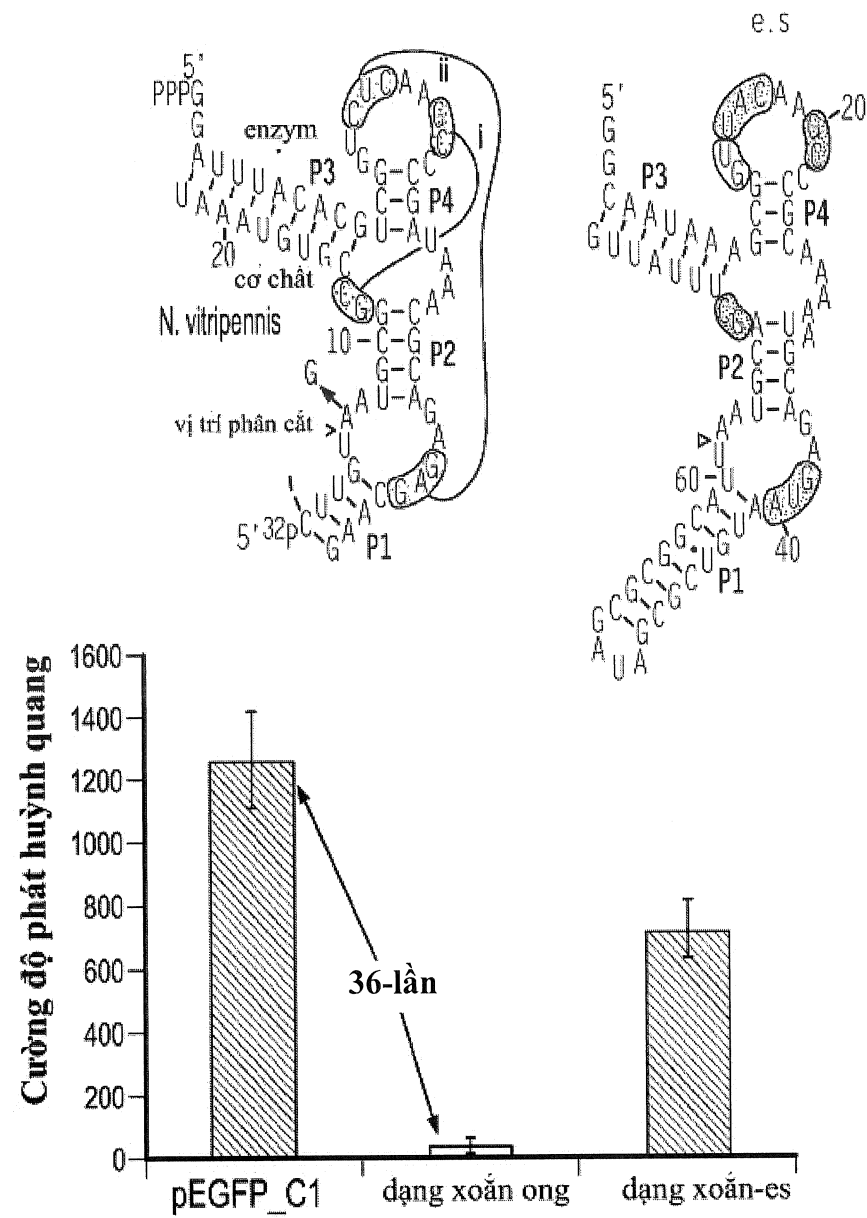


Fig. 1a.

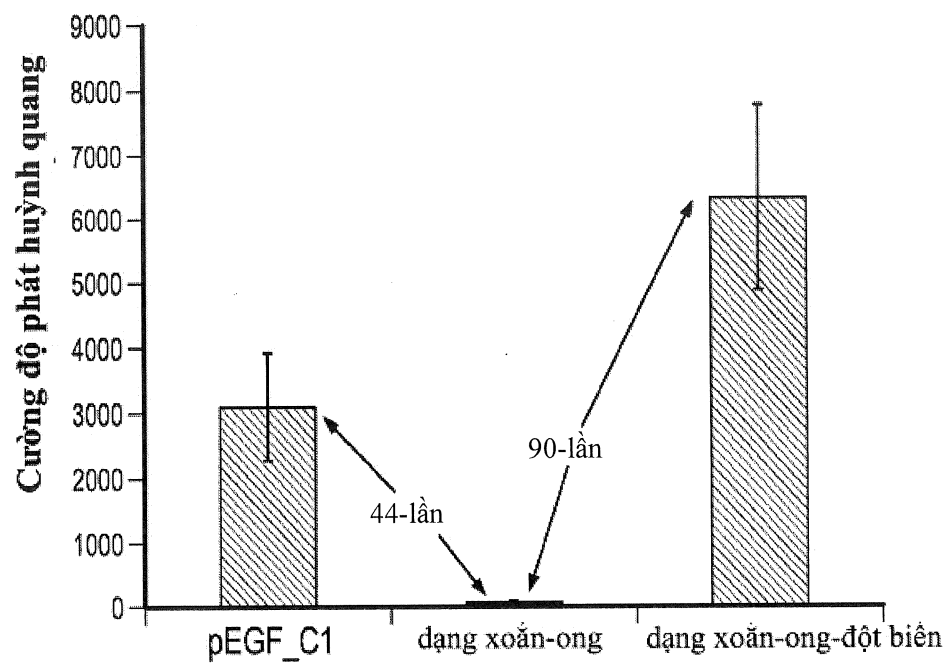


Fig. 1b.

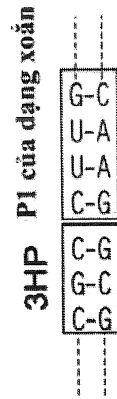


Fig. 2a.

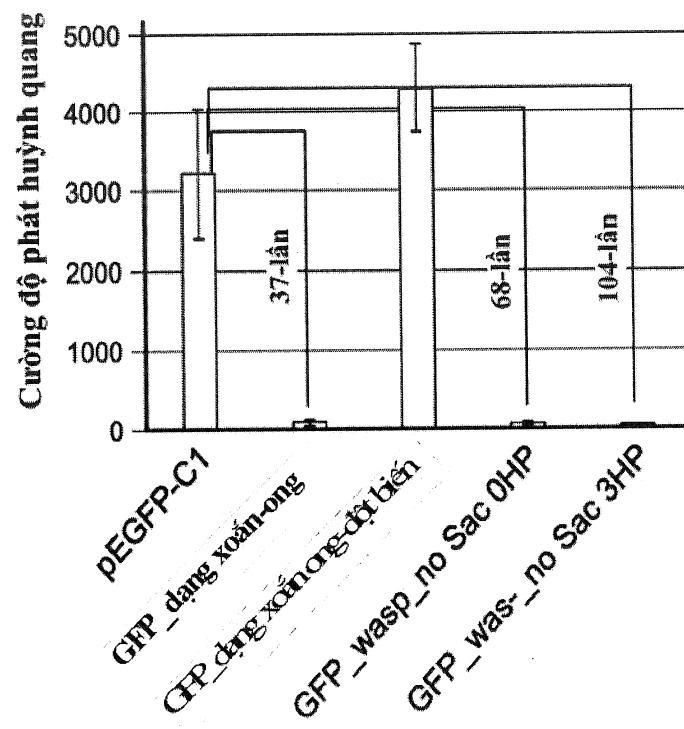


Fig. 2b.

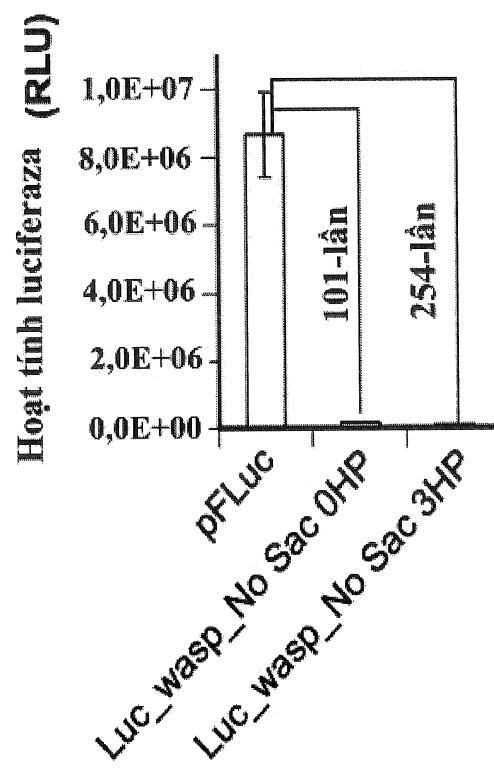


Fig. 2c.

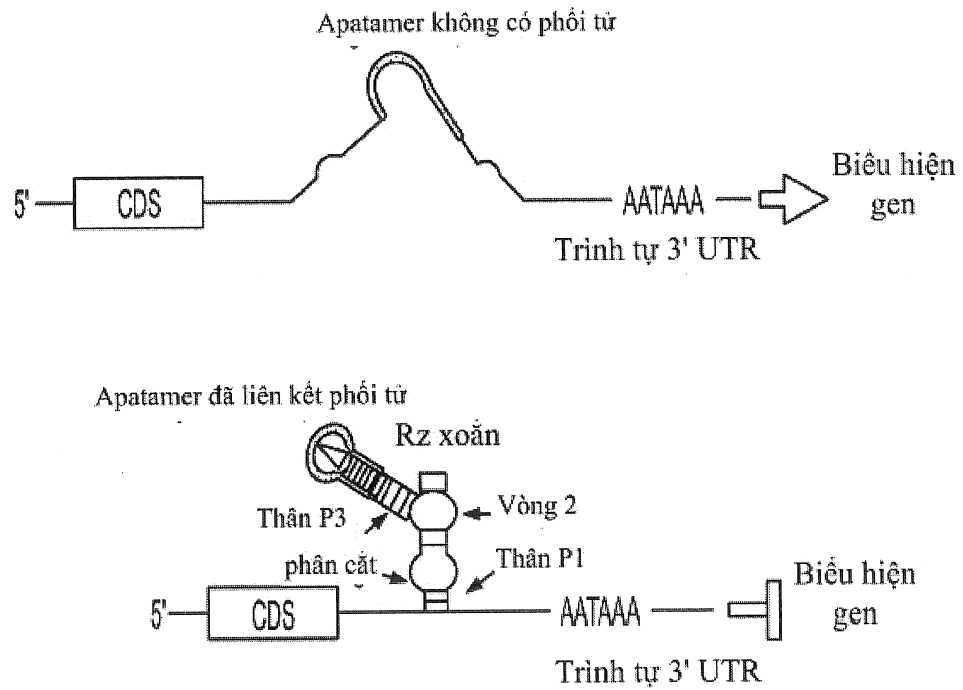


Fig. 3a.

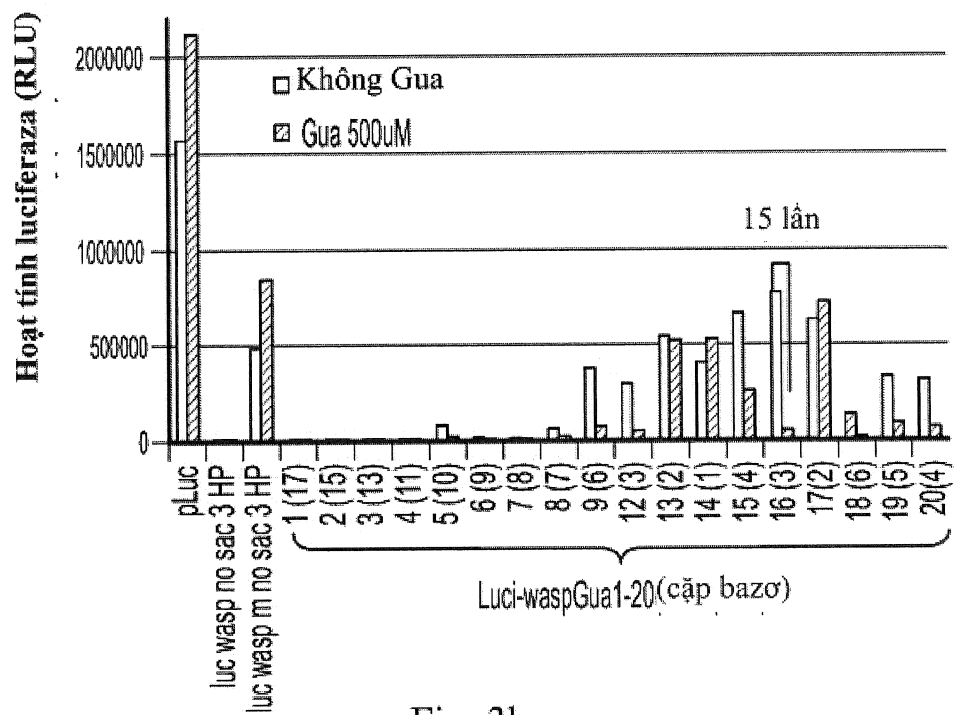


Fig. 3b.

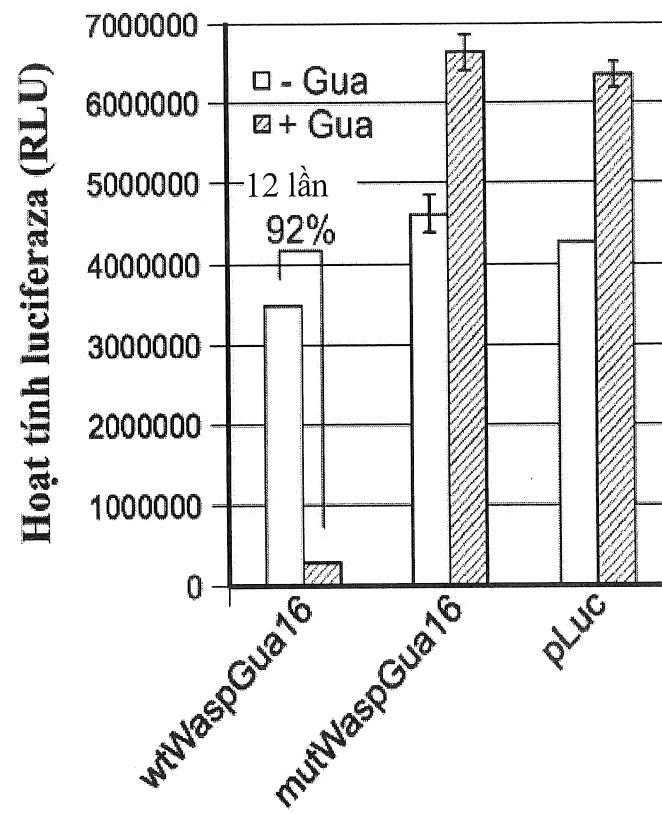


Fig. 3c.

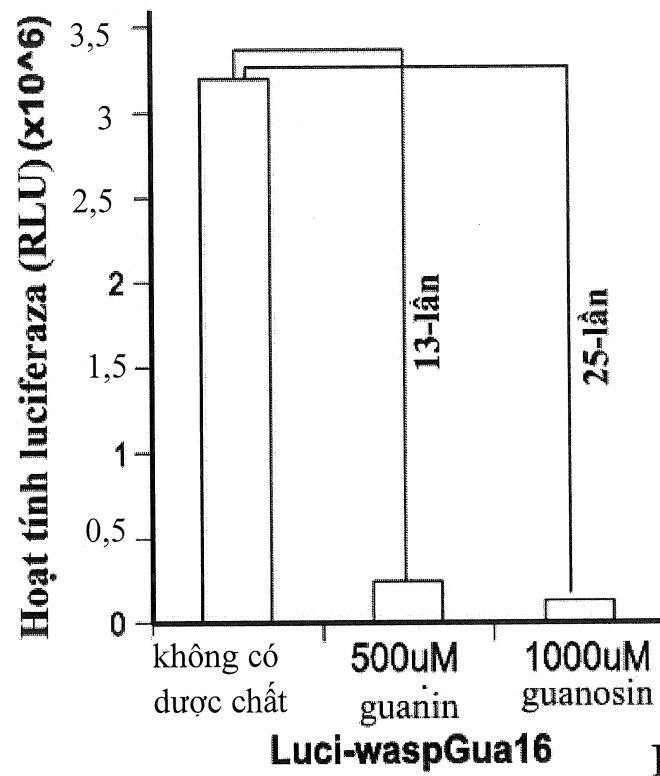


Fig. 3d.

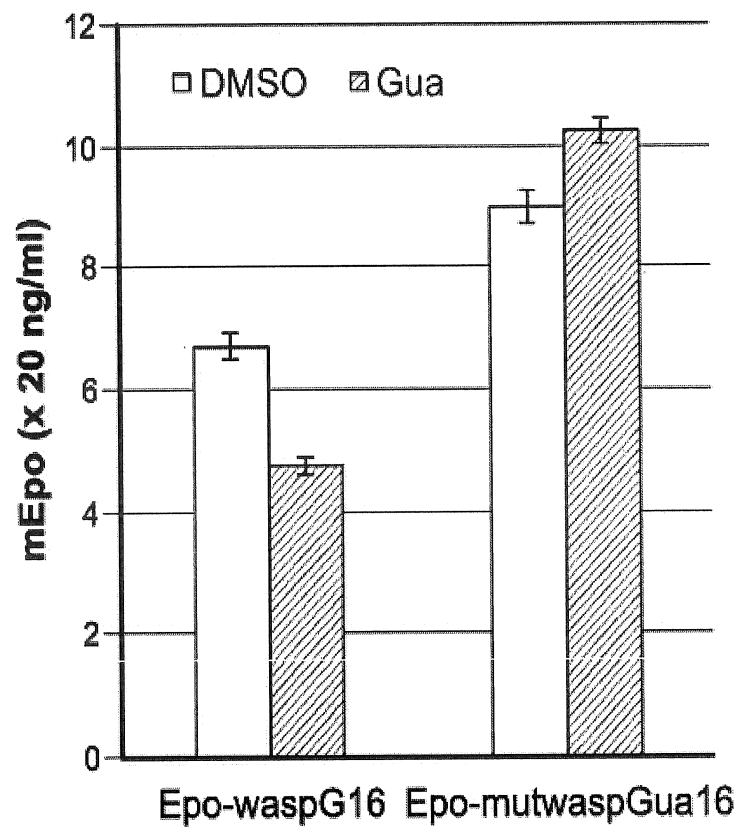


Fig. 3e.

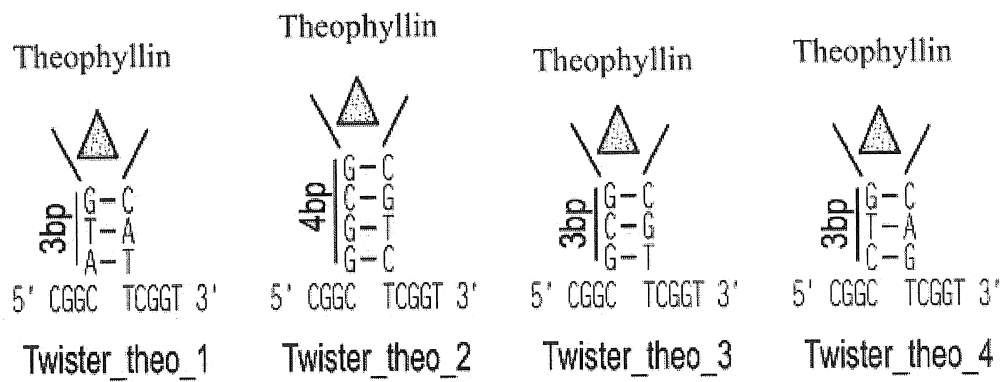


Fig. 4a.

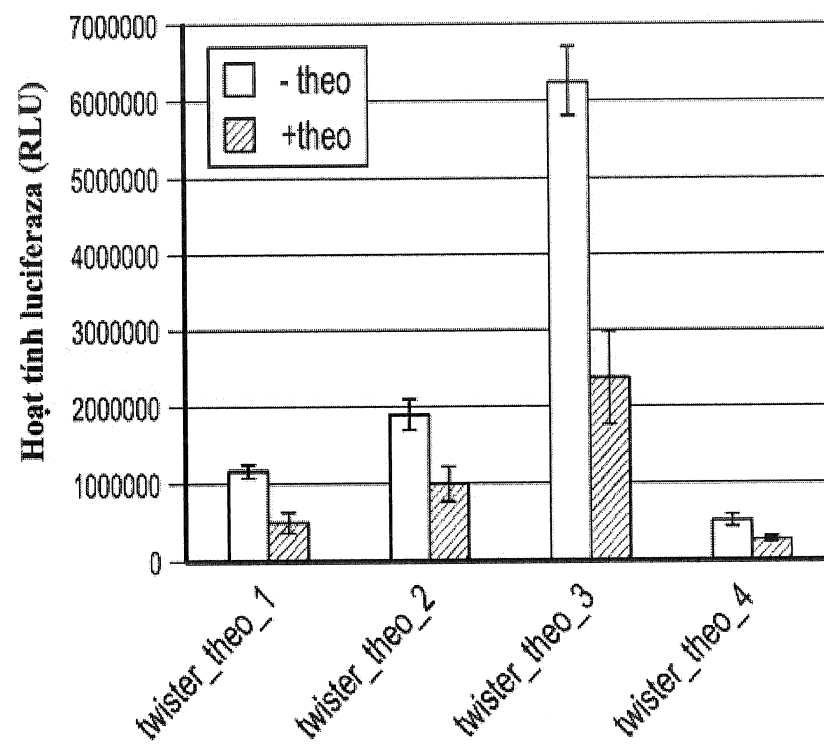


Fig. 4b.

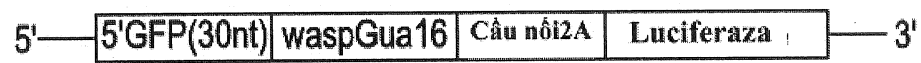
ATG_waspGua16**10aa_waspGua16**

Fig. 5a.

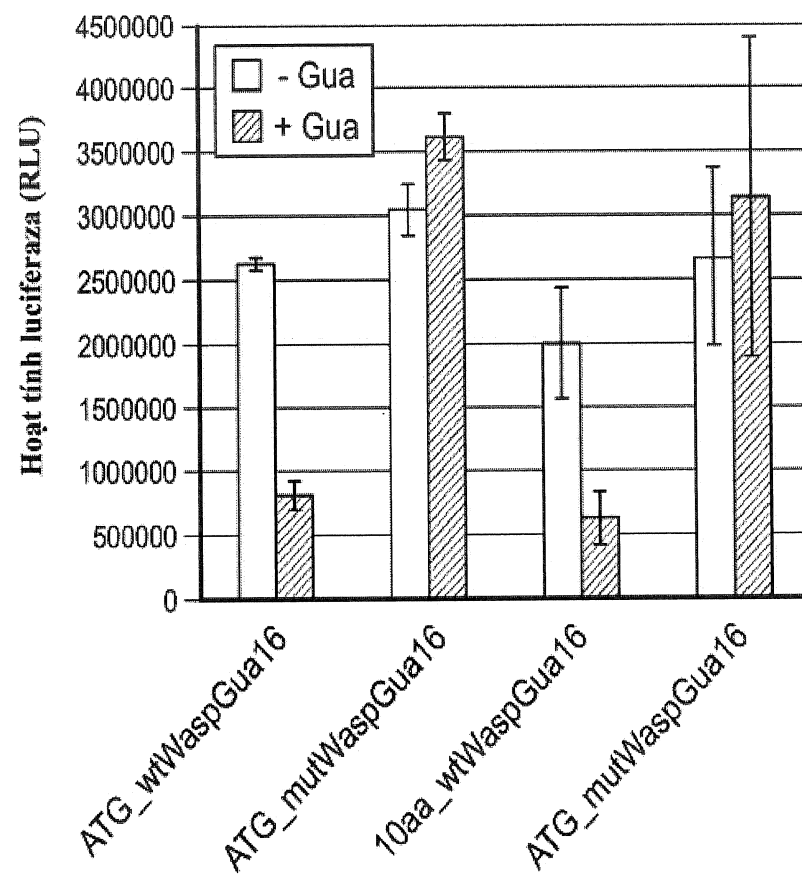


Fig. 5b.

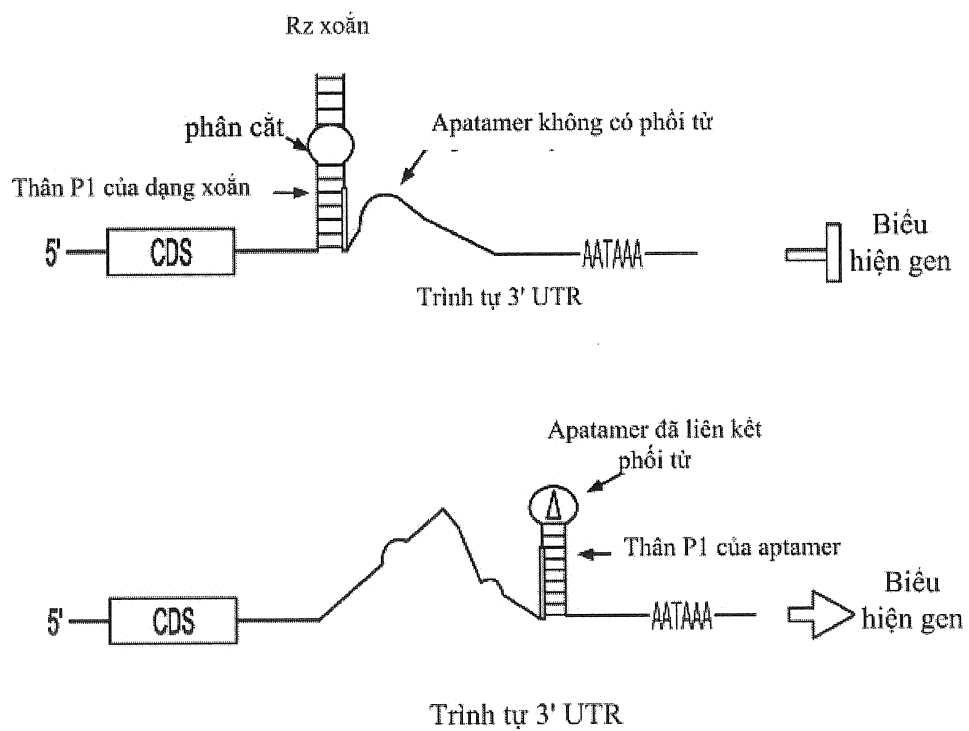


Fig. 6a.

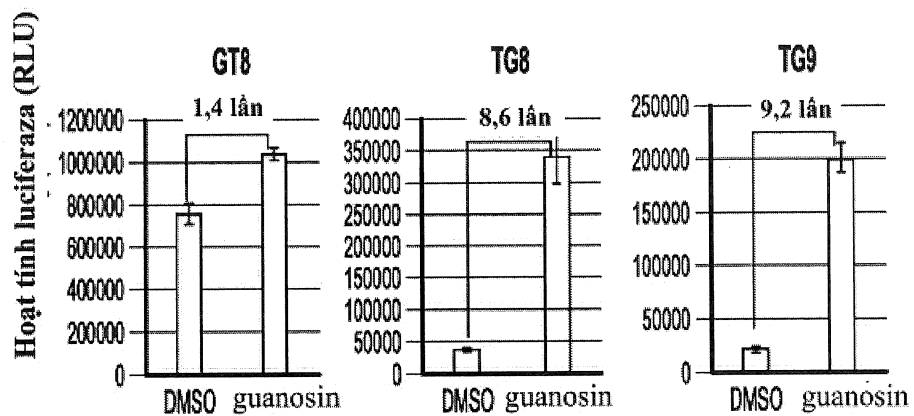


Fig. 6b.

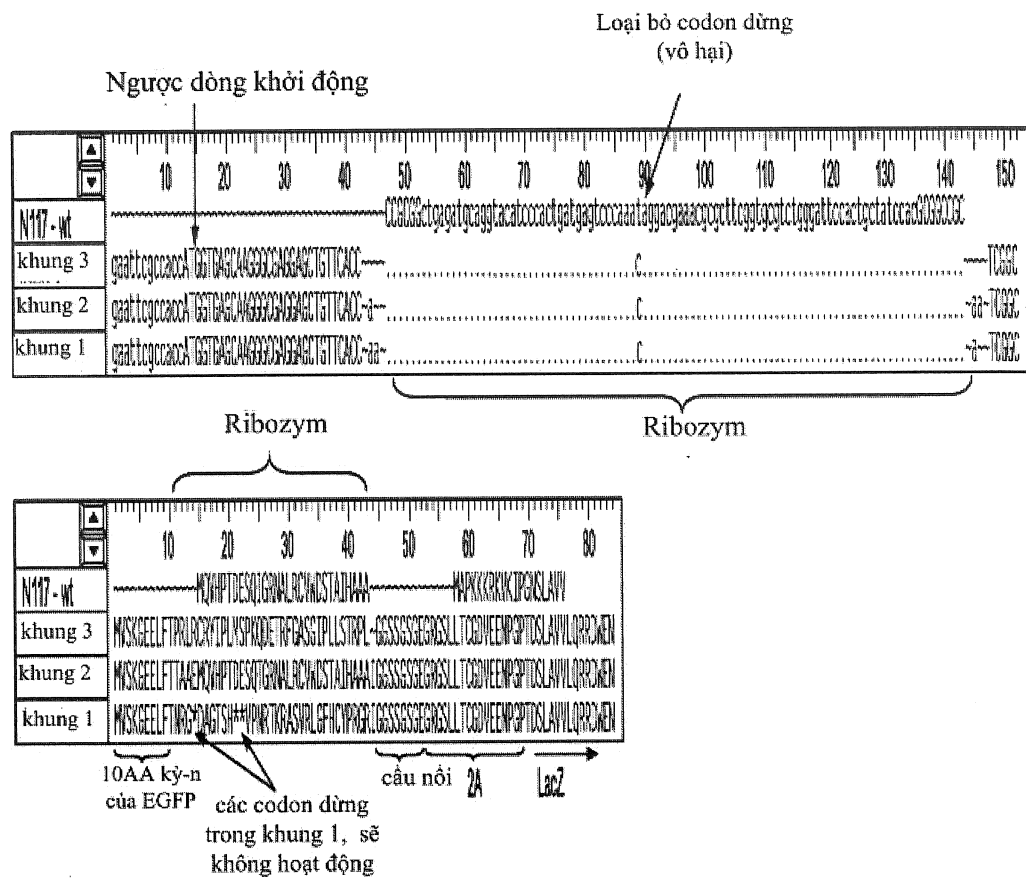


Fig. 7a.

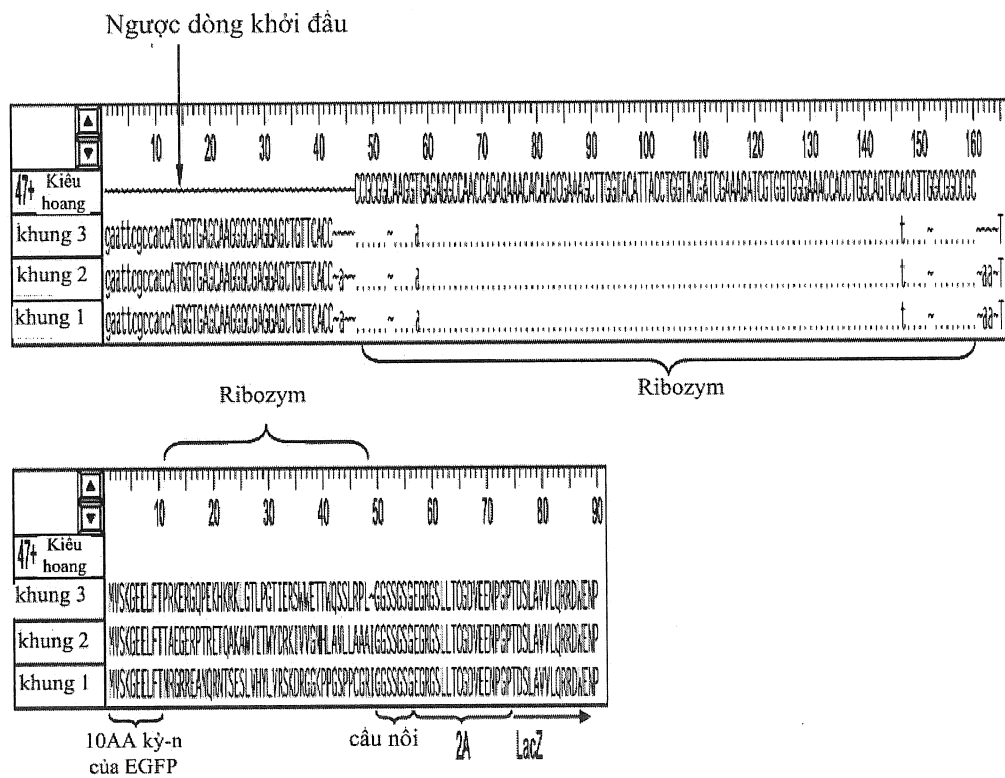


Fig. 7b.

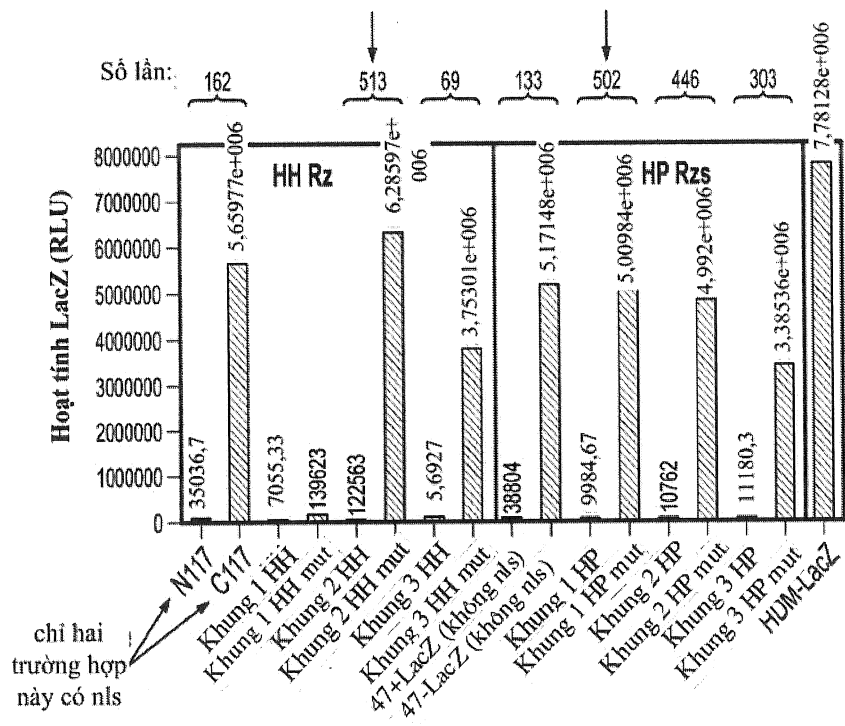


Fig. 7c.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MeiraGTx UK II Limited
 MeiraGTx, LLC
 Volles, Michael J.
 Danos, Olivier F.
 Boyne, Alex K.
 Zennou, Veronique
 Guo, Xuecui

<120> CATXET POLYNUCLEOTIT ĐỀ CẢM ỨNG SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÍCH ĐÁP ỨNG VỚI PHỐI TỬ
 APTAME, PHƯƠNG PHÁP IN VITRO ĐỂ ĐIỀU HÒA SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN ĐÍCH BẰNG CATXET
 POLYNUCLEOTIT NÀY, VÀ VECTO CHỨA GEN ĐÍCH MANG CATXET POLYNUCLEOTIT NÀY

<130> 162027.46376

<140> PCT/US17/16303

<141> 02-02-2017

<150> U.S. 62/290,187

<151> 02-02-2016

<150> U.S. 62/290,209

<151> 02-02-2016

<160> 39

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 208

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dạng xoắn-ong trong pEGFP-C1

<400> 1

gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagtaaac cgcggtttgt 60

aatgcggccg tgtaaataat ttacacgtcg gtctcaagcc cgataaacgc agagagcaag 120

gcggccgcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt aaaaaacctc ccacacctcc 180

ccctgaacct gaaacataaa atgaatgc 208

<210> 2

<211> 217

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dạng xoắn-es trong pEGFPC1

<400> 2
 gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagtaaac cgcggcaata 60
 aagcgggttac aagcccgcaa aaatagcaga gtaatgtcgc gatagcgcgg cattaatgca 120
 gctttattgg cggccgccat accacatttg tagagggttt acttgcttta aaaaacctcc 180
 cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgc 217

<210> 3
 <211> 208
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> dạng xoắn-ong-đột biến trong pEGFP-C1

<400> 3
 gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagtaaac cgcggcttgt 60
 gatgcggccg tgtaaataat ttacacgtcg gtctcaagcc cgataaacgc agagagcaag 120
 gcggccgcca taccacattt gtagagggtt tacttgcttt aaaaaacctc ccacacctcc 180
 ccctgaacct gaaacataaa atgaatgc 208

<210> 4
 <211> 202
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> wasp_no Sac OHP trong pEGFP-C1

<400> 4
 gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagtaaac ttgtaatgcg 60
 gccgtgtaaa taatttacac gtcggtctca agcccgataa acgcagagag caaggcggcc 120
 gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga 180
 acctgaaaca taaaatgaat gc 202

<210> 5
 <211> 205
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> wasp_no Sac 3HP trong pEGFP-C1

<400> 5
 gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagtaaac gccttgtaat 60
 gcggccgtgt aaataattta cacgtcggtc tcaagcccga taaacgcaga gagcaaggcg 120
 gccgccatac cacatttgta gaggttttac ttgcttttaa aaacctccca cacctccccc 180
 tgaacctgaa acataaaatg aatgc 205

<210> 6
 <211> 203
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> wasp_No Sac OHP trong pLuc

<400> 6
 tcagagagat cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acttgtaatg 60
 cggccgtgta aataatttac acgtcgggtc caagcccgat aaacgcagag agcaaggcgg 120
 ccgccatacc acatttgtag aggttttact tgcttttaaaa aacctcccac acctccccct 180
 gaacctgaaa cataaaatga atg 203

<210> 7
 <211> 207
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> wasp_No Sac 3HP trong pLuc

<400> 7
 tcagagagat cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60
 atgcggccgt gtaaataatt tacacgtcgg tctcaagccc gataaacgca gagagcaagg 120
 cggccgccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc 180
 cctgaacctg aaacataaaa tgaatgc 207

<210> 8
 <211> 275
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> waspGua1 trong pLuc

<400> 8
 tcagagagat cctcataaaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60
 atgcggccgt gtaaactact catataatcg cgtggatatg gcacgcaagt ttctaccggg 120
 caccgtaaatt gtccgactat gggtgattta caggtcgggc tcaagcccgga taaacgcaga 180
 gagcaaggcg gccgccatac cacatttgta gaggttttac ttgcttttaa aaacctccca 240
 cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgc 275

<210> 9
 <211> 271
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> waspGua2 trong pLuc

<400> 9
 tcagagagat cctcataaaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60
 atgcggccgt gtaaaactca tataatcgcg tggatatggc acgcaagttt ctaccgggca 120
 ccgtaaatgt ccgactatgg gttttacacg tcggtctcaa gcccgataaa cgcagagagc 180
 aaggcggccg ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc 240
 tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg c 271

<210> 10
 <211> 267
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> waspGua3 trong pLuc

<400> 10
 tcagagagat cctcataaaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60
 atgcggccgt gtaactcata taatcgcggt gatattggcac gcaagtttct accgggcacc 120
 gtaaattgtcc gactatgggt tacacgtcgg tctcaagccc gataaacgca gagagcaagg 180
 cggccgcat accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc 240
 cctgaacctg aaacataaaa tgaatgc 267

<210> 11
 <211> 263

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> waspGua4 trong pLuc

<400> 11

tcagagagat cctcataaag gccaagaagg gcggaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60

atgcggccgt gtatcatata atcgctgga tatggcacgc aagtttctac cgggcaccgt 120

aatgtccga ctatggtaca cgtcgggtctc aagcccagata aacgcagaga gcaaggcggc 180

cgccatacca catttgtaga gggtttactt gcttttaaaaa acctcccaca cctccccctg 240

aacctgaaac ataaaatgaa tgc 263

<210> 12

<211> 261

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> waspGua5 trong pLuc

<400> 12

tcagagagat cctcataaag gccaagaagg gcggaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60

atgcggccgt gttcatataa tcgctggat atggcacgca agtttctacc gggcaccgta 120

aatgtccgac tatggacacg tcggtctcaa gcccgataaa cgcagagagc aaggcggccg 180

ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc ttttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa 240

cctgaaacat aaaatgaatg c 261

<210> 13

<211> 259

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> waspGua6 trong pLuc

<400> 13

tcagagagat cctcataaag gccaagaagg gcggaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60

atgcggccgt gtcatataat cgcgtggata tggcacgcaa gtttctaccg ggcaccgtaa 120

atgtccgact atgacacgtc ggtctcaagc ccgataaacg cagagagcaa ggcggccgcc 180

ataccacatt tgtagagggtt ttacttgctt taaaaaacct cccacacctc cccctgaacc 240

tgaaacataa aatgaatgc

259

<210> 14
 <211> 257
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> waspGua7 trong pLuc

<400> 14
 tcagagagat cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60
 atgcggccgt gcatataatc gcgtggatat ggcacgcaag tttctaccgg gcaccgtaaa 120
 tgtccgacta tgcacgtcgg tctcaagccc gataaacgca gagagcaagg cggccgccat 180
 accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg 240
 aaacataaaa tgaatgc 257

<210> 15
 <211> 255
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> waspGua8 trong pLuc

<400> 15
 tcagagagat cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60
 atgcggccgt gatataatcg cgtggatatg gcacgcaagt ttctaccggg caccgtaaat 120
 gtccgactat cacgtcggtc tcaagcccga taaacgcaga gagcaaggcg gccgccatac 180
 cacatttgta gaggtttttac ttgcttttaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa 240
 acataaaatg aatgc 255

<210> 16
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> waspGua9 trong pLuc

<400> 16
 tcagagagat cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60

atgcggccgt atataatcgc gtggatatgg cacgcaagtt tctaccgggc accgtaaatg 120
 tccgactata cgtcgggtctc aagcccgata aacgcagaga gcaaggcggc cgccatacca 180
 catttgtaga ggttttactt gcttttaaaaa acctcccaca cctccccctg aacctgaaac 240
 ataaaatgaa tgc 253

<210> 17
 <211> 247
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> waspGua12 trong pLuc

<400> 17
 tcagagagat cctcataaag gccagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60
 atgcggccga taatcgctg gatatggcac gcaagtttct accgggcacc gtaaattgtcc 120
 gactcgtcgg tctcaagccc gataaacgca gagagcaagg cggccgccat accacatttg 180
 tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa 240
 tgaatgc 247

<210> 18
 <211> 245
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> waspGua13 trong pLuc

<400> 18
 tcagagagat cctcataaag gccagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60
 atgcggccat aatcgctggtg atatggcacg caagtttcta ccgggcaccg taaatgtccg 120
 actgtcggtc tcaagcccga taaacgcaga gagcaaggcg gccgccatac cacatttgta 180
 gaggttttac ttgcttttaa aaacctcca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg 240
 aatgc 245

<210> 19
 <211> 243
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> waspGua14 trong pLuc

<400> 19

tcagagagat cctcataaaag gccagaagg gcggaagat cgccgtgtaa acgccttgta	60
atgcggccta atcgcggtga tatggcacgc aagtttctac cgggcaccgt aaatgtccga	120
cgtcggtctc aagcccata aacgcagaga gcaaggcggc cgccatacca catttgtaga	180
ggttttactt gctttaaaaa acctcccaca cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa	240
tgc	243

<210> 20

<211> 249

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> waspGua15 trong pLuc

<400> 20

tcagagagat cctcataaaag gccagaagg gcggaagat cgccgtgtaa acgccttgta	60
atgcggccat ataatcgcggt ggatatggca cgcaagtttc taccgggcac cgtaaagtgc	120
cgactatgtc ggtctcaagc ccgataaacg cagagagcaa ggcggccgcc ataccacatt	180
tgtagagggtt ttacttgctt taaaaaacct cccacacctc cccctgaacc tgaaacataa	240
aatgaatgc	249

<210> 21

<211> 247

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> waspGua16 trong pLuc

<400> 21

tcagagagat cctcataaaag gccagaagg gcggaagat cgccgtgtaa acgccttgta	60
atgcggcata taatcgcggtg gatatggcac gcaagtttct accgggcacc gtaaagtgtc	120
gactattcgg totcaagccc gataaacgca gagagcaagg cggccgcat accacatttg	180
tagagggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa	240
tgaatgc	247

<210> 22
 <211> 245
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> waspGual7 trong pLuc

<400> 22
 tcagagagat cctcataaaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60
 atgcggcctat aatcgcgctgg atatggcacg caagtttcta ccgggcaccg taaatgtccg 120
 actatcgggtc tcaagcccga taaacgcaga gagcaaggcg gccgccatac cacatttgta 180
 gaggtttttac ttgcttttaaa aaacctccca cacctccccc tgaacctgaa acataaaatg 240
 aatgc 245

<210> 23
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> waspGual8 trong pLuc

<400> 23
 tcagagagat cctcataaaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60
 atgcggccgt gtataatcgc gtggatatgg cacgcaagtt tctaccgggc accgtaaatg 120
 tccgactaca cgtcggtctc aagcccgaata aacgcagaga gcaaggcggc cgccatacca 180
 catttgtaga gggttttactt gcttttaaaaa acctcccaca cctccccctg aacctgaaac 240
 ataaaatgaa tgc 253

<210> 24
 <211> 251
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> waspGual9 trong pLuc

<400> 24
 tcagagagat cctcataaaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60
 atgcggccgt tataatcgcg tggatatggc acgcaagttt ctaccgggca ccgtaaatg 120

ccgactaacg tcggtctcaa gcccgataaa cgcagagagc aaggcggccg ccataccaca 180
 tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat 240
 aaaatgaatg c 251

<210> 25
 <211> 249
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> waspGua20 trong pLuc

<400> 25
 tcagagagat cctcataaag gccagaagg gcggaagat cgcctgttaa acgccttgta 60
 atgcggccgt ataatcgctt ggatatggca cgcaagtttc taccggggcac cgtaaattgtc 120
 cgactacgtc ggtctcaagc ccgataaacg cagagagcaa ggccggccgcc ataccacatt 180
 tgtagagggtt ttacttgctt taaaaaacct cccacacctc cccctgaacc tgaaacataa 240
 aatgaatgc 249

<210> 26
 <211> 296
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Epo-waspGua16

<400> 26
 gctgtacacg ggagaggtct gcaggagagg ggacaggtga ggatccacgc cttgtaattgc 60
 ggcatataat cgcgtggata tggcacgcaa gtttctaccg ggcaccgtaa atgtccgact 120
 attcgggtctc aagcccgata aacgcagaga gcaaggcgct cgaggggcca gatctaattc 180
 accccaccag tgcaggctgc ctatcagaaa gtggtggctg gtgtgggctaa tgccctggcc 240
 cacaagtatc actaagctcg ctttcttgcgt gtccaatttc tattaaagggt tccttt 296

<210> 27
 <211> 296
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Epo-mutwaspGua16

<400> 27

```
gctgtacacg ggagaggtct gcaggagagg ggacaggtga ggatccacgc cttgtgatgc      60
ggcatataat cgcgtggata tggcacgcaa gtttctaccg ggcaccgtaa atgtccgact      120
attcgggtctc aagcccataa aacgcagaga gcaaggcgct cgagggccca gatctaattc      180
accccaccag tgcaggctgc ctatcagaaa gtggtggctg gtgtggctaa tgccttgccc      240
cacaagtatc actaagctcg ctttcttgct gtccaatttc tattaaaggt tccttt      296
```

<210> 28

<211> 219

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> twister_theo_1 trong pLuc

<400> 28

```
tcagagagat cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta      60
atgcggcatg ataccagccg aaaggccctt ggcagcattc ggtctcaagc ccgataaacg      120
cagagagcaa ggcggccgcc ataccacatt tgtagagggt ttacttgctt taaaaaacct      180
cccacacctc cccctgaacc tgaaacataa aatgaatgc      219
```

<210> 29

<211> 221

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> twister_theo_2 trong pLuc

<400> 29

```
tcagagagat cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta      60
atgcggcggc gataccagcc gaaaggccct tggcagcgtc tcggtctcaa gcccgataaa      120
cgcagagagc aaggcggccg ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac      180
ctccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg c      221
```

<210> 30

<211> 219

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> twister_theo_3 trong pLuc

<400> 30

tcagagagat cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60

atgcggcgcg ataccagccg aaaggccctt ggcagcggtc ggtctcaagc ccgataaacg 120

cagagagcaa ggcggccgcc ataccacatt tgtagagggtt ttacttgctt taaaaaacct 180

cccacacctc cccctgaacc tgaaacataa aatgaatgc 219

<210> 31

<211> 219

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> twister_theo_4 trong pLuc

<400> 31

tcagagagat cctcataaag gccaagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60

atgcggcctg ataccagccg aaaggccctt ggcagcagtc ggtctcaagc ccgataaacg 120

cagagagcaa ggcggccgcc ataccacatt tgtagagggtt ttacttgctt taaaaaacct 180

cccacacctc cccctgaacc tgaaacataa aatgaatgc 219

<210> 32

<211> 228

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ATG_wtWaspGua16 trong pLuc

<400> 32

atgacgcctt gtaatgcggc atataatcgc gtggatatgg cacgcaagtt tctaccgggc 60

accgtaaagt tccgactatt cggctctcaag cccgataaac gcagagagca aggcgaaggc 120

ggatcttcag gtagtggcga gggcagagga agtcttctaa catgcggtga cgtggaggag 180

aatcccggcc ccgaagacgc caaaaacata aagaaaggcc cggcgcca 228

<210> 33

<211> 228

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ATG_mutWaspGua16 trong pLuc

<400> 33

atgacgcctt gtgatgcggc atataatcgc gtggatatgg cacgcaagtt tctaccgggc	60
accgtaaatg tccgactatt cgggtctcaag cccgataaac gcagagagca aggcgaaggc	120
ggatcttcag gtagtggcga gggcagagga agtcttctaa catgcggtga cgtggaggag	180
aatcccggcc ccgaagacgc caaaaacata aagaaaggcc cggcgcca	228

<210> 34

<211> 255

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 10aa_wtWaspGua16 trong pLuc

<400> 34

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc acgccttgta atgcggcata taatcgcggtg	60
gatatggcac gcaagtttct accgggcacc gtaaatgtcc gactattcgg tctcaagccc	120
gataaacgca gagagcaagg cgaaggcgga tcttcaggta gtggcgaggg cagaggaagt	180
cttctaacat gcggtgacgt ggaggagaat cccggccccg aagacgcca aaacataaag	240
aaaggccccg cgcca	255

<210> 35

<211> 255

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 10aa_mutWaspGua16 trong pLuc

<400> 35

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc acgccttgta atgcggcata taatcgcggtg	60
gatatggcac gcaagtttct accgggcacc gtaaatgtcc gactattcgg tctcaagccc	120
gataaacgca gagagcaagg cgaaggcgga tcttcaggta gtggcgaggg cagaggaagt	180
cttctaacat gcggtgacgt ggaggagaat cccggccccg aagacgcca aaacataaag	240
aaaggccccg cgcca	255

<210> 36
 <211> 271
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> GT_8bp trong pLuc

<400> 36
 tcagagagat cctcataaag gccagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa taaaggcgta 60
 taatcgcggtg gatatggcac gcaagtttct accgggcacc gtaaattgtcc gactacgcct 120
 tgtaatgcgg ccgtgtaaat aatttacacg tcggtctcaa gcccgataaa cgcagagagc 180
 aaggcgcccg ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc 240
 tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg c 271

<210> 37
 <211> 265
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> TG_9b trong pLuc

<400> 37
 tcagagagat cctcataaag gccagaagg gcggaaagat cgccgtgtaa acgccttgta 60
 atgcggccgt gtaaataatt tacacgtcgg tctcaagccc gataaacgca gagagcaagg 120
 cgtataatcg cgtggatatg gcacgcaagt ttctaccggg caccgtaaat gtccgactac 180
 gccttgatac cacatttgta gaggttttac ttgcttttaa aaacctccca cacctcccc 240
 tgaacctgaa acataaaatg aatgc 265

<210> 38
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> *Nasonia vitripennis*

<400> 38
 cttgtaatgc ggccgtgtaa ataatttaca cgtcggtctc aagcccgata aacgcagaga 60
 gcaag 65

<210> 39
 <211> 76
 <212> ADN

<213> Chưa biết

<220>

<223> Twister ribozym từ mẫu môi trường

<400> 39

ggcaataaag cggttacaag cccgcaaaaa tagcagagta atgtcgcgat agcgcggcat 60

taatgcagct ttattg 76